



Études structurales et fonctionnelles de protéines impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives

Karl Brillet

► To cite this version:

Karl Brillet. Études structurales et fonctionnelles de protéines impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ008 . tel-00870604

HAL Id: tel-00870604

<https://theses.hal.science/tel-00870604>

Submitted on 7 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la Santé

Service VAE

THÈSE présentée par :

Karl BRILLET

soutenue le : **11 Avril 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

**Études structurales et fonctionnelles de
protéines impliquées dans
l'assimilation du fer chez les bactéries
Gram-négatives**

Président du jury :

M. DREYSSE Hugues

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DELEPELAIRE Philippe

M. JAULT Jean-Michel

M. GRUTTER Thomas

M. RENAUD Jean Paul

Directeur de recherche CNRS, IBPC, UMR 7099, Paris

Directeur de recherche CNRS, IBS, UMR 5075, Grenoble

Chargé de recherche CNRS, UMR 7199, Strasbourg

Directeur Scientifique, Société NovAliX, Illkirch

SUPERVISEUR SCIENTIFIQUE :

M. SAUTER CLAUDE

Chargé de recherche CNRS, IBMC, UPR 9002, Strasbourg

SUPERVISEUR VAE :

Mme. HAUG Danielle

Directrice Service VAE, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Dr Philippe DELEPELAIRE, Dr Jean-Michel JAULT, Dr Thomas GRUTTER, Dr Jean-Paul RENAUD et Pr Hugues DREYSSE. Je remercie également le Dr Claude SAUTER de m'avoir suivi dans cette aventure de la VAE, pour ses conseils et son soutien. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris sur les différentes techniques de cristallogénèse et aussi l'utilisation du logiciel PyMol. Je souhaite remercier Mme Danielle HAUG pour m'avoir éclairer sur la procédure de Validation des Acquis de l'Expérience pour l'obtention d'un doctorat et pour son accompagnement tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Un grand merci également à Mme Emmanuelle ABRAHAM qui a su, dès la première réunion, m'orienter dans cette procédure, et à l'ensemble des personnels du service VAE de l'Université de Strasbourg.

Ce travail ne serait rien sans le soutien et la confiance que m'ont accordé mes différents chefs d'équipe depuis mon entrée au CNRS. En premier lieu, je veux témoigner ici toute ma reconnaissance au Dr Franc PATTUS qui m'a fait confiance dès mon entrée dans l'unité en me donnant l'autonomie qui m'a permis d'évoluer et de m'épanouir dans ma carrière. Tout ce travail ne serait rien sans mon mentor, le Dr David COBESSI, avec qui j'ai énormément appris pendant les 3 années où nous avons travaillé ensemble. J'ai adoré travailler à tes côtés et merci de m'avoir enseigné les merveilles de la cristallogénèse. J'espère qu'on aura encore l'occasion d'interagir à l'avenir. Merci également aux équipes des lignes BM30A et ID23-1 à l'ESRF et de la ligne PROXIMA-1 à SOLEIL.

Je remercie également le Dr Isabelle SCHALK, grâce à qui j'ai pu poursuivre les projets d'études structurales de protéines membranaires lorsque j'ai rejoint son équipe. Merci aussi de ton soutien pour la réalisation de ce manuscrit et de la confiance que tu m'accordes pour mener les projets. Grâce à toi, j'ai aussi appris à prendre du recul par rapport aux résultats. En tous cas, il est vraiment très agréable de travailler avec toi, tu arrives à communiquer ton enthousiasme et ta passion pour la recherche. Merci pour ton aide et ton accessibilité.

Je souhaite également remercier le Dr Jean-Luc GALZI, qui dirige notre unité depuis 2008. Merci de m'avoir encourager à m'engager dans cette procédure de VAE. Ton soutien dans les projets que je mets en place m'a réellement permis d'avancer plus sereinement

dans ma carrière. Merci également à Georges ORFANOUDAKIS, directeur de l'ESBS, qui m'accorde sa confiance pour organiser différents événements au sein de l'institut (séminaires techniques, formations).

Je remercie très chaleureusement Françoise, plus de dix ans qu'on travaille dans le même laboratoire et depuis quelques années dans la même équipe. Merci pour tous ces moments de complicité. Une amitié de longue date qui nous a permis de partager beaucoup de choses depuis tout ce temps, même si ces derniers mois j'ai eu l'esprit un peu occupé par ce travail. Merci pour ton soutien, y compris dans les moments difficiles. Merci également à Gaëtan qui nous éclaire toujours sur les mystères de la chimie, et pour ces moments d'humour pendant les repas. On « nem » beaucoup ! ;-)

Un grand merci également à tous les membres de l'équipe, y compris ceux qui ont quitté le labo récemment, les biologistes : Claire, Laurent, Olivier, Valérie, Véronique, et les chimistes : Bénédicte, Etienne et Isabelle. Merci pour votre bonne humeur et les pauses pâtisseries !

Un grand grand merci à Renaud. Comme on me le répète souvent, j'ai toujours pas coupé le cordon de l'ancienne équipe « PATTUS ». C'est toujours un plaisir de travailler avec toi et de développer des projets transversaux : la plateforme ou la collaboration avec le Sao-Paulo. Tu as toujours été de bon conseil, merci pour ta confiance, ta patience et ton écoute. Un clin d'œil également à toute la « team WAGNER » et en particulier : Céline, Christel, Isa, Juliette, Olivier et Tania ;-).

Evidemment, je remercie Sylvie et Claire pour l'énorme travail qu'elles réalisent au niveau des commandes, des marchés, des missions.... Je ne sais pas comment on s'en sortirait sans vous ! C'est toujours un plaisir de discuter avec vous. On est toujours accueilli avec le sourire, merci de votre gentillesse. Une mention spéciale aussi à mon ami Jacqui, le roi des canulars. Je ne sais pas où tu vas chercher toutes ces idées ? Et bravo pour ton efficacité, dès qu'on a un problème : réseau, plomberie, électricité... tu trouves toujours une solution. Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité que je côtoie depuis plusieurs années.

Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance au Professeur Carlos PEREIRA. La première collaboration que nous avons mis en place a vraiment été le moment clé de ma carrière : la nucléation ! Grâce à toi, j'ai appris à gérer un projet collaboratif de manière autonome. Merci également à toutes les personnes de ton laboratoire avec qui j'ai pu interagir : Soraia, Marcos, Daniella, Alexandre, Anna-lia, Nayara. Un clin d'œil au nouveau directeur du LIV, mon ami Renato. On a passé beaucoup de temps à s'arracher les cheveux

sur cette glycoprotéine virale, j'y ai laissé quelques mèches ! Merci à toi et Mara de m'avoir fait découvrir Sao Paulo, la culture brésilienne, la Caïpirinha et l'équipe pauliste mythique des Corinthians ! (Five stars !) *E um grande obrigado por seu apoio. Abraço.*

Je tiens à remercier l'UdS et le CNRS, particulièrement la délégation Alsace, qui a soutenu et financé ce projet. Merci au service de la formation permanente : Géraldine De MONTBEL, Martine MATHIEU, Gabrielle BOULANGER et Caroline HENRY. C'est un plaisir de travailler avec vous, notamment lors de l'élaboration du Plan de Formation d'Unité, mais aussi lors de la mise en place des formations en purification de protéines. Bravo pour votre efficacité.

Je voudrais aussi remercier les personnes qui m'ont donné la passion de la recherche. En premier lieu le Pr Denis VIVIEN, mais également le Dr Pierre-Jacques BONNAMY et le Pr Jean BOCQUET, de l'Université de Caen – Basse Normandie. Merci également au Dr Florence NOBLE et au Dr Cynthia MARIE-CLAIRE. Grâce à vous, j'ai eu la chance d'intégrer la recherche académique, cette première expérience à l'Université Paris V a véritablement été un tremplin pour moi. Je remercie le Dr Dominique MASSOTTE et le Pr Brigitte KIEFFER, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au début de ma carrière au CNRS.

Je remercie chaleureusement mes meilleurs amis, merci d'être là. Un clan, une famille : merci à Thierry, Sarah & Killian ; Caro, Max & Matteo, Tan, Miniced & Gabrielle et Hélène. Votre soutien m'a beaucoup aidé et avec vous j'ai pu décompresser un peu. Merci à tous mes amis du groupe moto : Arnaud, Charlotte, Lilian, Elie et Lysiane pour toutes les parties de rigolade depuis mon arrivée en Alsace. Un clin d'œil aussi à mes amis Jean-Phi et Philippe ;-).

Finalement, je remercie de tout mon cœur Christell qui a partagé toute cette aventure avec moi et qui a su me soutenir et me motiver lors de moments parfois difficiles. Tu n'as jamais douté de moi. Merci de ton aide et surtout merci d'être là... Un grand merci à ma famille : ma mère, ma sœur, Bernadette & Roger, Christelle, Frédéric, Romain, Simon, Isabelle, Michelle, Elizabeth et Véronique. Si j'en suis ici aujourd'hui c'est grâce à vous. Désolé d'avoir été un peu absent ces derniers mois. Merci de croire en moi.

*A mon père...
A Joëlle...*

Table des matières

Remerciements.....	1
SUJET DE RECHERCHE : Etudes structurales et fonctionnelles de protéines impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives	7
Abréviations.....	9
Liste des figures	11
PARTIE I – Synthèse des données bibliographiques	13
1 Introduction	15
2 Le fer et les micro-organismes	18
2.1 Le fer	18
2.2 Biodisponibilité du fer	19
2.3 Les sources de fer pour les micro-organismes durant l'infection.....	20
3 Les transporteurs TonB-dépendants	28
3.1 Caractéristiques des transporteurs TonB-dépendants	29
3.2 Énergisation des TBDT par le système TonB.....	35
4 Les mécanismes de transport du fer chez les bactéries Gram-négatives.....	44
4.1 Acquisition du fer ferreux	44
4.2 Transport du fer <i>via</i> les sidérophores.....	45
4.3 Transport de l'hème.....	57
4.4 Acquisition du fer <i>via</i> la transferrine et la lactoferrine	68
4.5 Régulation de l'acquisition des systèmes de transport du fer.....	72
5 Le transport du fer chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
5.1 La voie pyoverdine	77
5.2 La voie pyochéline	84
Objectifs.....	89
Partie II – Résultats scientifiques	91
1 Etudes fonctionnelles et structurales du transporteur FpvA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
1.1 Contexte et objectifs du projet	93
1.2 Approches expérimentales	93
1.3 Résultats.....	95
1.4 Conclusion	99
1.5 Publication : Brillet <i>et al.</i> , 2007, <i>Structure</i>	101
2 Etudes structurales de différents transporteurs TonB-dépendants	103
2.1 Structure du transporteur de l'alcaligine FauA, chez <i>Bordetella pertussis</i>	103
2.2 Approches expérimentales	104
2.3 Résultats.....	107
2.4 Conclusion	108
2.5 Publication : Brillet <i>et al.</i> , 2009a, <i>Acta Crystallogr D Biol Crystallogr</i>	109
3 Etudes structurales du transporteur de l'hème ShuA, chez <i>Shigella dysenteriae</i> ...	111
3.1 Introduction.....	111
3.2 Approches expérimentales	112
3.3 Résultats.....	113
3.4 Conclusion	117
3.5 Publication : Brillet <i>et al.</i> , 2009b, <i>Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Comm</i>	119
3.6 Publication : Cobessi <i>et al.</i> , 2010, <i>Proteins</i>	121

4 Etudes fonctionnelles et structurales du transporteur de l'énantiopyochéline, FetA, chez <i>Pseudomonas fluorescens</i>.....	123
4.1 Introduction.....	123
4.2 Approches expérimentales	124
4.3 Résultats.....	125
4.4 Conclusion	129
4.5 Publication : Brillet <i>et al.</i> , 2011, <i>J Am Chem Soc</i>	131
5 FpvCDEF, un transporteur ABC impliqué dans l'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i>	133
5.1 Introduction.....	133
5.2 Approches expérimentales	133
5.3 Résultats.....	135
5.4 Conclusion	137
5.5 Publication : Brillet <i>et al.</i> , 2012, <i>ACS Chem Biol</i>	139
Partie III - Conclusion générale et perspectives	141
Annexe	147
Revue : Sélectivité et stéréosélectivité des transporteurs de sidérophores ferriques.....	149
1 Introduction	149
2 Discussion	149
3 Publication : Schalk <i>et al.</i> , 2012a, <i>Curr Top Membr (Revue)</i>	153
Références Bibliographiques	155

SUJET DE RECHERCHE :

**Etudes structurales et fonctionnelles de protéines
impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries
Gram-négatives**

Abréviations

ABC : *ATP Binding Cassette*
 ADN : Acide DésoxyRibonucléique
 ADP : Adénosine di-phosphate
 ARN : Acide RiboNucléique
 ATP : Adénosine Tri-Phosphate
 C₈E₄ : n-octyltetraoxyethylene
 C₈E₅ : n-octylpentaoxyethylene
 CHESO : n-octyl-2-hydroxyethyl-sulfoxide
 CMC : Concentration Micellaire Critique
 DLS : *Dynamic Light Scattering*
 ECF : *ExtraCytoplasmic Function*
 FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
 GTP : Guanosine-5'-TriPhosphate
 HBP : *Haem Binding Protein*
 IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
 kDa : kilo Dalton
 LDAO : LaurylDimethylAmine-N-Oxide
 MAD : *Multi-wavelength Anomalous Diffraction*
 MES : acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
 MME : MonoMéthyl Ether
 MPD : 2-Méthyl-2,4-PentaneDiol
 NRPS : *Non Ribosomal Peptide Synthetase*
 OPOE : n-OctylPolyOxyEthylène
 OG : n-Octyl-β-D-Glucopyranoside
 PAGE : *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
 PEG : PolyEthylène Glycol
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*
 PDB : *Protein Data Bank*
 PM : Poids Moléculaire
 pM : picoMolaire
 PBP : *Periplasmic Binding Protein*
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
 RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
 SAD : *Single-wavelength Anomalous Diffraction*
 sec : secondes
 SBP : *Solute Binding Protein*
 SPR : *Surface Plasmon Resonance*
 SDS : Sodium Dodecyl sulfate
 TBDT : *TonB-Dependent Transporter*
 u. a. : unité arbitraire

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de l'évolution du nombre de structures de protéines membranaires.....	15
Figure 2 : Schéma des différentes étapes des projets de biologie structurale : du gène à la fonction	17
Figure 3 : Représentation des structures de la lactoferrine et de la transferrine liées au fer	22
Figure 4 : Représentation de la structure de la bactéroferritine d' <i>Escherichia coli</i>	23
Figure 5 : Représentation de l'hème et de la protoporphyrine	25
Figure 6 : Représentation du complexe hème-hémopexine.....	25
Figure 7 : Représentation de la deoxyhémoglobine humaine	26
Figure 8 : Représentation de la structure du complexe haptoglobine-hémoglobine	27
Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'albumine humaine liant l'hème.....	28
Figure 10 : Représentation des structures primaire et tridimensionnelle des TBDT.....	30
Figure 11 : Représentation du bouchon des transporteurs TonB-dépendants	33
Figure 12 : Représentation de la structure du domaine de signalisation d'un TBDT.....	35
Figure 13 : Représentation schématique du complexe TonB-ExbB-ExbD.....	36
Figure 14 : Représentation de la structure du domaine C-terminal de TonB	37
Figure 15 : Représentation de la structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD.	38
Figure 16 : Représentation de la structure du transporteur FhuA en complexe avec la partie périplasmique de TonB	39
Figure 17 : Schéma de la transduction d'énergie via le modèle hélice	41
Figure 18 : Représentation de la transduction d'énergie selon le modèle traction.....	42
Figure 19 : Représentation des structures de TonB et FhuD impliquées dans le modèle de transduction d'énergie assistée par une protéine périplasmique	43
Figure 20 : Représentation schématique du transport du fer ferreux chez <i>E. coli</i>	44
Figure 21 : Groupes fonctionnels capables de chélater le fer. Structures de sidérophores	46
Figure 22 : Représentation de la poche de fixation du citrate au niveau du transporteur FecA	48
Figure 23 : Représentation de la structure du transporteur FecA sous ses différentes formes	50
Figure 24 : Représentation de la structure de FpvA en complexe avec la ferri-pyoverdine	53
Figure 25 : Représentation de la structure d'un transporteur ABC.....	54
Figure 26 : Schéma des différents systèmes de transport du fer chez <i>E. coli</i>	55
Figure 27 : Représentation schématique du transport direct de l'hème	59
Figure 28 : Représentation de la structure l'hémophore HasA	60
Figure 29 : Alignement des séquences de l'hémophore HasA	61
Figure 30 : Représentation de la structure du complexe HasA-HasR	62
Figure 31 : Représentation schématique du transport de l'hème via HpuAB.	64
Figure 32 : Représentation des structures des protéines ShuT et PhuT.....	66
Figure 33 : Représentation de la structure du complexe Hème-HemS.....	67
Figure 34 : Représentation de TbpB et de son interaction avec la transferrine.	69
Figure 35 : Acquisition du fer de la transferrine via le complexe TbpA-TbpB.....	71
Figure 36 : Représentation de la structure de la protéine FbpA liée au fer	72
Figure 37 : Représentation de la structure de la protéine Fur et de sa liaison à l'ADN	74
Figure 38 : Schéma de la régulation positive du transport du fer	75
Figure 39 : <i>P. aeruginosa</i> observée par microscopie électronique	76
Figure 40 : Structure de la pyoverdine produite par <i>P. aeruginosa</i> (PAO1)	78
Figure 41 : Schéma de la voie de biosynthèse de la pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i>	79
Figure 42 : Représentation de la structure de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe.....	80
Figure 43 : Schéma des interactions entre la pyoverdine et FpvA	81
Figure 44 : Schéma global de la voie pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i>	83
Figure 45 : Structures des diastéréoisomères de la pyochéline produits par <i>P. aeruginosa</i>	84
Figure 46 : Représentation schématique du locus pyochéline chez <i>P. aeruginosa</i>	84
Figure 47 : Schéma la synthèse la pyochéline	85
Figure 48 : Représentation de la structure du transporteur FptA-Pch-Fe	86

Figure 49 : Schéma de la voie de biosynthèse de la pyochéline chez <i>P. aeruginosa</i>	88
Figure 50 : Représentation des structures de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe	93
Figure 51 : Propriétés spectrales de la pyoverdine.....	94
Figure 52 : Spectre d'émission de fluorescence de la protéine FpvA	96
Figure 53 : Cristaux de la forme vide du transporteur FpvA.....	96
Figure 54 : Représentation de la structure de FpvA vide	98
Figure 55 : Superposition des structures de FpvA et FpvA-Pvd-Fe	99
Figure 56 : Structure de l'alcaligine.....	104
Figure 57 : Analyse de la localisation de la protéine par immunodétection après séparation sur gradient de sucre.....	105
Figure 58 : Purification et cristallisation du transporteur FauA	107
Figure 59 : Profil d'élution de la protéine ShuA sur une colonne de gel filtration	113
Figure 60 : Cristallisation du transporteur ShuA.....	114
Figure 61 : Représentation de la structure du transporteur ShuA	115
Figure 62 : Représentation des réseaux de liaisons hydrogène de ShuA.....	117
Figure 63 : Structure de la pyochéline et de l'énantiopyochéline	123
Figure 64 : Cristallisation du complexe FetA-EPch-Fe, quelques exemples de cristaux obtenus	125
Figure 65 : Représentation de la structure du transporteur FetA en complexe avec l'EPch-Fe.....	126
Figure 66 : Expérience de liaison de ligand à l'équilibre sur les mutants FetA	127
Figure 67 : Superposition des structures FetA-EPch-Fe et FptA-Pch-Fe au niveau de leur poche de liaison	128
Figure 68 : Superposition des complexes EPch-Fe-citrate et Pch-Fe-EG	129
Figure 69 : Purification des protéines FpvC et FpvF	135
Figure 70 : Représentation de la structure de TroA et prédiction de la structure de FpvC.....	135
Figure 71 : Cristaux de FpvC et FpvF.....	138
Figure 72 : Superposition des structures de différents complexe pyoverdine-fer lié à FpvA.....	150
Figure 73 : Structure des complexes FpvA-Pvd-Fe et Cir-colicine I	151
Tableau 1 : Structures connues de transporteurs TonB-dépendants.....	31
Tableau 2 : Quelques exemples de séquences des boîtes TonB	34

PARTIE I – Synthèse des données bibliographiques

1 Introduction

Dans le règne du vivant, les protéines membranaires assurent un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires en tant que porines, transporteurs, canaux ioniques, pompes d'efflux etc... Chez l'homme, ces protéines membranaires représentent 30% du génome. La plupart d'entre elles correspond à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou des canaux ioniques impliqués dans de nombreuses pathologies humaines comme le cancer, les maladies neurologiques ou vasculaires et bien d'autres. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que ces protéines sont la cible de 60% des médicaments sur le marché (Muller, 2000). Chez les bactéries, les protéines membranaires ont également un rôle très important notamment dans l'import de nutriments ou l'export de facteurs de virulence par exemple. Ces aspects sont au cœur des études qui seront présentées dans ce manuscrit.

Malgré l'importance de ces protéines membranaires dans de nombreux processus biologiques, la connaissance de leurs structures et le détail des mécanismes d'action sont encore très limités. Dans la Protein Data Bank (PDB), on trouve aujourd'hui 85 000 structures et seulement 1 114 structures de protéines membranaires déposées, soit 362 structures de protéines uniques (**Figure 1**). La première structure résolue d'une protéine membranaire fut celle du centre photoréactionnel de *Rhodopseudomonas viridis* en 1985 par Johann DEISENHOFER, prix Nobel de Chimie en 1988 (Deisenhofer *et al.*, 1985).

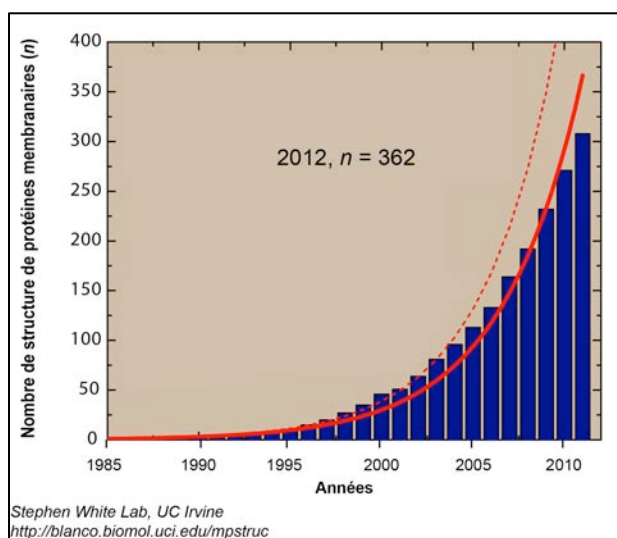


Figure 1 : Représentation de l'évolution du nombre de structures de protéines membranaires

Le manque d'informations structurales résulte de facteurs propres à l'étude de ces protéines pour lesquels des difficultés expérimentales sont rencontrées à différents niveaux : expression, solubilisation, purification, stabilisation et cristallisation. Du fait de leur intégration dans la membrane cellulaire, les protéines membranaires sont des molécules amphiphiles. Une partie de leur surface hydrophobe est enchâssée dans la membrane alors que les zones hydrophiles sont exposées au milieu extracellulaire aqueux. Ainsi pour être étudiées *in-vitro*, les protéines membranaires doivent être extraites de la membrane cellulaire grâce à l'action de détergents. Les détergents peuvent s'insérer dans la bicouche lipidique et se lier au niveau de la section transmembranaire de la protéine, rendant ainsi la protéine soluble. Chaque détergent possède ses propres caractéristiques : concentration micellaire critique (CMC), taille et forme des micelles. La CMC des détergents est dépendante d'un certain nombre de paramètres comme la température ou la force ionique. Leur action permet de mimer la membrane, de maintenir les protéines en solution et ainsi éviter leur précipitation ou leur agrégation.

Les projets d'études structurales de macromolécules biologiques permettent non seulement d'élucider la structure tertiaire des protéines mais aussi d'obtenir des informations moléculaires sur les mécanismes des fonctions biologiques associées. Pour résoudre ces structures, il existe plusieurs méthodes expérimentales : la microscopie électronique, la RMN, la cristallographie mais l'apport d'informations peut venir d'autres techniques biophysiques comme de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ou de la diffusion des neutrons.

Les projets de biologie structurale ont un rôle prépondérant dans l'analyse des structures tridimensionnelles et l'étude des modifications de conformation des macromolécules biologiques (Giege & Sauter, 2010). Les données qui en résultent représentent un atout majeur permettant la rationalisation de la conception de nouvelles molécules bio-actives, par les chimistes organiciens. Parmi les différentes phases des projets d'études structurales de protéines membranaires (**Figure 2**), les étapes limitantes correspondent généralement à la bioproduction, à la solubilisation mais surtout à la cristallogénèse. La résolution de structure de protéines membranaires reste aujourd'hui un défi pour les biochimistes structuralistes.

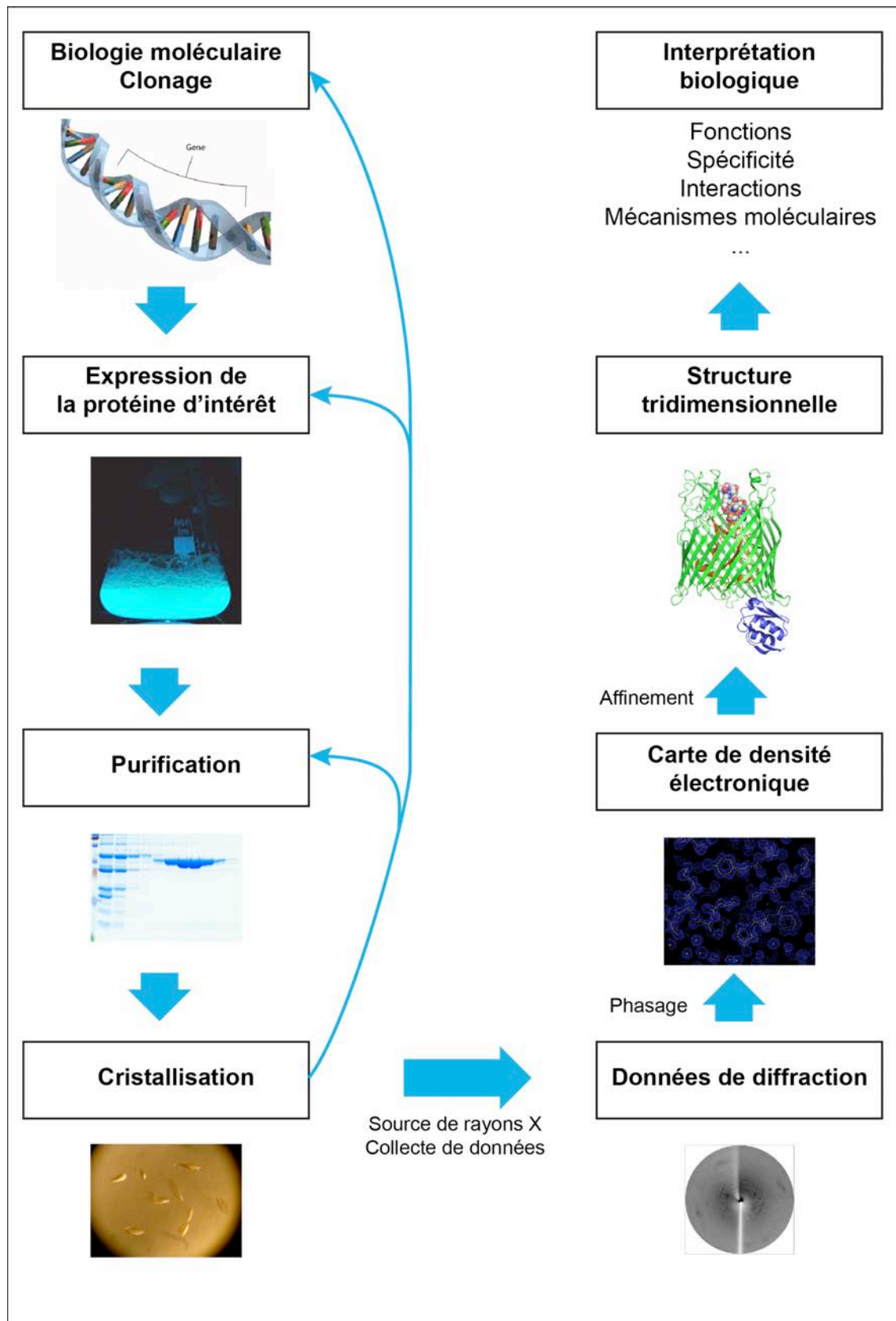


Figure 2 : Schéma des différentes étapes des projets de biologie structurale : du gène à la fonction

La cristallogenèse est un compromis entre théorie, expériences et criblages extensifs de conditions de cristallisation. Un des objectifs de ce travail était donc de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les procédés de bioproduction et de cristallogenèse de protéines membranaires.

Les bactéries Gram-négatives se caractérisent par une structure à deux membranes, interne et externe, séparées par un espace périplasmique. La membrane interne est constituée d'une bicouche de phospholipides traversée par des protéines dont la partie transmembranaire est organisée en hélice α (transporteurs ABC, cytochromes etc...). La membrane externe est asymétrique et majoritairement composée de lipopolysaccharides au niveau de la face extracellulaire. Les protéines de la membrane externe permettent des échanges avec le milieu extérieur grâce à différents types de canaux, spécifiques ou non. Ces protéines sont généralement structurées en tonneau β . Au travers des projets présentés dans ce manuscrit, nous avons tout d'abord souhaité obtenir des informations sur les mécanismes moléculaires d'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives.

2 Le fer et les micro-organismes

2.1 Le fer

Le fer est le quatrième élément le plus important de la croûte terrestre (4,7%, en masse) après l'oxygène (49,5%), le silicium (25,8%) et l'aluminium (7,8%). Dans l'environnement, la majeure partie du fer est combinée à de l'oxygène sous forme d'hydroxyde de fer (minerais, comme les hématites ou les goethites) ou sous forme d'alliages peu biodisponible.

En biologie, le fer a un rôle clé dans divers processus métaboliques comme la synthèse des acides nucléiques (Dougherty & Downs, 2006 ; Drakesmith & Prentice, 2008), la photosynthèse (Okamura *et al.*, 1975), la phosphorylation oxydative (Schafer *et al.*, 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou le transfert d'électrons (McHugh *et al.*, 2003 ; Andrews *et al.*, 2003 ; Wandersman & Delepelaire 2004 ; Pra *et al.*, 2012). Hormis quelques souches de *Lactobacilli* (Imbert *et al.*, 1998), des agents de la syphilis *Trepanoma pallidum* (Posey *et al.*, 1999), et des agents de la maladie de Lyme *Borrelia burgdorferi*

(Posey & Gherardini, 2000), tous les autres micro-organismes et organismes vivants ont besoin de fer pour leur développement.

Comme pour les autres nutriments, les micro-organismes doivent transporter le fer dans le cytoplasme. Au cours de l'évolution, les bactéries ont donc développé des systèmes capables d'extraire le fer à partir de différentes sources et de le transporter au travers des membranes. La surcharge en fer ou en hème étant toxique pour la bactérie, les systèmes de transport et d'utilisation du fer doivent être finement régulés.

2.2 Biodisponibilité du fer

Le fer est essentiel à la vie et malgré son abondance, il est très peu biodisponible. Dans l'environnement, le fer est retrouvé sous deux formes majoritaires : Fe^{2+} qui est la forme réduite ferreuse et Fe^{3+} qui est la forme oxydée ferrique. Grâce à sa configuration électronique le fer ferrique est plus stable que le fer ferreux. A pH physiologique, le fer ferrique est insoluble et précipite sous forme d'hydroxydes de fer insolubles. En milieu saturé en oxygène et à pH neutre, le fer ferreux est très réactif, instable et potentiellement toxique. En effet, il est rapidement oxydé *via* la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$. Cette réaction libère un radical hydroxyle qui est le deuxième oxydant le plus puissant dans la nature (Wardman & Candeias, 1996 ; Fenton, 1876). Ces radicaux peuvent endommager et altérer les membranes en dégradant les lipides, inactiver différentes protéines ou induire des lésions au niveau de l'ADN (Smith, 2004). Dans la cellule, la protection contre ces effets passent par la séquestration du métal au sein de différentes protéines.

De manière générale, les mammifères acquièrent le fer par leur alimentation. Dans ces systèmes biologiques, la majorité du fer est sous forme hémunique : plus de 95 % du fer est intracellulaire et lié à des hémoprotéines. Le fer ou l'hème libre, qui ne sont pas tolérés par l'organisme, sont pris en charge par diverses protéines circulantes. Quel que soit leur environnement les bactéries pathogènes doivent faire face à une faible accessibilité au fer. Cet élément étant indispensable à leur développement, les bactéries se procurent le fer au détriment de leur hôte. A pH 7, en conditions aérobies, la concentration du fer ferrique libre est d'environ 10^{-9} M (Ratledge & Dover, 2000). Chez l'hôte que les bactéries colonisent, cette

concentration est de l'ordre de 10^{-18} M (Neilands, 1981) alors que la concentration optimale pour la croissance bactérienne est de 10^{-6} M (Bullen, 1981 ; Ferguson & Deisenhofer, 2004). Afin de pallier à la faible disponibilité du fer chez les hôtes qu'ils colonisent, les micro-organismes ont développés des stratégies pour l'acquisition du fer. La méthode la plus développée chez les bactéries, correspond à la production et à l'utilisation de chélateurs capables de capter et de solubiliser le Fe^{3+} (Guerinot, 1994 ; Guerinot & Yi, 1994b ; Neilands, 1995). Parmi ces chélateurs, on trouve les sidérophores et les hémophores (Neilands, 1995 ; Cescau *et al.*, 2007).

L'homéostasie du fer chez les bactéries est finement régulée car une surcharge en fer est toxique (Storz & Imlay, 1999). La plupart des gènes impliqués dans l'assimilation du fer sont exprimés en conditions de carence en fer (Hantke, 2001). Inversement, lorsque la concentration intracellulaire en fer augmente, ces gènes sont réprimés. Dans la cellule, il existe des protéines de stockage (ferritine, bactérioferritine...) permettant de mettre le fer en réserve sous une forme facilement disponible, mais non dommageable pour la cellule (Andrews, 1998).

2.3 Les sources de fer pour les micro-organismes durant l'infection

Chez l'hôte colonisé, la multiplication d'une bactérie pathogène est un facteur essentiel à l'infection et à son maintien. Quel que soit l'environnement dans lequel se développent les bactéries, la concentration en fer est généralement faible et limitante. Le niveau de fer est un facteur déterminant pour la synthèse d'éléments de virulence. Pour faire face à cette carence la plupart des bactéries ont développé des systèmes élaborés pour acquérir le fer à partir de différentes sources.

Lors de l'infection d'un hôte mammifère, le fer est peu biodisponible. Chez l'homme notamment, 99,9% du fer est intracellulaire et non disponible pour le pathogène bactérien. Il est généralement complexé au sein de macromolécules biologiques. Le fer extracellulaire présent dans le plasma ou la lymphe est lié à la transferrine. Une faible quantité d'hémoglobine issue d'une hémolyse spontanée est retrouvée dans le plasma, cette hémoglobine plasmatique est liée à l'haptoglobine. L'albumine et l'hémopexine plasmatique lient l'hème pour le rediriger vers le foie. En revanche, les muqueuses contiennent du fer en complexe avec la lactoferrine ainsi que de l'hème libre.

En résumé, les fluides de l'hôte contiennent du fer ou de l'hème en quantités suffisantes pour la croissance bactérienne et le processus infectieux. Les micro-organismes ont donc développé différents systèmes d'acquisition du fer permettant d'extraire et de transporter le fer ou l'hème en complexe avec des protéines synthétisées par l'hôte (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). On distingue deux types de mécanismes d'acquisition : (i) le premier implique un contact direct entre la bactérie et les sources exogènes de fer ou d'hème (hémoglobine, transferrine...), (ii) le second implique des molécules synthétisées et excrétées par la bactérie dans le milieu extracellulaire (sidérophores, hémophores).

2.3.1 Les différentes sources de fer chez l'hôte

2.3.1.1 Le fer libre

En conditions aérobies et à pH neutre, la forme majeure du fer est le fer ferrique Fe^{3+} qui précipite et n'est donc pas directement assimilable. En revanche, en conditions anaérobies le fer est sous sa forme réduite Fe^{2+} , plus soluble, qui peut diffuser directement dans les bactéries *via* des porines de la membrane externe. Le fer ferreux peut alors être transporté vers le cytoplasme par un transporteur FeoABC, très conservé chez certaines espèces (Kammler *et al.*, 1993), comme *Salmonella enterica* et *Helicobacter pylori* qui sont des pathogènes colonisant l'intestin et l'estomac des mammifères. Au sein de ces organes, les conditions permettent au fer d'être disponible sous forme ferreuse. L'acquisition du fer par le système *feo* est essentielle pour le développement de ces bactéries pathogènes (Wandersman & Delepelaire, 2004).

2.3.1.2 La lactoferrine et la transferrine

Ces deux glycoprotéines ont une très haute affinité pour le Fe^{3+} ($K_a \approx 10^{20} \text{ M}^{-1}$) et beaucoup plus faible pour le Fe^{2+} ($K_a \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$). La transferrine (Tf) est présente dans le sérum, tandis que la lactoferrine (Lf) est présente dans la lymphe et dans les sécrétions des muqueuses (Aisen *et al.*, 1978). La Tf et la Lf possède à la fois une implication dans le transport du fer et une fonction protectrice contre sa toxicité, en tant que chélateur du fer libre (Beddek & Schryvers, 2010 ; Baker & Baker, 2012). Ces deux glycoprotéines d'environ 80 kDa possèdent approximativement 60%

d'homologie de séquence et présentent des structures tridimensionnelles homologues.

La lactoferrine et la transferrine sont formées de deux lobes (N et C) connectés par un court peptide de liaison. Chacun des lobes peut être divisé en deux sous-domaines (N1, N2 et C1, C2) qui forment une fente dans laquelle le fer vient se lier (**Figure 3**) (Wally & Buchanan, 2007 ; Vogel, 2012). La Lf et la Tf peuvent agir comme des protéines bactériostatiques en privant les bactéries du fer indispensable à leur développement. La lactoferrine a la particularité de pouvoir retenir le fer à des pH très bas (Aisen & Leibman, 1972). De nombreuses espèces bactériennes, comme *Neisseriaceae*, *Pasteurellaceae* et *Moraxellaceae*, possèdent des systèmes d'acquisition permettant d'extraire le fer de ces deux protéines. Ces systèmes impliquent les transporteurs TonB-dépendants des systèmes *tbp* et *lbp*, au niveau de la membrane externe (Cornelissen, 2003 ; Faraldo-Gomez & Sansom, 2003 ; Noinaj *et al.*, 2012a ; Noinaj *et al.*, 2012b). Ce mécanisme de transport est développé dans le Chapitre 4.4.

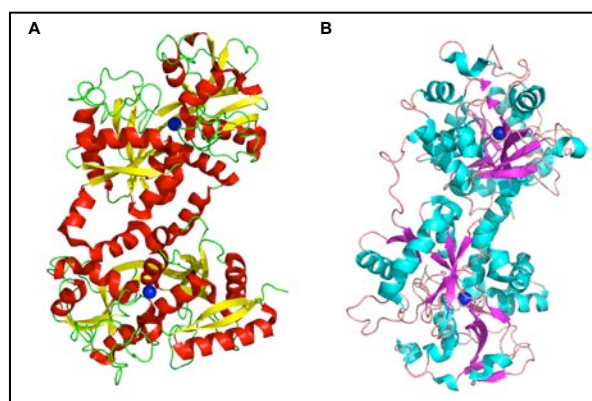


Figure 3 : Représentation des structures de la lactoferrine et de la transferrine liées au fer

Structure de la lactoferrine humaine liée au fer (A) (PDB 1LFG), et de la transferrine humaine liée au fer (B) (PDB 3QYT). Le fer est représenté en sphère de van der Waals (bleu).

2.3.1.3 Les ferritines

Les ferritines sont des protéines de stockage du fer présentes chez l'ensemble des organismes vivants (Laghaei *et al.*, 2013). Les ferritines isolées à partir de bactéries peuvent également contenir de l'hème et sont nommées bactérioferritines. Leur rôle principal est de fournir la quantité de fer nécessaire à la cellule, c'est à dire une concentration de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} M. Lorsque la concentration en fer est trop élevée, la ferritine a également un rôle protecteur antioxydant. Dans ce cas, elle maintient le fer à l'intérieur de sa cavité, à l'écart de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène. Cette séquestration prévient alors la formation de radicaux hydroxyles.

Les ferritines et les bactioferritines possèdent la même architecture : il s'agit d'un assemblage sphérique de 24 sous-unités ayant un diamètre global d'environ 120 Å (Banyard *et al.*, 1978). La cavité de stockage du fer a un diamètre de 80 Å et peut séquestrer jusqu'à 4 500 atomes de fer (Laghaei *et al.*, 2013 ; Carrondo, 2003) (**Figure 4**). Chez les vertébrés, la ferritine est composée de deux types de chaînes appelées H (Heavy) et L (Light) alors que seule la chaîne H est présente chez les bactioferritines (Laghaei *et al.*, 2013). Chaque sous-unité d'environ 20 kDa est composée de quatre hélices α et d'une petite hélice en C-terminal, l'ensemble étant associé sous forme de dimères. A l'heure actuelle, il est établi que l'incorporation du fer par les (bactério)ferritines implique une étape d'oxydation du fer au niveau du centre ferroxidase (Pereira *et al.*, 1998). Ce mécanisme implique trois phases (i) liaison du Fe^{2+} au niveau du centre ferroxidase, (ii) oxydation du Fe^{2+} au niveau de ce centre puis (iii) transfert du Fe^{3+} au centre de la ferritine.

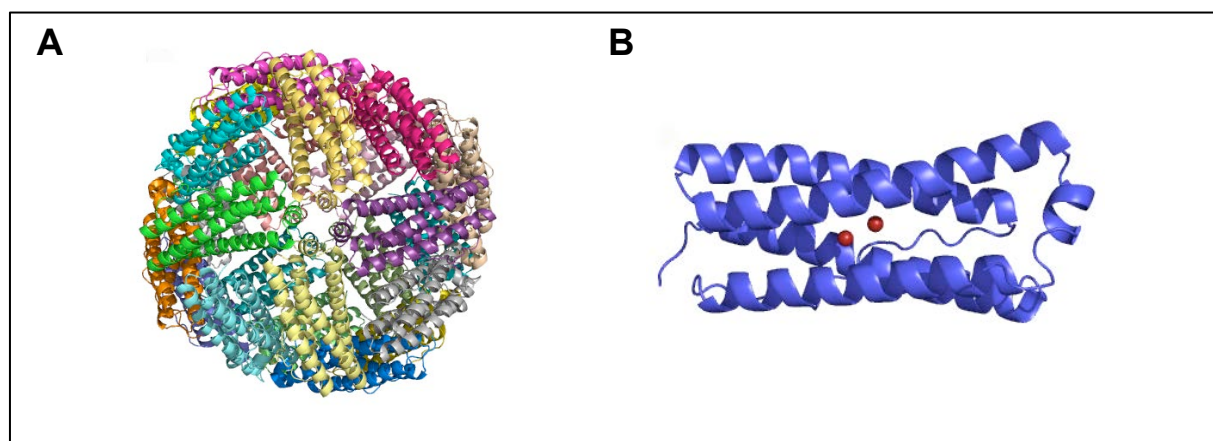


Figure 4 : Représentation de la structure de la bactioferritine d'*Escherichia coli*

Représentation de la structure de la bactioferritine d'*E. coli* (A) et d'une chaîne H (B), les sphères de van der Waals en rouge représentent des ions Mn^{2+} au niveau du centre ferroxidase (PDB 1BFR).

Il existe très peu d'études montrant que la ferritine peut être utilisée comme source de fer par les bactéries, excepté chez *Listeria monocytogenes* qui possède une réductase spécifique (Deneer *et al.*, 1995) et chez *Pseudomonas aeruginosa* (Rui *et al.*, 2012). Chez *Pasteurella multocida* la ferritine induit des changements au niveau de l'expression génique (Paustian *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que la ferritine pourrait être une source de fer pour ces micro-organismes.

2.3.1.4 *Le dicitrate ferrique.*

Le citrate est produit par la citrate synthase au cours de la première étape du cycle de Krebs. Sous forme de dimère, le citrate est un chélateur puissant notamment pour l'ion ferrique. Ce citrate ferrique peut alors être transporté par des systèmes spécifiques comme *fecABCDE* (Pramanik *et al.*, 2011), identifiés chez *E. coli* (Pressler *et al.*, 1988), *Cronobacter sakazakii* ou *Cronobacter malonaticus* (Grim *et al.*, 2012).

2.3.2 *Les différentes sources d'hème*

L'hème est une molécule de 616 Da qui associe une protoporphyrine de type IX et un atome de Fe^{2+} (**Figure 5**). L'hème constitue le groupement prosthétique d'hémoprotéines impliquées dans différents processus métaboliques. La synthèse de l'hème à partir de glycine et de succinyl-CoA s'effectue principalement dans les tissus érythropoïétique et dans le foie. Elle implique huit enzymes au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie. Chez les mammifères, 95% de l'hème se trouve dans l'hémoglobine des érythrocytes. L'hème au travers de l'hémoglobine et de la myoglobine est responsable du transport et du stockage de l'oxygène. Comme le fer lui-même, l'hème est cytotoxique, c'est pourquoi il est rarement retrouvé à l'état libre mais plutôt stocké dans des hémoprotéines (Krewulak & Vogel, 2008 ; Anzaldi & Skaar, 2010). La plupart des bactéries Gram-négatives et Gram-positives ont développées des systèmes pour acquérir l'hème des hôtes qu'elles colonisent. Cependant, ces bactéries sont elles-mêmes capables de le synthétiser (Anzaldi & Skaar, 2010).

En condition de carence en fer, les micro-organismes doivent utiliser les sources de fer de leur environnement. Ainsi lors de l'infection d'un hôte, l'hème constitue pour les bactéries une des principales sources de fer (Wandersman & Stoljilkovic, 2000). L'hème est également une source de protoporphyrine pour des souches comme *Lactococcus lactis*, *Haemophilus influenzae* et *Enterococcus faecalis*, incapables de synthétiser des groupement tétrapyrrole (Wandersman & Delepelaire, 2004). Ces mécanismes d'acquisition impliquent des transporteurs d'hème ou d'hémophores. En parallèle, des dispositifs de détoxification, *via* un système d'export de l'hème et des protoporphyrines, mettent en jeu des pompes à efflux (Perkins-Balding *et al.*, 2004 ; Anzaldi & Skaar, 2010).

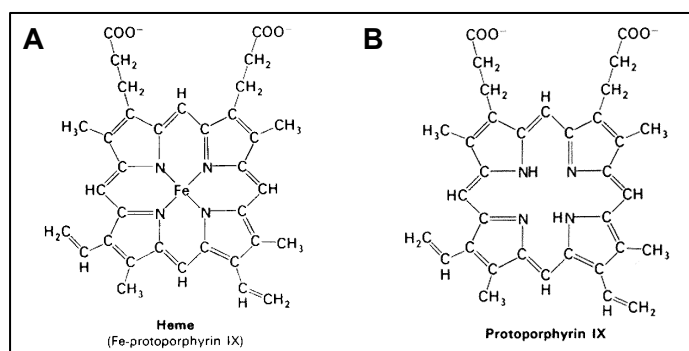


Figure 5 : Représentation de l'hème et de la protoporphyrine

L'hème (**A**) correspond à l'association d'une protoporphyrine de type IX (**B**) et d'un atome de fer (II). Cet atome de fer est lié par les 4 noyaux tétrapyrroles de la protoporphyrine.

2.3.2.1 L'hémopexine

L'hémopexine est une glycoprotéine plasmatique de 60 kDa composée de deux domaines similaires organisés en feuillets β où, à l'interface, deux histidines permettent la fixation d'une molécule d'hème (Paoli *et al.*, 1999) (**Figure 6**). Lorsque l'hème est dissocié de l'hémoglobine lors de la lyse des érythrocytes, l'hème libre est directement capté par l'hémopexine. Cette glycoprotéine a une affinité de 10^{-13} M pour l'hème. Elle est l'une des hémoprotéines majeures dans le plasma, qui permet de prévenir le stress oxydatif issu du relargage d'hème libre. Le complexe hème-hémopexine est ensuite redirigé vers le foie (Tong & Guo, 2009). Certaines bactéries comme *Haemophilus influenzae* sont capables d'utiliser l'hème de ce complexe grâce à un hémophore spécifique du système *hxu*.

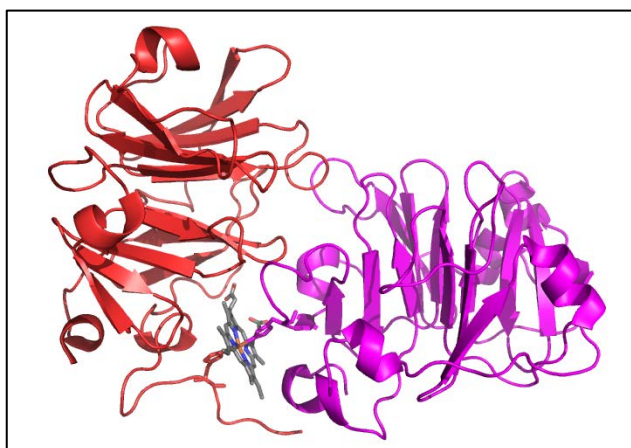


Figure 6 : Représentation du complexe hème-hémopexine

L'hémopexine est composée de deux domaines (rouge et magenta), organisés en feuillets β , et fixe une molécule d'hème (gris) à l'interface, grâce à deux histidines représentées sous forme de bâtonnets (PDB 1QJS).

2.3.2.2 L'hémoglobine

Au sein des globules rouges, l'hémoglobine a un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et dans le retour du CO₂ des tissus aux poumons. C'est un tétramère de 80 kDa composé de deux chaînes α de 141 acides aminés et de deux chaînes β de 146 acides aminés (**Figure 7**). Chaque sous-unité est capable de lier une molécule d'hème. Le fer de l'hème est penta-coordiné par les 4 azotes de l'anneau porphyrinique et une histidine de la chaîne α ou β , formant un site liaison pour l'O₂. Dans l'organisme, l'hémoglobine est présente sous différentes formes : la méthémoglobine (hème-Fe³⁺), la déoxyhémoglobine (hème-Fe²⁺) et l'oxyhémoglobine (hème-Fe²⁺-O₂). L'affinité de l'hémoglobine pour l'hème est de l'ordre de 10⁻¹⁵ M (Genco & Dixon, 2001).

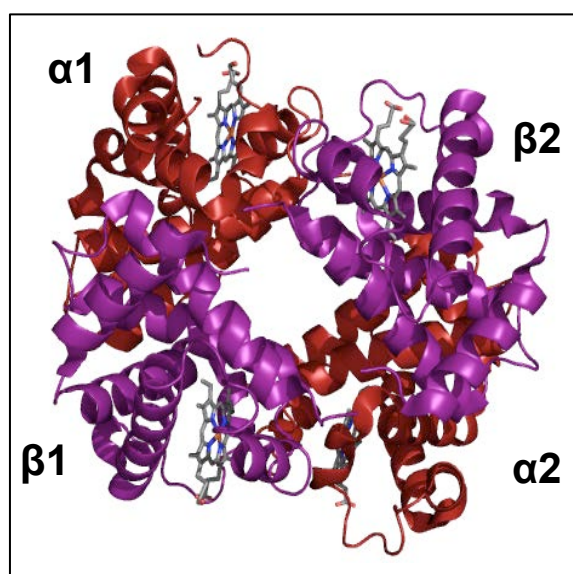


Figure 7 : Représentation de la déoxyhémoglobine humaine

L'hémoglobine est composée de deux globines α (1 et 2) et de deux globines β (1 et 2), chacune liant une molécule d'hème (gris) (PDB 4HHB).

2.3.2.3 L'haptoglobine

L'haptoglobine est une glycoprotéine de 86 kDa qui s'assemble sous forme de dimère et que l'on retrouve dans le sérum. Sa structure a été résolue très récemment (Andersen *et al.*, 2012). Elle est composée de deux chaînes α et de deux chaînes β reliées entre elles par des ponts disulfures à l'interface de feuillets β . Lors de la lyse des érythrocytes, l'haptoglobine lie l'hémoglobine libérée avec une affinité de 10⁻¹² M. Chacune des chaînes de l'haptoglobine lie un dimère $\alpha\beta$ d'hémoglobine (**Figure 8**). Toutes les bactéries pathogènes ne sont pas capables d'utiliser ce complexe.

Cependant, elle est une source de fer pour des souches comme *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ou *Porphyromonas gingivalis* qui possèdent des transporteurs spécifiques de ce complexe (Tong & Guo, 2009).

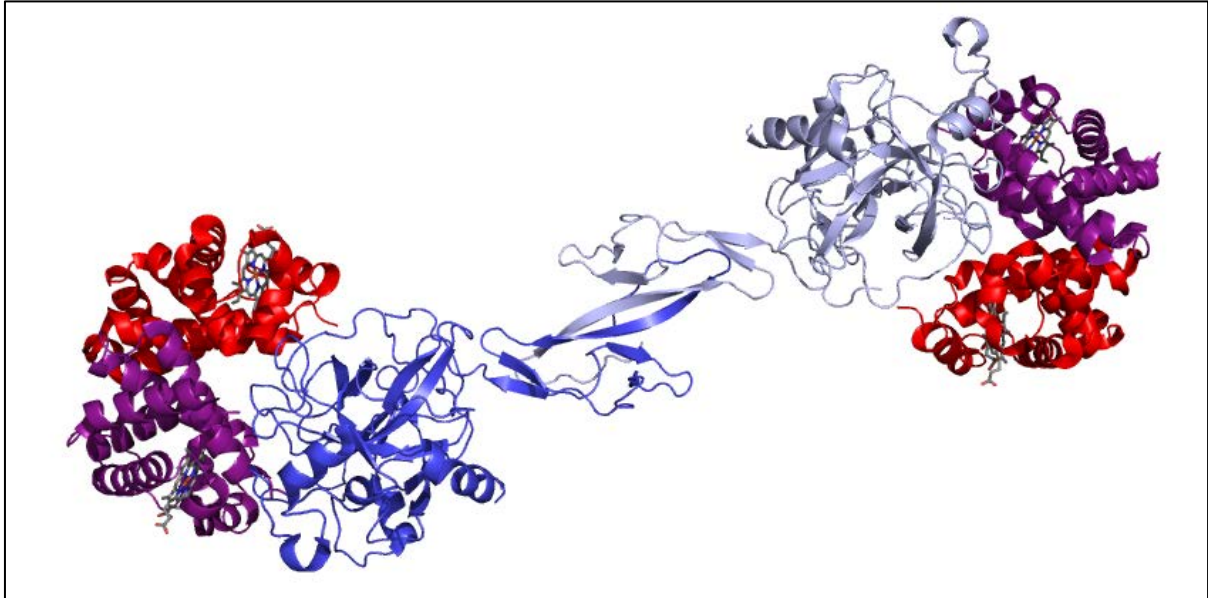


Figure 8 : Représentation de la structure du complexe haptoglobine-hémoglobine

Structure du complexe haptoglobine-hémoglobine. Les monomères de l'haptoglobine sont représentés en bleu foncé et bleu pâle et sont reliés entre eux par deux ponts disulfures impliquant des cystéines des feuillets β . Les chaînes α et β de l'hémoglobine sont respectivement représentées en violet et rouge (PDB 4F4O).

2.3.2.4 L'albumine

L'albumine est une protéine globulaire monomérique de 68 kDa. Cette protéine est la plus abondante du sérum (60 % des protéines) et possède une affinité de 10^{-8} M pour l'hème (Hrkal *et al.*, 1974). L'albumine est composée de trois domaines homologues, chacun capable de lier une molécule d'hème. Ces trois domaines possèdent des affinités différentes, cependant, il a été montré que le premier domaine a une affinité plus importante (Dockal *et al.*, 1999 ; Zunszain *et al.*, 2003) (**Figure 9**).

L'albumine est une source importante d'hème. Excepté pour des souches comme *Streptococcus equisimilis* et *Streptococcus dysgalactiae* (Wideback & Kronvall, 1982) où aucun récepteur spécifique de l'albumine n'a été identifié. Cependant comme l'affinité de l'albumine pour l'hème est proche de celle des récepteurs d'hème à la surface des bactéries, il est très probable qu'un échange par

transfert passif s'effectue entre l'albumine et un récepteur de l'hème (Wandersman & Delepelaire, 2004).



Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'albumine humaine liant l'hème

Représentation de l'albumine sérique humaine, liée à une molécule d'hème (gris) sur le domaine I, qui présente la plus forte affinité (PDB 1O9X).

2.3.2.5 Les hémoprotéines

Chez les végétaux et chez les mammifères, il existe beaucoup d'autres types d'hémoprotéines comme la catalase, le cytochrome b, la myoglobine ou la leghémoglobine. Cependant les bactéries n'ont pas développé de système spécifique pour capter la molécule d'hème à partir de ces hémoprotéines. Comme pour l'albumine, il est probable que l'hème soit reconnu et qu'un transfert passif s'effectue vers un récepteur spécifique. Chez *Porphyromonas gingivalis* des protéases extracellulaires sont exprimées en conditions de carence en fer. Elles sont capables de dégrader les hémoprotéines afin de libérer la molécule d'hème (O'Brien-Simpson *et al.*, 2003).

3 Les transporteurs TonB-dépendants

Le transport actif de l'hème, des complexes hémophores-hème, des complexes sidérophores-fer et de certains composés comme la vitamine-B₁₂ est assuré par une classe de protéines membranaires : les transporteurs TonB-dépendants (Ferguson & Deisenhofer, 2002b). Ces transporteurs TonB-dépendants (TBDT) présentent des caractéristiques fonctionnelles et structurales très proches (Krewulak & Vogel, 2008 ; Noinaj *et al.*, 2010). De manière générale, les TBDT sont spécifiques d'un ligand pour lequel ils présentent une forte affinité, de l'ordre du nanomolaire (Clement *et al.*,

2004 ; Schalk *et al.*, 2001). A partir de l'analyse de 686 génomes bactériens, 4 600 TBDT ont été identifiés dans 347 espèces (Mirus *et al.*, 2009). Dans la littérature, on retrouve 98 TBDT qui ont été caractérisés avec leur substrat respectif. Les TBDT ne sont pas uniquement impliqués dans le transport du fer, ils sont également impliqués dans le transport de différents composés (maltose, saccharose, vitamine-B₁₂ etc...) (Schauer *et al.*, 2008) et d'une grande diversité de métaux (Braud *et al.*, 2009). Les TBDT peuvent également transporter des antibiotiques ou des analogues synthétiques (Noel *et al.*, 2011 ; Ferguson & Deisenhofer, 2002b ; Ferguson *et al.*, 2001). La virulence des bactéries Gram-négatives est corrélée à l'expression de ces TBDT. Ces transporteurs représentent des cibles de choix pour l'élaboration de nouvelles générations d'antibiotiques. Les données structurales de ces transporteurs représentent un apport précieux pour les chimistes organiciens. Afin d'élucider l'ensemble du mécanisme moléculaire du transport du fer, il est également nécessaire de connaître les partenaires d'interactions de ces TBDT.

3.1 Caractéristiques des transporteurs TonB-dépendants

Les premières structures tridimensionnelles de TBDT ont été résolues en 1998-1999 : deux structures du transporteur du ferrichrome FhuA et une structure du transporteur de la ferri-entérobactine FepA, TBDT chez *Escherichia coli*. Aujourd'hui, 13 structures de TBDT provenant de différentes souches bactériennes ont été résolues par cristallographie : vides, en complexe avec leurs ligands, ou avec des molécules utilisées lors de la cristallisation (détergents, ions, atomes lourds etc...). L'ensemble de ces données représente un total de près de 50 structures que l'on peut comparer (**Tableau 1**). La dernière structure parue est celle de TbpA de *Neisseria meningitidis* capable de lier la transferrine humaine (Noinaj *et al.*, 2012). Malgré une identité de séquence relativement faible (11 à 32%, **Tableau 1**) ainsi qu'une spécificité importante pour leurs ligands, ces structures tridimensionnelles nous montrent que tous les TBDT sont formés des mêmes domaines. On trouve en premier lieu une séquence signal au niveau de l'extrémité N-terminale, suivie dans certains cas d'un domaine de signalisation, puis un domaine bouchon et un tonneau β dans la partie C-terminale (**Figure 10C**). La séquence signal est une séquence d'approximativement 30 acides aminés qui permet un adressage correct des protéines, c'est-à-dire au delà de la membrane interne. Le

TBDT est ensuite inséré au niveau de la membrane externe après maturation de la protéine et clivage de la séquence signal.

Parmi les TBDT identifiés, on distingue deux groupes majeurs. Les membres du premier groupe sont composés uniquement de deux domaines : un tonneau β et un domaine bouchon (**Figure 10B**). Le second groupe possède une extension N-terminale qui est un domaine périplasmique supplémentaire (**Figure 10A**). Ce domaine joue un rôle important dans la cascade de signalisation qui permet la régulation de l'expression des protéines de transport du fer et de la voie de biosynthèse de sidérophores (Braun & Braun, 2002). Chez des pathogènes végétaux comme *Myxococcus xanthus* et *Xanthomonas* spp, un domaine additionnel Oar a été décrit dont le rôle n'est pas encore identifié (Koebnik, 2005).

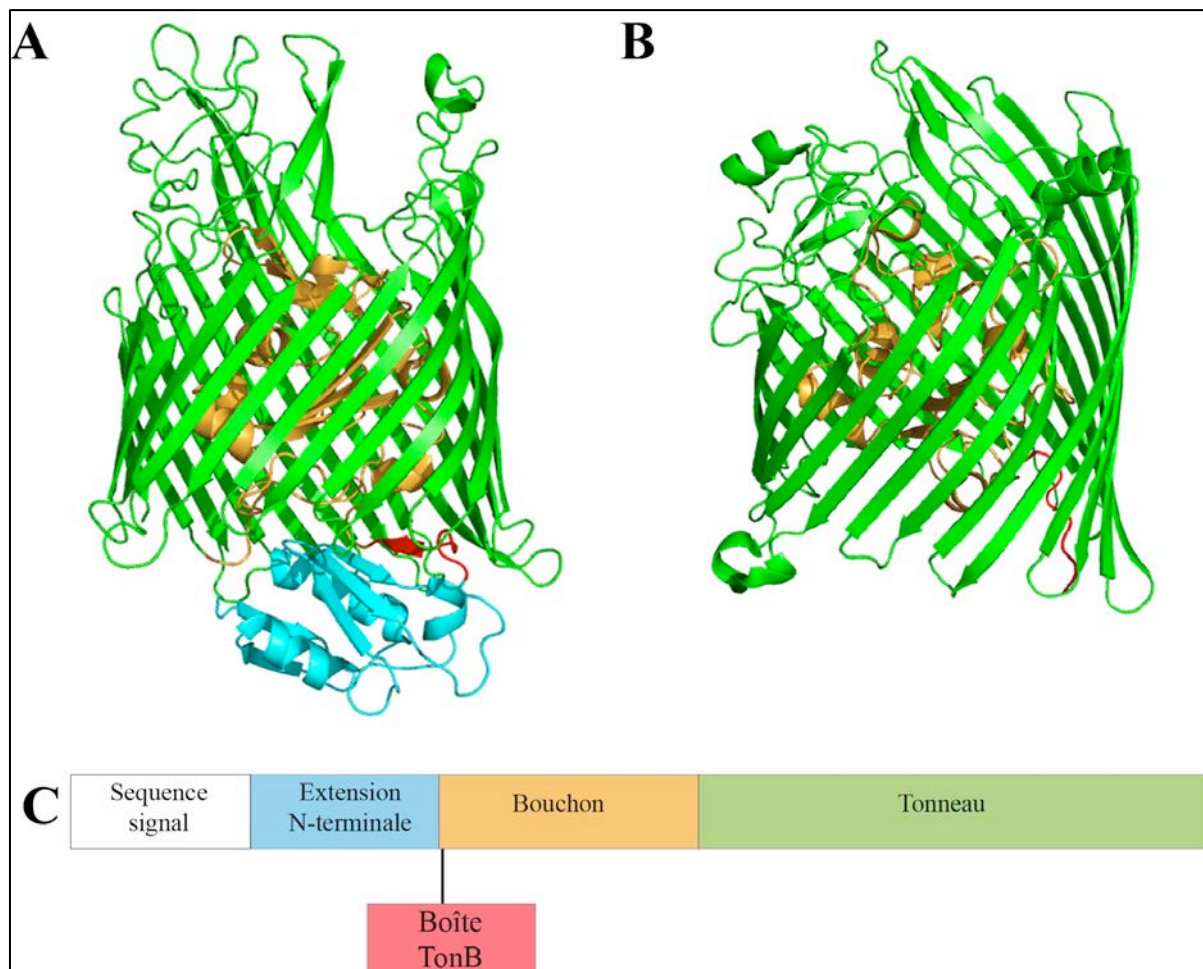


Figure 10 : Représentation des structures primaire et tridimensionnelle des TBDT

Représentation de la structure tridimensionnelle des TBDT : FpvA (**A**) qui comporte un domaine de signalisation en bleu (PDB 2OP5) et FecA (**B**) qui ne possède pas d'extension N-terminale (PDB 1KMO). Représentation schématique de la structure primaire des TBDT (**C**).

Nom	Id séq (%)	Organisme	Résolution (Å)	Ligand	Référence	ID PDB
BtuB	17	<i>E. coli</i>	2,00	-	(Chimento <i>et al.</i> , 2003)	1NQE
			2,70	-	(Chimento <i>et al.</i> , 2003)	1NQF
			1,95	-	(Cherezov <i>et al.</i> , 2006)	2GUF
			3,31	Calcium	(Chimento <i>et al.</i> , 2003)	1NQG
			3,10	Calcium/vit-B ₁₂	(Chimento <i>et al.</i> , 2003)	1NQH
			2,10	TonB/vit-B ₁₂	(Shultis <i>et al.</i> , 2006)	2GSK
			2,75	Colicine E3	(Kurusu <i>et al.</i> , 2003)	1UJW
			3,50	Colicine E2	(Sharma <i>et al.</i> , 2007)	2YSU
			2,44	Calcium/vit-B ₁₂	(Freed <i>et al.</i> , 2010)	3M8D
			2,44	-	(Freed <i>et al.</i> , 2010)	3M8B
Cir	12	<i>E. coli</i>	2,65	-	(Buchanan <i>et al.</i> , 2007)	2HDF
			2,50	Colicine I	(Buchanan <i>et al.</i> , 2007)	2HDI
FauA*	17	<i>B. pertussis</i>	2,33	-	(Brillet <i>et al.</i> , 2009a)*	3EFM
FecA	14	<i>E. coli</i>	2,00	-	(Ferguson <i>et al.</i> , 2002a)	1KMO
			2,50	-	(Yue <i>et al.</i> , 2003)	1PNZ
			2,50	Dicitrate-Fer	(Ferguson <i>et al.</i> , 2002a)	1KMP
			2,15	Dicitrate	(Yue <i>et al.</i> , 2003)	1PO0
			3,40	Dicitrate-Fer	(Yue <i>et al.</i> , 2003)	1PO3
FepA	11	<i>E. coli</i>	2,40	-	(Buchanan <i>et al.</i> , 1999)	1FEP
FetA*	32	<i>P. fluorescens</i>	3,26	Enantiopyochéline-Fer	(Brillet <i>et al.</i> , 2011)*	3QLB
FhuA	100	<i>E. coli</i>	2,74	-	(Locher <i>et al.</i> , 1998)	1BY3
			2,60	Ferrichrome	(Locher <i>et al.</i> , 1998)	1BY5
			2,70	Ferrichrome/LPS	(Ferguson <i>et al.</i> , 1998)	1FCP
			2,50	LPS	(Ferguson <i>et al.</i> , 1998)	2FCP
			2,90	CGP 4832/LPS	(Ferguson <i>et al.</i> , 2001)	1F11
			3,30	TonB/Ferricrocine	(Pawelek <i>et al.</i> , 2006)	2GRX
			2,70	Ferrichrome	(Ferguson <i>et al.</i> , 2000a)	1QFF
			2,50	LPS	(Ferguson <i>et al.</i> , 2000a)	1QFG
			2,95	Phenylferricrocine	(Ferguson <i>et al.</i> , 2000b)	1QJQ
			3,10	Albomycine	(Ferguson <i>et al.</i> , 2000b)	1QKC
FptA	17	<i>P. aeruginosa</i>	2,00	Pyochéline	(Cobessi <i>et al.</i> , 2005a)	1XKW
FpvA*	17	<i>P. aeruginosa</i>	2,77	-	(Brillet <i>et al.</i> , 2007)*	2OP5
			2,90	-	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W75
			2,71	Pyoverdine	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W16
			2,90	Pyoverdine _{DSM50106}	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W6T
			3,00	Pyoverdine _{G173}	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W6U
			2,73	Pyoverdine-Fer	(Wirth <i>et al.</i> , 2007)	2IAH
			2,80	Pyoverdine _{Pa6}	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W76
			2,90	Pyoverdine _{Pf118.1}	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W77
			3,00	Pyoverdine _{ATCC13535}	(Greenwald <i>et al.</i> , 2009)	2W78
			3,60	Pyoverdine	(Cobessi <i>et al.</i> , 2005b)	1XKH
FrpB	12	<i>N. meningitidis</i>	2,40	-	(Saleem <i>et al.</i> , 2012)	-
FyuA	14	<i>Y. pestis</i>	3,20	Yersiniabactine-Fer	(Lukacik <i>et al.</i> , 2012a)	4EPA
HasR	14	<i>S. marescens</i>	2,70	HasA-hème	(Krieg <i>et al.</i> , 2009)	3CSL
			3,00	HasA	(Krieg <i>et al.</i> , 2009)	3CSN
			2,80	HasA-Hème	(Krieg <i>et al.</i> , 2009)	3DDR
ShuA*	16	<i>S. dysenteriae</i>	2,60	-	(Cobessi <i>et al.</i> , 2010)*	3FHH
TbpA	12	<i>N. meningitidis</i>	2,60	Transferrine humaine	(Noinaj <i>et al.</i> , 2012a)	3V8X
YiuR	15	<i>Y. pestis</i>	2,65	-	(Noinaj <i>et al.</i> , 2010)	-

Tableau 1 : Structures connues de transporteurs TonB-dépendants

Tableau résumant les différentes structures de TBDT, connues à ce jour. Les identités de séquences (Id séq) ont été déterminées par rapport à la séquence du transporteur FhuA (PDB 1BY3) en utilisant CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1996). Les structures des TBDT annotées avec une * ont été résolues pendant ce projet et seront présentées dans la Partie II « Résultats scientifiques ». Abréviations : LPS (lipopolysaccharide), CGP 4832 (dérivé synthétique de la rifamycine), *E. coli* (*Escherichia coli*), *B. pertussis* (*Bordetella pertussis*), *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*), *P. fluorescens* (*Pseudomonas fluorescens*), *N. meningitidis* (*Neisseria meningitidis*), *Y. pestis* (*Yersinia pestis*), *S. marescens* (*Serratia marescens*), *S. dysenteriae* (*Shigella dysenteriae*).

3.1.1 Le domaine tonneau β

En C-terminal, les TBDT sont composés d'un tonneau β (**Figure 10**) ancré dans la membrane externe qu'il traverse de part en part. Le tonneau est en contact direct avec les lipides de la membrane. Ce domaine se termine par un résidu aromatique de type Trp ou Phe, caractéristique des protéines de la membrane externe et nécessaire à leur bonne localisation (Struyve *et al.*, 1991). La hauteur du tonneau peut atteindre 70 Å (FepA) et le diamètre du pore varie de 30 à 40 Å (Chimento *et al.*, 2005). Ce domaine est constitué de 22 brins β antiparallèles qui sont orientés à 45° par rapport à l'axe du pore. Ces brins sont reliés entre eux par 11 longues boucles extracellulaires et 10 coudes courts périplasmiques (Ferguson & Deisenhofer, 2002b). La nature des acides aminés des coudes périplasmiques est relativement conservée et leur nombre limité (3 à 10 résidus). À l'inverse la taille des boucles extracellulaires varie de 3 à 37 résidus et leur composition en acides aminés est très variée. Ainsi ces grandes boucles, qui peuvent dépasser la membrane sur une hauteur allant jusqu'à 30 Å, ont un rôle clé dans la reconnaissance et la liaison du ligand (Krewulak & Vogel, 2008 ; Schalk *et al.*, 2009). Les alignements de séquence de 12 transporteurs montrent une conservation importante de certains résidus dans les brins β . Plusieurs brins possèdent un ou plusieurs résidus conservés notamment deux résidus Glu des brins β 14 et β 16 impliqués dans les ponts salins avec le bouchon (Chakraborty *et al.*, 2007), les résidus Gly sur les brins β 14 et β 16, une Val, une Asn et un Asp sur le brin β 21, une Arg sur le brin β 22, et un acide aromatique en C-terminale. Ces séquences conservées pourraient permettre de prédire la structure d'autres TBDT et éventuellement d'autres familles de protéines en tonneau β (Yue *et al.*, 2003 ; Noinaj *et al.*, 2010). Les liaisons hydrogène et les ponts salins entre le tonneau et le bouchon viennent stabiliser l'ensemble de la structure du transporteur.

3.1.2 Le domaine bouchon

Ce domaine bouchon, composé d'environ 130 résidus, est situé en position N-terminale du TBDT (**Figure 10**). C'est un domaine globulaire qui vient se loger à l'intérieur du tonneau β . Il est en contact à la fois avec le milieu extracellulaire et le périplasme, délimitant ainsi les deux espaces et empêchant la diffusion passive de

nutriments. La partie du bouchon exposé vers le milieu extracellulaire entre dans la composition du site de liaison.

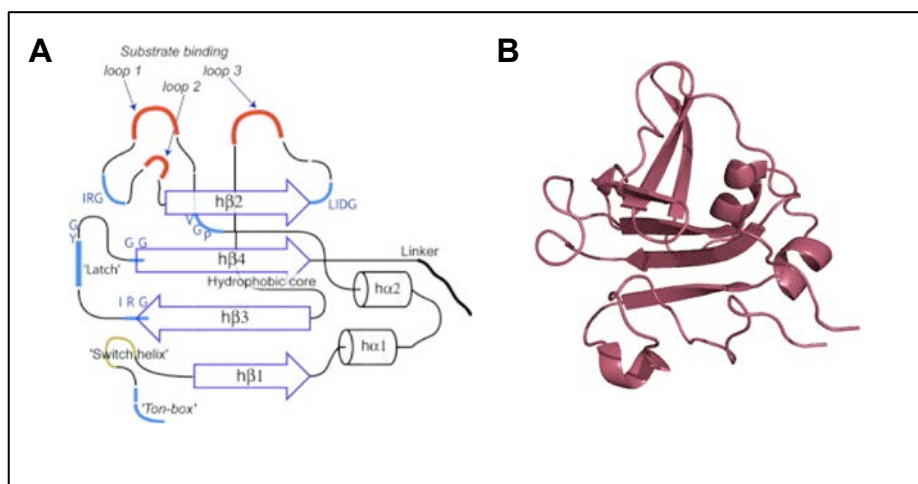


Figure 11 : Représentation du bouchon des transporteurs TonB-dépendants

Représentation de la structure du domaine bouchon des TBDT (A). Les structures secondaires en hélice α sont représentées par des cylindres noirs ($h\alpha$) et les brins β par des flèches mauves ($h\beta$). Les motifs conservés sont représentés en bleu, les boucles apicales formant le site de liaison en rouge et la « switch helix » présente chez FhuA et FecA en jaune (Chimento *et al.*, 2005). Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine bouchon du transporteur FptA (B) de *P. aeruginosa* (PDB 1XKW).

Le bouchon est composé de quatre brins β , d'un nombre variable d'hélices α et de trois boucles apicales (**Figure 11**) impliquées dans la fixation du ligand (Wiener, 2005 ; Chimento *et al.*, 2005). Le domaine bouchon est maintenu en place dans le tonneau par 40 à 70 liaisons hydrogène et deux ponts salins impliquant quatre résidus très conservés du TBDT : deux résidus Arg du bouchon et deux résidus Glu du tonneau (Chimento *et al.*, 2005 ; Wiener, 2005). Ces deux ponts salins sont la base d'une région appelée « lock region » (Chakraborty *et al.*, 2007). Des études de mutagenèse sur cette région montre qu'elle est impliquée dans la translocation du fer au travers du TBDT en permettant la formation d'un canal (Chakraborty *et al.*, 2007). Les alignements de séquences montrent que plusieurs résidus sont hautement conservés à la fois dans le tonneau et dans le bouchon. Les résidus conservés du bouchon forment neuf motifs de séquence. Les motifs IRG et PGV seraient nécessaires au repliement correct du bouchon à l'intérieur du pore du tonneau et à la structuration du site de liaison du ligand. On retrouve également d'autres motifs conservés qui sont : TEE, boîte RP, les feuilletts $h\beta3$ $h\beta4$ et la boîte TonB (Chimento *et al.*, 2005 ; Noinaj *et al.*, 2010). L'analyse des structures à l'interface tonneau/bouchon, montre que de très nombreuses molécules d'eau sont présentes

au niveau du bouchon. Ces données suggèrent des changements de conformations ou des mouvements du bouchon au sein du tonneau lors du transport.

3.1.3 La boîte TonB

Au niveau de la partie N-terminale du bouchon, on trouve une séquence consensus qui forme la signature de la famille des transporteurs TonB-dépendants, nommée **boîte TonB**. Cette boîte est principalement composée de résidus hydrophobes (**Tableau 2**). Le transport du ligand spécifique requiert l'énergie de la membrane interne : il s'agit de la force proton motrice, transmise par un complexe multiprotéique de la membrane interne appelé : machinerie TonB. La boîte TonB vient interagir avec la protéine TonB, ce qui permet le transfert d'énergie puis le transport. Cette interaction est indispensable pour l'énergisation du TBDT et la translocation du ligand vers le périplasme (Krewulak & Vogel, 2008 ; Faraldo-Gomez & Sansom, 2003 ; Gudmundsdottir *et al.*, 1989).

Nom du TBDT	Boîte TonB
FepA	DTIVVTA
FpvA	DLGATMIT
FecA	ALTVVGD
BtuB	DTLVVTA
Cir	ETMVVTA
ShuA	MTVTAG
FhuA	TIVVTA
FptA	DGETELPDMV
Fyu1	STLVVTA
HasR	DSLTVLGA

Tableau 2 : Quelques exemples de séquences des boîtes TonB

3.1.4 Le domaine de signalisation du transporteur

Certains TBDT présentent un domaine globulaire additionnel d'environ 80 acides aminés, situé dans la partie N-terminale et avant le domaine bouchon. Il est communément nommé : extension N-terminale ou domaine de signalisation (Schalk *et al.*, 2012a ; Koebnik, 2005 ; Schalk *et al.*, 2004).

Ce domaine de signalisation interagit avec un facteur anti-sigma de la membrane interne. Cette interaction permet alors à un facteur sigma cytoplasmique de moduler l'expression des gènes impliqués dans la voie d'acquisition du fer (Visca *et al.*, 2002). Ce domaine de signalisation a été observé *in-situ* uniquement dans la structure du transporteur FpvA (TBDT de *P. aeruginosa*) sous sa forme libre ou lié à la pyoverdine ferrique (Brillet *et al.*, 2007*). Pour FecA et PupA, TBDT du citrate-fer et de la pseudobactine-fer chez *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement, ces domaines ont été clonés seuls et les structures ont été résolues par RMN (Ferguson *et al.*, 2007). Dans chacun des cas, le domaine de signalisation est composé de deux hélices α prises entre deux feuillets de brins β (**Figure 12**).

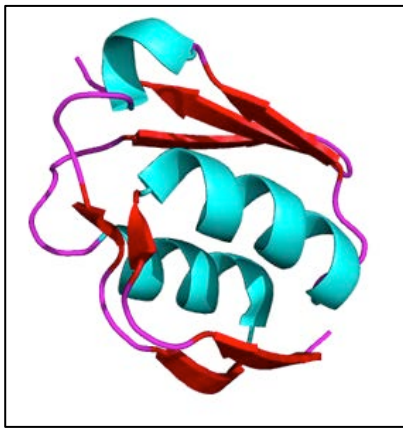


Figure 12 : Représentation de la structure du domaine de signalisation d'un TBDT

Représentation de la structure du domaine de signalisation de FpvA chez *P. aeruginosa* (PDB 2OP5), composé de deux hélices α en bleu prises entre deux feuillets de brins β en rouge.

3.2 Énergisation des TBDT par le système TonB

3.2.1 Le rôle du système TonB

Le système TonB ou machinerie TonB est l'élément moteur du système de transport actif des nutriments chez les bactéries Gram-négatives. Au niveau de la membrane externe, il n'existe aucune source d'énergie, pas de gradient électrochimique et aucun nucléoside triphosphate n'est présent dans le périplasme. L'énergie nécessaire au transport actif au travers de la membrane externe est transmise par la force proton motrice de la membrane interne. La séparation des deux membranes par le périplasme nécessite un mécanisme qui permet d'apporter cette énergie au TBDT localisé dans la membrane externe. Ce lien est réalisé grâce aux protéines TonB, ExbB et ExbD qui forment un complexe au niveau de la membrane interne (**Figure 13**) (Bradbeer, 1993 ; Krewulak & Vogel, 2011).

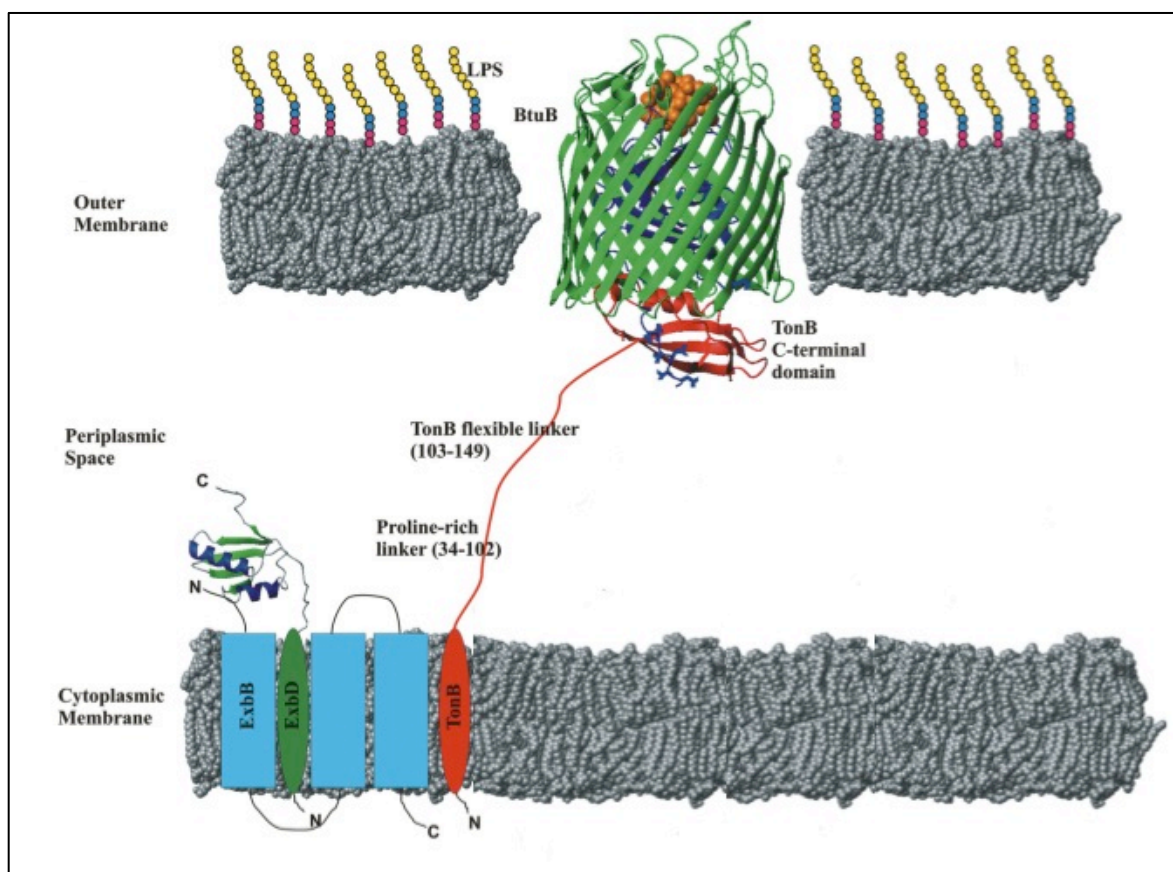


Figure 13 : Représentation schématique du complexe TonB-ExbB-ExbD

Représentation schématique du système TonB de la membrane interne, impliquant les protéines TonB (rouge), ExbB (bleu) et ExbD (vert) (PDB 2PFU), et de son interaction avec un TBĐT de la membrane externe, représenté ici par BtuB (PDB 2GSK). Adaptée de (Krewulak & Vogel, 2011).

3.2.2 La protéine TonB

La protéine TonB, identifiée chez les bactéries Gram-négatives, est impliquée dans le transport de différentes sources de fer, de vitamine-B₁₂, de nickel ou de sucres (Blanvillain *et al.*, 2007 ; Schauer *et al.*, 2007). TonB est une protéine de la membrane interne de 26 kDa, composée de trois domaines (Chakraborty *et al.*, 2007 ; Wiener, 2005). Le domaine N-terminal transmembranaire (résidus 1 à 32), prédit en hélice α , contient une séquence hydrophobe qui permet la translocation de TonB et son insertion au niveau de la membrane interne (Jaskula *et al.*, 1994). L'histidine-20 est essentielle pour l'énergisation de la protéine TonB par la force proton motrice (Ollis & Postle, 2012a). Le second domaine est composé d'un bras espaceur rigide poly-proline, constitué d'une série de résidus proline (40%) et glutamate suivie par plusieurs motifs Pro-Lys. Après ce bras poly-Pro se trouve une région (résidus 103-149) qui confère la flexibilité nécessaire à la protéine TonB. Des résultats récents montrent que ce domaine riche en proline permet à TonB de

traverser l'espace périplasmique pour atteindre les TBDT de la membrane externe (Kohler *et al.*, 2010) (**Figure 13**). Le troisième domaine (résidus 150-239) est essentiel pour l'interaction avec les transporteurs de la membrane externe (Kohler *et al.*, 2010). A ce jour, la structure complète de TonB n'a pas été résolue mais les structures de plusieurs domaines C-terminaux ont été déterminées par cristallographie ou RMN. Celles-ci montrent deux hélices α positionnées en face d'un feuillet de trois à quatre brins β (**Figure 14**) (Kodding *et al.*, 2005 ; Peacock *et al.*, 2005). La structure de TonB2 de *Vibrio anguillarum* (Lopez *et al.*, 2009) montre une similarité avec la protéine TonB de *E. coli*. Ces différents éléments et une analyse bioinformatique des génomes bactériens suggèrent que le 4^{ème} brin β est absent dans la plupart des protéines TonB (Chu *et al.*, 2007).

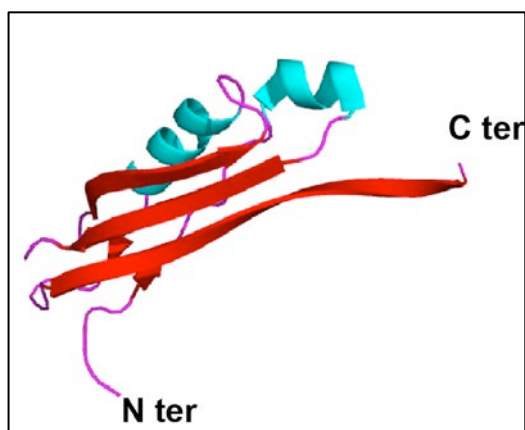


Figure 14 : Représentation de la structure du domaine C-terminal de TonB

Représentation de la structure du domaine C-terminal de TonB d'*E. coli* (PDB 1U07), représentant les résidus 150 à 239. La structure met en évidence deux hélices α en face d'un feuillet de brins β .

3.2.3 La protéine ExbB

ExbB est une protéine de 26 kDa de la membrane interne composée de 244 acides aminés. Cette protéine comporte trois segments transmembranaires, une longue boucle cytoplasmique (40-127) et une longue boucle périplasmique (195-244). La partie N-terminale de la protéine est localisée dans le périplasma (Kampfenkel & Braun, 1992 ; Karlsson *et al.*, 1993) (**Figure 13**). La structure de cette protéine reste encore inconnue. Une analyse par spectrométrie de masse (LILBID-MS) montre que ExbB forme préférentiellement un hexamère qui s'associe avec ExbD, *in vitro*. Ce complexe multimérique s'associe alors avec la protéine TonB. *In vivo*, la stoechiométrie du complexe final au niveau de la membrane interne serait ExbB₁₂-ExbD₂-TonB₂ (Pramanik *et al.*, 2011) soit ExbB₁₄-ExbD₂-TonB₂ (Higgs *et al.*, 2002).

3.2.4 *La protéine ExbD*

ExbD est une protéine de la membrane interne de 17 kDa (141 résidus). Elle possède un domaine transmembranaire en position N-terminale et une extension C-terminale périplasmique (résidus 44-141) (Kampfenkel & Braun, 1992 ; Krewulak & Vogel, 2011). Deux résidus ont un rôle clé au niveau de la formation et de l'activité de la machinerie TonB : (i) la mutation L132Q abolit complètement l'interaction de cette protéine avec TonB ; (ii) la mutation D25N inhibe l'énergisation de TonB (Ollis & Postle, 2012a). L'effet de ces mutations confirme que la protéine ExbD est essentielle pour exploiter la force proton motrice (Ollis & Postle, 2012a). ExbD permettrait également le positionnement correct de TonB pour l'interaction avec la boîte TonB des TBDT (Ollis & Postle, 2012b). Les résidus 92 à 121 sont également impliqués dans l'interaction avec ExbB (Ollis *et al.*, 2012c). La structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD a été résolue par RMN. Elle est composée d'un long bras N-terminal terminé par un domaine comportant un feuillet à cinq brins β et deux hélices α (**Figure 15**).

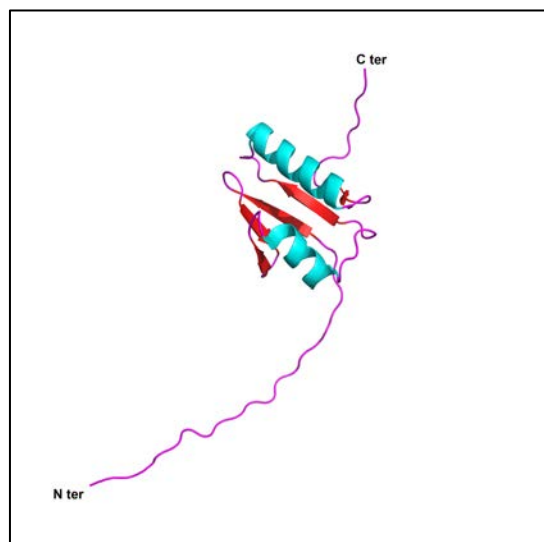


Figure 15 : Représentation de la structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD.

Structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD (PDB 2PFU), résolue par RMN, ce domaine contient un long bras N-terminal et un domaine composé de 2 hélices α et d'un feuillet à 5 brins β .

3.2.5 Interactions entre la protéine TonB et les transporteurs TonB-dépendants

Des études RMN ont montré que des peptides, dont la séquence est dérivée des boîtes TonB de FepA, FhuA et BtuB, interagissent avec la protéine TonB d'*E. coli* (Sean Peacock *et al.*, 2005). Un regard direct sur l'interaction entre la boîte TonB et la protéine TonB est désormais possible grâce aux structures de TBDT (FhuA ou BtuB) résolues en complexe avec la partie C-terminale de TonB (Pawelek *et al.*, 2006 ; Shultis *et al.*, 2006) (**Figure 16A**). Au moment de la fixation du ligand, la flexibilité de la boîte TonB lui permet d'entrer en interaction avec la protéine TonB, ce qui vient stabiliser la structure (**Figure 16B**).

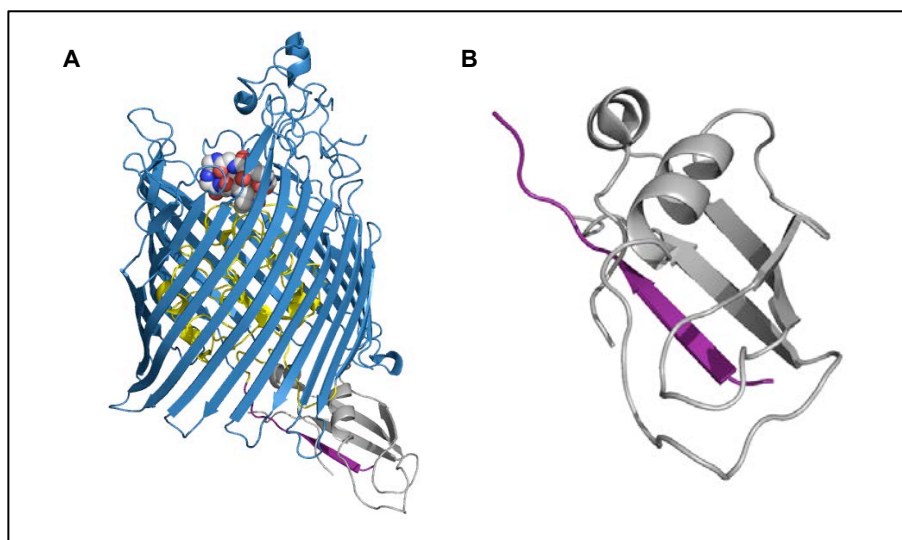


Figure 16 : Représentation de la structure du transporteur FhuA en complexe avec la partie périplasmique de TonB

Représentation de la structure du complexe TonB-FhuA-ferrichrome (A). Le tonneau β , le bouchon et la boîte TonB de FhuA sont représentés respectivement en bleu, jaune et violet. TonB est représenté en gris. Le ferrichrome est représenté en sphères de van der Waals. Zoom sur l'interaction entre la boîte TonB de FhuA (violet) et la protéine TonB (gris) (B) formant un feuillet interprotéique (PDB 2GRX).

Lors de cette interaction un feuillet inter-protéique mixte se forme entre les trois brins β de la protéine TonB et le brin β de la boîte TonB du transporteur. Plusieurs résidus de la protéine TonB impliqués dans l'interaction avec le TBDT ont été identifiés : Gln160, Ala167, Gly174, Ile232 et Asn233. Au niveau de la structure du complexe TBDT-TonB, des liaisons hydrogène sont formées entre les résidus 6 à 12 de BtuB et les résidus 226 à 232 de TonB. Des études de pontages chimiques,

grâce à des mutants cystéines, ont permis d'identifier plusieurs interactions : entre Gln160 (TonB) et Leu8/Val10 (BtuB), entre Gln162 (TonB) et Leu8/Ala12 (BtuB) et entre Tyr163 (TonB) et Ala 12 (BtuB). Les mutations de ces différents résidus engendrent une perte totale de la fonction de TonB (Cadieux *et al.*, 2000 ; Krewulak & Vogel, 2011). De plus, la mutation de résidus de la boîte TonB par une proline inhibe l'interaction spécifique entre TonB et la boîte TonB de BtuB (Cadieux & Kadner, 1999 ; Cadieux *et al.*, 2000).

3.2.6 Transduction énergétique par le système TonB

Le pore qui traverse le tonneau β des TBDT est totalement obstrué et ne permet pas la diffusion de molécules sans apport d'énergie. La fixation du ligand spécifique au niveau de son site de liaison, à la surface du TBDT, engendre des changements conformationnels au niveau des boucles, qui se répercutent jusqu'à la boîte TonB. Ces mouvements favorisent alors l'interaction de la boîte TonB avec la machinerie TonB. Le système TonB-ExbB-ExbD exploite alors la force proton-motrice de la membrane interne pour énergiser le TBDT. Le processus qui permet l'activation du TBDT et le rôle des protéines ExbB et ExbD dans le transfert d'énergie sont encore méconnus et sujets à controverse. Plusieurs modèles sont proposés : un modèle hélice faisant appel à une rotation, un modèle navette, un modèle de traction et un modèle assisté par une protéine périplasmique (Krewulak & Vogel, 2011). Ces mécanismes permettraient alors l'ouverture d'un canal nécessaire à la translocation des ligands.

3.2.6.1 *Le modèle hélice*

Ce premier modèle est basé sur l'homologie de séquence des protéines ExbB et ExbD avec les protéines MotA et MotB, impliquées dans le mouvement du flagelle bactérien (Cascales *et al.*, 2001). Les études cristallographiques du domaine C-terminal de la protéine TonB montrent un assemblage sous forme de dimère qui pourrait agir comme une hélice (Chang *et al.*, 2001). Dans ce modèle (**Figure 17**), TonB s'associe avec la boîte TonB du transporteur de la membrane externe. Le complexe ExbB-ExbD utilise alors le gradient de proton de la membrane interne pour générer un mouvement de rotation de la protéine TonB. La rotation peut engendrer

soit un changement de conformation, soit l'expulsion du domaine bouchon, permettant ainsi le passage du substrat dans le périplasma. Pour que ce modèle puisse fonctionner TonB doit exister sous forme de dimère *in vivo*, ce qui semble être le cas (Pramanik *et al.*, 2011). D'après la structure du complexe TonB-BtuB, il est possible que deux molécules de TonB se lient simultanément au TBDT. Ces deux molécules de la protéine TonB intervenant dans le processus de transduction d'énergie peuvent provenir d'un même complexe TonB-ExbB-ExbD (**Figure 17a**) ou de deux complexes différents (**Figure 17b**).

Dans ce modèle, un point reste à élucider. ExbB et ExbD ne possèdent pas le motif de liaison aux peptidoglycanes, séquence identique à celle présente chez MotB, capable d'immobiliser le complexe dans la membrane pouvant ainsi empêcher sa propre rotation autour de TonB (Krewulak & Vogel, 2011). Un autre mécanisme doit exister pour empêcher la rotation du complexe ExbB-ExbD qui n'a pas encore été élucidé.

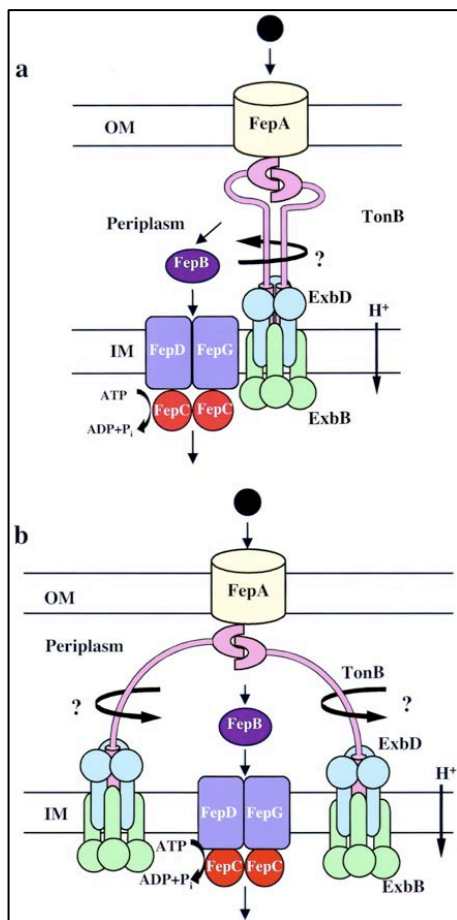


Figure 17 : Schéma de la transduction d'énergie via le modèle hélice

La transduction d'énergie peut mobiliser deux molécules de TonB provenant du même complexe TonB-ExbB-ExbD (a) ou de deux complexes différents (b). La partie C-terminale de TonB entre en rotation grâce au complexe ExbB-ExbD, qui récupère l'énergie issue du gradient de proton au travers de la membrane interne (Chang *et al.*, 2001).

3.2.6.2 Le modèle navette

Sur la base d'études biochimiques un modèle navette avait été proposé (Postle & Kadner, 2003), avec un passage de la protéine TonB de la membrane interne vers la membrane externe. Des études de mutagenèse, effectuées par la même équipe, viennent de remettre en cause ce modèle. Cette hypothèse de mécanisme a très récemment été abandonnée (Gresock *et al.*, 2011).

3.2.6.3 Le modèle traction

Le modèle traction suggère que la protéine TonB puisse exercer une force sur le transporteur. Des expériences de dynamique moléculaire réalisées *in silico* montrent comment TonB peut exercer une traction sur le transporteur BtuB (Gumbart *et al.*, 2007). Dans un premier temps, TonB traverse le périplasme et se lie à la boîte TonB du TBDT. Ensuite, le système TonB génère une force sur le feuillet interprotéique [boîte TonB/TonB] et sur le domaine bouchon, ce qui engendre un déroulement des feuillets β du bouchon (**Figure 18**). La force nécessaire pour exercer cette traction dépend de l'orientation de la protéine TonB par rapport au domaine bouchon. Ce mouvement permet alors la translocation du ligand au travers du transporteur. A ce jour, aucune expérience *in vivo* ne vient étayer cette hypothèse (Krewulak & Vogel, 2011). Cependant, des expériences récentes réalisées sur le récepteur FhuA confirment que le domaine bouchon peut se dérouler hors du tonneau β , *in vitro* (Udho *et al.*, 2012).

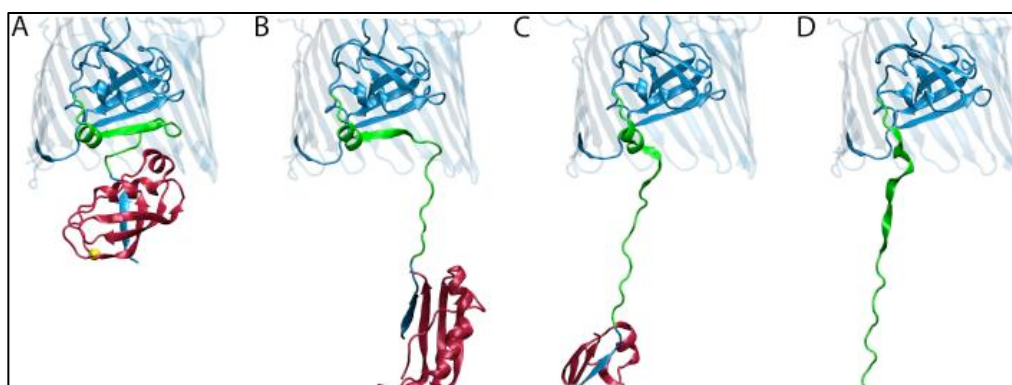


Figure 18 : Représentation de la transduction d'énergie selon le modèle traction

La transduction d'énergie selon le modèle traction a été déterminée *in silico*. La protéine TonB est représentée en rouge avec son résidu N-terminal en jaune. Le transporteur est représenté en bleu avec le feuillet du domaine bouchon qui se déplie en vert. Les différentes étapes de traction représentent des déplacements de 0 Å (**A**), 55 Å (**B**), 70 Å (**C**) et 90 Å (**D**) (Gumbart *et al.*, 2007).

3.2.6.4 Le modèle assisté par une protéine périplasmique

Ce modèle, proposé récemment, émane de différentes expériences montrant une interaction entre TonB et une protéine périplasmique liant le ferrichrome avec une stoechiométrie 1:1 (**Figure 19**) (Carter *et al.*, 2006). TonB peut exposer la protéine FhuD, à son TBDT spécifique FhuA, afin de faciliter le transfert du ferrichrome du transporteur vers la protéine périplasmique. Dans un même temps, TonB interagit avec la boîte TonB du TBDT entraînant un changement de conformation du domaine bouchon et la translocation du ligand. Ensuite, TonB présente FhuD au transporteur ABC de la membrane interne FhuBC, permettant le transport du sidérophore vers le cytoplasme. Les mêmes observations ont été réalisées pour la protéine périplasmique BtuF (associée au transporteur BtuB) et TonB (James *et al.*, 2009 ; Krewulak & Vogel, 2011).

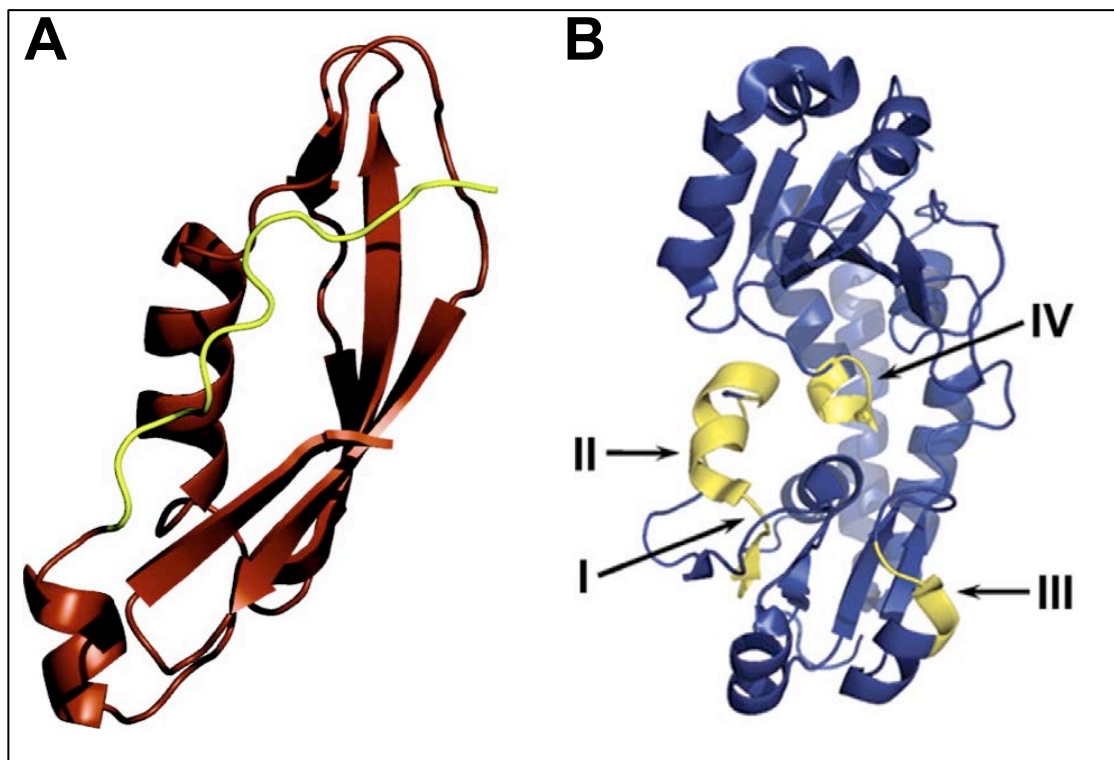


Figure 19 : Représentation des structures de TonB et FhuD impliquées dans le modèle de transduction d'énergie assistée par une protéine périplasmique

La transduction d'énergie assistée par une protéine périplasmique suppose une interaction entre la protéine TonB et la protéine périplasmique ici représentée par FhuD. La région d'interaction identifiée au niveau de TonB est représentée en jaune (A). Pour FhuD, cette région représentée en jaune (B) implique la participation de la boucle 2 (I), de l'hélice 2 (II) et des boucles 8 (III) et 23 (IV) (adaptée de (Carter *et al.*, 2006 ; James *et al.*, 2009).

4 Les mécanismes de transport du fer chez les bactéries Gram-négatives

4.1 Acquisition du fer ferreux

En conditions anaérobies ou à pH acide, le Fe^{2+} est la forme majoritaire du fer. Cet ion très soluble est capable de diffuser librement au travers de la membrane externe *via* des porines. Les gènes *feoABC* (Kammler *et al.*, 1993 ; Grass, 2006), identifiés chez *E. coli* codent pour les protéines FeoABC (**Figure 20**). FeoB est un transporteur du fer de la membrane interne, composé de 773 acides aminés, il contient un domaine globulaire dans la partie N-terminale responsable de l'hydrolyse du GTP (Ash *et al.*, 2011). Le rôle de FeoA a très récemment été identifié, son interaction avec FeoB est nécessaire pour le transport du fer. FeoA pourrait avoir un rôle régulateur sur l'activité de FeoB (Kim *et al.*, 2012 ; Su *et al.*, 2010). FeoC est une protéine régulatrice de la transcription de l'opéron *feo* (Hung *et al.*, 2012). Le système FeoABC est important dans des environnements acides ou anaérobies notamment chez des bactéries qui colonisent l'estomac ou l'intestin (Boyer *et al.*, 2002 ; Velayudhan *et al.*, 2000).

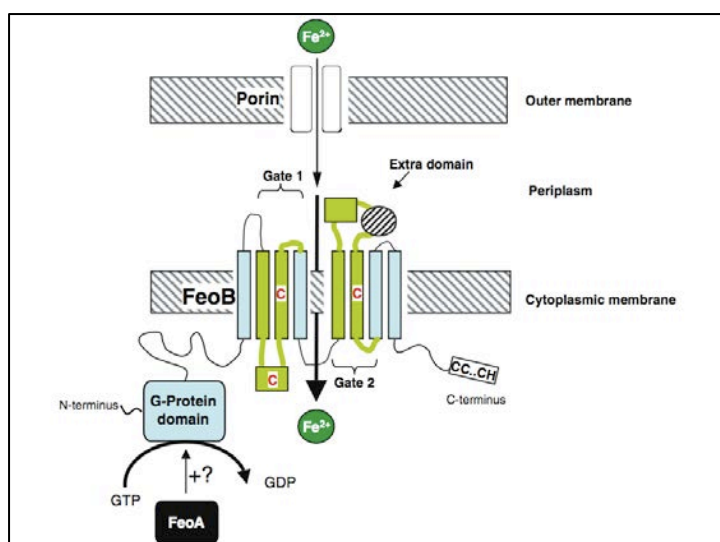


Figure 20 : Représentation schématique du transport du fer ferreux chez *E. coli*

En conditions anaérobies le Fe^{2+} diffuse au travers de la membrane grâce à une porine de la membrane externe. Il est ensuite transporté de façon active par le système FeoABC, l'énergie nécessaire est fournie par l'hydrolyse du GTP au niveau du domaine globulaire de la protéine FeoB (représentée en bleu et vert). L'activité de FeoB est régulée par FeoA (représentée en noir) (Cartron *et al.*, 2006).

4.2 Transport du fer *via* les sidérophores

4.2.1 Les complexes sidérophore-fer

Les sidérophores sont des chélateurs spécifiques du fer synthétisés et excrétés dans le milieu extracellulaire par les bactéries, les champignons ou les plantes (Chu *et al.*, 2010 ; Hider & Kong, 2010 ; Raymond-Bouchard *et al.*, 2012) en milieu aérobie et en conditions de carence en fer. Le premier sidérophore a été caractérisé en 1956, il s'agissait du ferrichrome (Neilands, 1957). Ces molécules ont un poids moléculaire compris entre 200 et 2 000 Da et sont caractérisés par leur forte affinité pour le fer ferrique (en moyenne 10^{30} M^{-1} , jusqu'à 10^{49} M^{-1} pour l'entérobactine) (Hider & Kong, 2010). Les bactéries peuvent utiliser leurs propres sidérophores (endogènes) mais également des sidérophores exogènes produit par d'autres organismes. *E. coli* peut utiliser l'entérobactine (sidérophore endogène) mais également le ferrichrome produit par un champignon *Ustilago sphaerogena*. De même, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser des sidérophores exogènes comme le ferrichrome, l'entérobactine ou la cépabactine (Poole & McKay, 2003).

Les sidérophores sont des composés très électronégatifs qui lient le Fe^{3+} en formant préférentiellement un complexe hexacoordiné. Actuellement, 500 sidérophores sont caractérisés chimiquement (Boukhalfa & Crumbliss, 2002 ; Saha *et al.*, 2012). Ils sont classés en trois grandes familles selon les groupements fonctionnels de chélation : hydroxamates, α -hydroxycarboxyliques et phénols/catéchols (**Figure 21**). Ces sidérophores varient par le nombre de groupements chélateurs et par leur structure tridimensionnelle. A titre d'exemple, l'entérobactine possède trois groupes catéchols, le ferrichrome possède trois hydroxamates alors que la pyoverdine contient un motif catéchol et deux hydroxamates (**Figure 21**). La diversité de ces structures engendre différentes stoechiométries (1:1, 2:1, 3:1) pour la formation du complexe sidérophore/ Fe^{3+} (Winkelmann, 2002).

Les sidérophores peuvent extraire le fer à partir des différents composés ferriques solubles chez l'hôte (transferrine-fer, ferritine-fer...) (Beasley *et al.*, 2011). Ces molécules chélatrices permettent d'extraire le fer extracellulaire et de le transporter *via* des récepteurs spécifiques de la membrane externe des bactéries : les transporteurs TonB-dépendants (TBDT).

La biosynthèse des sidérophores est induite par la carence en fer. Ces petites molécules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire afin de récupérer le fer. Dans la majorité des cas ces composés sont synthétisés par des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) (Saha *et al.*, 2012). Ces NRPS permettent d'incorporer des acides aminés particuliers ne pouvant pas être insérés *via* une synthèse ribosomale classique, c'est le cas de la D-serine et de la N^5 -formyl- N^5 -hydroxyornithine dans la synthèse de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Visca *et al.*, 2007 ; Schalk & Guillon, 2012b). Une fois le sidérophore synthétisé, celui-ci est sécrété ou exporté par des protéines de transport ou des pompes à efflux (Furrer *et al.*, 2002 ; Visca *et al.*, 2007 ; Hannauer *et al.*, 2010). Les voies de biosynthèse de deux sidérophores de *P. aeruginosa* sont présentées dans les Chapitre 5.1.2 et 5.2.2.

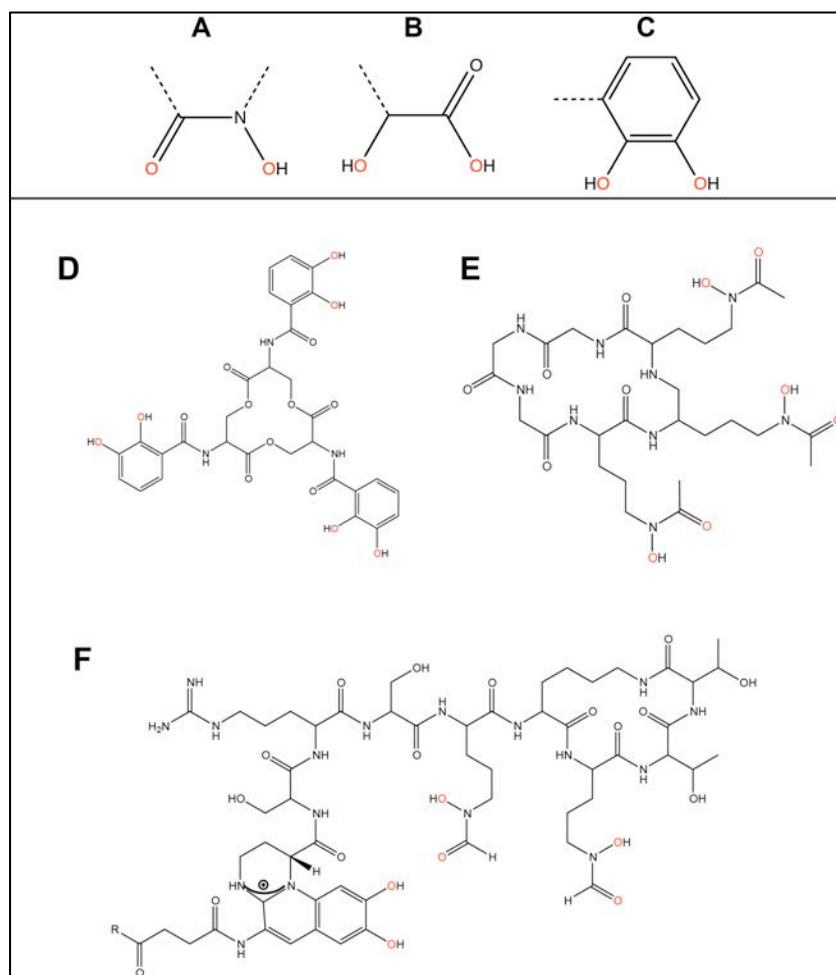


Figure 21 : Groupes fonctionnels capables de chélater le fer. Structures de sidérophores

Représentation des groupements chélateurs : hydroxamate (A), α -hydroxycarboxylique (B), phénol/catéchol (C). Les hétéroatomes impliqués dans la complexation de l'ion ferrique sont colorés en rouge. Structure de quelques sidérophores : l'entérobactine (D), le ferrichrome (E) et la pyoverdine (F) où R une chaîne latérale variable (acide succinique, succinamide ou α -cétooglutarique).

Pour de nombreux sidérophores, une large gamme de structures homologues a été identifiée. Par exemple, 60 analogues de la pyoverdine ont été décrits (Fuchs *et al.*, 2001), 21 analogues pour le desferrichrome, 21 pour l'entérobactine et 20 pour la ferrioxamine (Hider & Kong, 2010).

4.2.2 Acquisition du fer complexé par les sidérophores

Ce type de transport est essentiel chez les bactéries Gram-négatives pour le transport de composés de plus de 600 Da présents à faible concentration dans l'environnement de la bactérie. Ce transport nécessite un apport d'énergie, fournie par la force proton motrice de la membrane interne. Ainsi, la machinerie TonB permet l'activation des TBDT (Postle, 2007). Une fois dans le périplasme, le devenir du ferri-sidérophore dépend de la bactérie. La dissociation du fer dans le périplasme ou dans le cytoplasme nécessite une réduction du fer^{3+} en fer^{2+} et/ou une modification du sidérophore, voire sa dégradation (Matzanke *et al.*, 2004 ; Brickman & McIntosh, 1992). Ce transport doit être finement régulé car un excès de fer libre peut générer l'apparition d'espèces réactives pouvant endommager les macromolécules biologiques. Ainsi, l'expression des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des sidérophores sont finement régulés par la concentration intracellulaire en fer (Braun & Braun, 2002 ; Fleischhacker & Kiley, 2011).

4.2.2.1 *Liaison du ferri-sidérophore au niveau du site de liaison du TBDT*

Au niveau du transporteur, le site de liaison du ferri-sidérophore est toujours situé sur la face extracellulaire et le substrat interagit avec le bouchon et les résidus des boucles extracellulaires du tonneau (Wandersman & Delepelaire, 2004). Les TBDT reconnaissent et transportent des sidérophores spécifiques et dans certains cas quelques analogues (Greenwald *et al.*, 2009). Ils reconnaissent très rarement des sidérophores ayant une structure chimique différente. Le site de liaison est composé à la fois de résidus du tonneau β et du bouchon, et l'affinité est généralement comprise entre 0,1 et 5 nM (Clement *et al.*, 2004 ; Hoegy *et al.*, 2005 ; Payne *et al.*, 1997). La nature des acides aminés impliqués dans le site de liaison

diffère selon les TBDT. Par exemple le site de liaison du citrate ferrique de FecA est composé de résidus chargés positivement (Ferguson *et al.*, 2002a ; Yue *et al.*, 2003 ; Chakraborty *et al.*, 2007), tandis que dans le cas de FhuA, FptA ou FetA les sites de liaison sont constitués de résidus aromatiques (Brillet *et al.*, 2011 ; Cobessi *et al.*, 2005a ; Ferguson *et al.*, 1998 ; Locher *et al.*, 1998).

Les différentes structures résolues de FecA-citrate (Yue *et al.*, 2003) et de FpvA-pyoverdine (Cobessi *et al.*, 2005b) montrent une conformation où les boucles sont plutôt en position ouverte et potentiellement capable d'accueillir le ligand ferrique. En revanche, en présence de sidérophore libre les TBDT ne sont pas actifs d'un point de vue fonctionnel. Lorsque le sidérophore ferrique est lié, un réarrangement des boucles permet de bloquer le ligand dans son site de liaison. Des études montrent que la liaison du sidérophore ferrique se fait selon une cinétique à deux étapes (Clement *et al.*, 2004 ; Payne *et al.*, 1997). La première étape est rapide et dépendante de la concentration en ferri-sidérophore. Elle correspond probablement à l'adsorption et à la liaison du ferri-sidérophore au niveau de la surface du TBDT. La deuxième étape est plus lente et indépendante de la concentration en ferri-sidérophore, elle correspond probablement au positionnement conforme dans le site de liaison ou à un changement de conformation du TBDT. La comparaison des structures FecA-citrate et FecA-citrate-fer montre que la position des molécules de citrate dans la poche de fixation change. Une des molécules de citrate se déplace de 1,3 Å dans la poche de fixation et la deuxième molécule effectue une rotation de 90° et un mouvement de 1,5 Å (**Figure 22**) (Yue *et al.*, 2003).

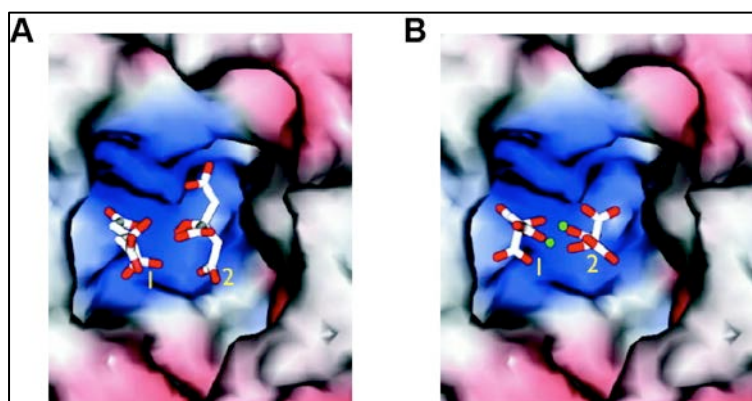


Figure 22 : Représentation de la poche de fixation du citrate au niveau du transporteur FecA

Représentation de la poche de fixation du citrate au niveau de la structure du transporteur FecA, représentée en surface. Superposition du dicitrate (A) et superposition du dicitrate diferrique (B) dans la structure FecA-dicitrate. On peut observer que le citrate n°1 se déplace de 1,3 Å par rapport au centre de la poche de fixation. Pour le citrate n°2, une rotation de 90° de la molécule est observée (Yue *et al.*, 2003).

La liaison du ferri-siderophore se fait par des liaisons hydrogène et des contacts de van der Waals impliquant différentes boucles apicales du bouchon. La liaison se fait également grâce à différents résidus du bouchon, du tonneau et des boucles extracellulaires, comme les boucles L3 (BtuB et FhuA), L4 (BtuB, FecA et FhuA), L7 et L8 (FecA et FhuA) ou L4, L7, L9 et L11 (FpvA) (Yue *et al.*, 2003 ; Chimento *et al.*, 2003 ; Greenwald *et al.*, 2009 ; Nader *et al.*, 2007).

Certains transporteurs TonB-dépendants sont capables de lier et de transporter des composés autres que les sidérophores, notamment des antibiotiques. Les structures de FhuA lié à l'albomycine et la rifamycine ont été résolues (Ferguson *et al.*, 2000b ; Ferguson *et al.*, 2001). Ces composés analogues au ferrichrome et portant des groupements hydroxamates possèdent une activité antibiotique. La similarité structurale explique pourquoi ces antibiotiques sont capables de se fixer au niveau du site de liaison de FhuA.

4.2.2.2 Le mouvement des boucles

La fixation du ferri-sidérophore au niveau de son site de liaison n'induit pas de changements conformationnels majeurs. En revanche la résolution des différentes structures de FecA (vide, lié au citrate ou lié au complexe citrate-fer) montre que des changements conformationnels sont observés au niveau des boucles extracellulaires du tonneau, des boucles apicales du bouchon et de la boîte TonB. En présence du ligand ferrique le mouvement des boucles du bouchon suggère que celui-ci est flexible et peut initier des interactions avec les domaines périplasmiques de TonB et une protéine FecR, impliquée dans la régulation du système de transport. En présence du complexe citrate-fer, les boucles extracellulaires L7 et L8 du transporteur FecA viennent recouvrir le site de liaison et la différence de positions de certains acides aminés de ces boucles varie de 9 à 11 Å, par rapport à la structure de FecA citrate (**Figure 23**). Des expériences de mutagénèse montrent que la délétion de ces boucles inhibe la liaison du citrate ferrique sur FecA (Sauter & Braun, 2004).

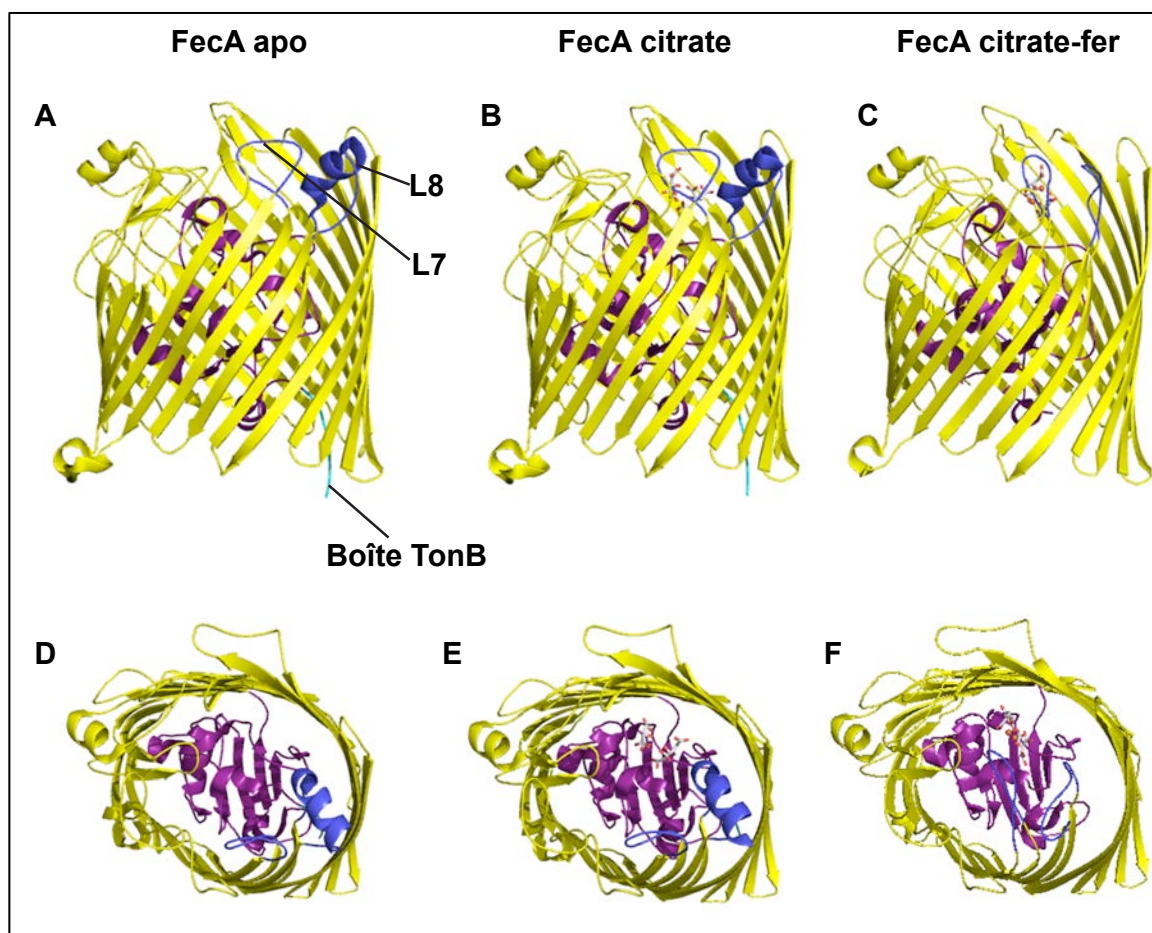


Figure 23 : Représentation de la structure du transporteur FecA sous ses différentes formes

Représentation de la structure du transporteur sous sa forme vide dite apo (**A** et **D**) (PDB 1PNZ), lié au citrate (**B** et **E**) (PDB 1PO0) ou lié au complexe citrate-fer (**C** et **F**) (PDB 1PO3). Le tonneau est représenté en jaune, le domaine bouchon en violet, la boîte TonB en cyan et les boucles L7 et L8 en bleu. Le citrate est représenté sous forme de bâtonnets et le fer en sphère de van der Waals (orange). La liaison du citrate ferrique (**C** et **F**) entraîne un changement de conformation des boucles L7 et L8 ainsi qu'une flexibilité de la boîte TonB, qui disparaît au niveau de la structure cristallographique.

Au niveau de la structure du complexe FptA-pyochéline-fer, la boucle L8 vient également couvrir le site de liaison, empêchant ainsi la dissociation du complexe TBDT-ferri-sidérophore (Cobessi *et al.*, 2005a). De même, des études de dynamique moléculaire suggèrent que la boucle L8 de FhuA vient recouvrir le site de fixation du ligand (Endriss & Braun, 2004). Au niveau du transporteur FhuA, la délétion des boucles L3 et L11 abolit la fixation et le transport du ferrichrome (Endriss & Braun, 2004). Le recouvrement du site de fixation du ligand par les boucles extracellulaires semble être une caractéristique commune à plusieurs TBDT.

4.2.2.3 *Le mouvement de la boîte TonB*

Au niveau de la bactérie, il existe un nombre limité de protéines TonB ancrées dans la membrane interne par rapport aux TBDT. Un signal est donc nécessaire pour favoriser l'interaction lorsque que le sidérophore ferrique est fixé sur le transporteur. La fixation du ligand au niveau du site de liaison engendre un signal qui se propage jusqu'au bouchon et libère la boîte TonB, ce mouvement correspond probablement au signal permettant de discriminer l'état chargé en apo-sidérophore de l'état chargé en holo-sidérophore (Howard *et al.*, 2001 ; Ferguson & Deisenhofer, 2002b).

Lorsque le ligand est ancré dans son site de liaison, les longues boucles extracellulaires se referment. Cette liaison va engendrer différents changements conformationnels, au niveau d'une hélice adjacente à la boîte TonB du bouchon (« switch helix », **Figure 11**) provoquant une flexibilité au niveau de la boîte TonB (Ferguson & Deisenhofer, 2002b ; Yue *et al.*, 2003). Cette boîte TonB libérée peut alors se déplacer au niveau du périplasme et interagir avec la protéine de la membrane interne TonB.

4.2.2.4 *Le mouvement du domaine de signalisation*

Certains TBDT possèdent un domaine de signalisation en position N-terminale. Son positionnement dépend de la présence ou non du ferri-sidérophore dans le site de liaison du transporteur (Wirth *et al.*, 2007 ; Chimento *et al.*, 2003). Sur ces TBDT, le domaine de signalisation est connecté au bouchon par une longue boucle flexible qui contient la boîte TonB. Si on compare les structures, on observe un mouvement du domaine de signalisation entre deux positions, libérant alors la boîte TonB. Cette boîte TonB devient alors accessible pour une interaction avec la protéine TonB, de la membrane interne, amenant l'énergie nécessaire au transport. Ces aspects seront développés dans la Partie II « Résultats scientifiques ».

En parallèle, ce mouvement du domaine de signalisation permet une interaction avec un facteur sigma régulateur (également appelé facteur anti-sigma), capable de réguler l'ensemble du système (cf Chapitre 5.5)

4.2.3 Transport au travers de la membrane externe

Le transport de molécules au travers de la membrane externe nécessite la formation d'un canal ou d'un pore au niveau du TBDT, permettant le passage de petits composés (jusqu'à 2 000 Da) voire de molécules comme les colicines (29 à 69 kDa) (Cascales *et al.*, 2007). Aucune des structures cristallographiques ne permet de faire apparaître la présence de ce type de canal. Le mécanisme global proposé se fait en plusieurs étapes :

- les boucles extracellulaires se trouvent dans une conformation propice à la fixation du ligand, laissant le site de liaison accessible.

- le sidérophore ferrique se fixe au niveau du site de liaison du TBDT avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, impliquant une interaction avec des résidus du tonneau et du domaine bouchon.

- Un changement conformationnel important est observé au niveau des boucles extracellulaires, qui viennent coiffer et séquestrer le ferri-sidérophore dans son site de liaison. La fixation du ligand génère également de légers changements conformationnels au niveau du domaine bouchon permettant la libération de la boîte TonB et l'interaction avec la protéine TonB. Ces modifications permettent d'induire le mécanisme de translocation du ligand ferrique.

- La translocation, dont le mécanisme moléculaire n'est pas encore identifié, nécessite la formation d'un canal d'au moins 10 Å de diamètre pour autoriser le passage du ferri-sidérophore (**Figure 24**). Parmi les hypothèses émises, le modèle de traction permettrait la formation d'un canal au sein du tonneau. Les derniers travaux de Udho *et al.* viennent conforter cette hypothèse (Udho *et al.*, 2012). Des travaux très récents montrent que le domaine bouchon pourrait, en plusieurs étapes et de manière réversible, se dérouler à l'extérieur du tonneau pour former un canal permettant la translocation du ligand (Flores Jimenez & Cafiso, 2012 ; Udho *et al.*, 2012 ; Udho *et al.*, 2009). Dans une seconde hypothèse, le domaine bouchon subirait des changements de conformation majeurs tout en restant dans le tonneau. L'élargissement de la structure permettrait la formation d'un canal (Ferguson & Deisenhofer, 2004). La présence d'un grand nombre de molécules d'eau autour du domaine bouchon suggère qu'un réarrangement minimal suffirait à conduire à la formation du canal et nécessiterait un apport énergétique plus faible (Noinaj *et al.*, 2010).

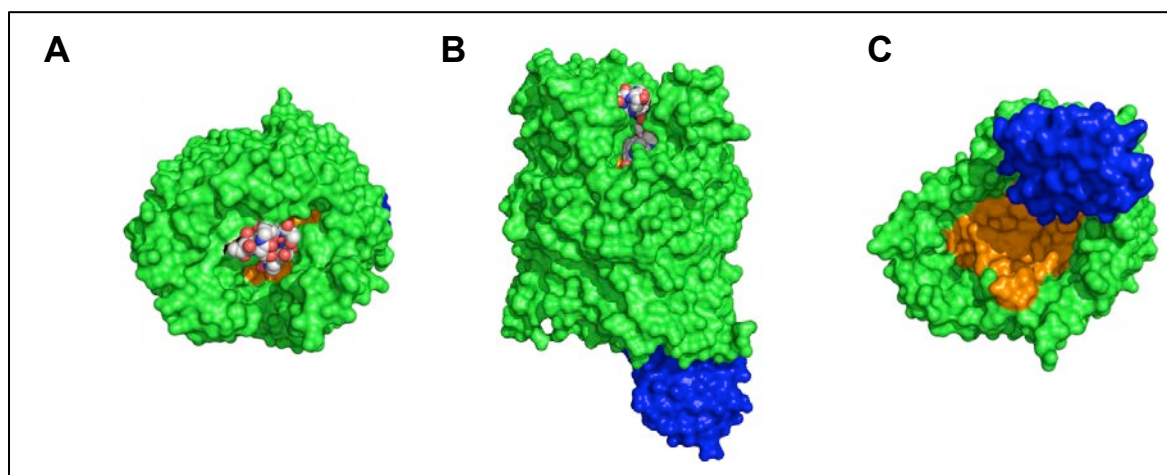


Figure 24 : Représentation de la structure de FpvA en complexe avec la ferri-pyoverdine

Représentation de la structure de FpvA de *P. aeruginosa* liant la pyoverdine ferrique (représentée en sphères de van der Waals) vue du dessus (A), vue de face (B) et vue de dessous (C). La représentation en surface du domaine bouchon (en orange), du tonneau (en vert) et du domaine de signalisation (en bleu) montre l'absence d'un espace suffisant pour la translocation du ligand (PDB 2O5P).

4.2.4 Transport au travers de la membrane cytoplasmique

Après internalisation du substrat dans le périplasma, le sidérophore ferrique doit traverser la membrane interne. Un grand nombre de données montrent que le transport de ferri-sidérophores implique des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et plus récemment des perméases dépendantes de la force proton motrice ont été identifiées : FptX pour la pyochéline (*P. aeruginosa*) (Reimann, 2012), FiuB et FoxB (Cuiv *et al.*, 2007) pour le ferrichrome (*P. aeruginosa*), RthX pour la rhizobactine (*Sinorhizobium meliloti*) (Cuiv *et al.*, 2004). Dans le cas de perméases dépendantes de la force proton motrice aucune protéine de liaison périplasmique n'est mise en jeu.

Le transport de composés comme les ferri-sidérophores ou la vitamine-B₁₂ au travers de la membrane cytoplasmique peut également impliquer des transporteurs ABC (Hollenstein *et al.*, 2007). Ce sont des protéines membranaires intégrales présentes chez toutes les espèces impliquées dans l'export ou l'import de divers composés (Higgins *et al.*, 1992 ; Rees *et al.*, 2009). Ces transporteurs ABC, de type II, couplent l'hydrolyse d'ATP à la translocation d'un substrat au travers de la membrane. Ils sont composés (i) d'une protéine périplasmique de liaison nommée PBP (*Periplasmic Binding Protein*) ou SBP (*Solute Binding Protein*), (ii) d'une

perméase et (iii) d'une ATPase cytoplasmique constituée de domaines très conservés capables de lier et d'hydrolyser l'ATP (Jones *et al.*, 2009 ; Koster, 2001) (**Figure 25**).

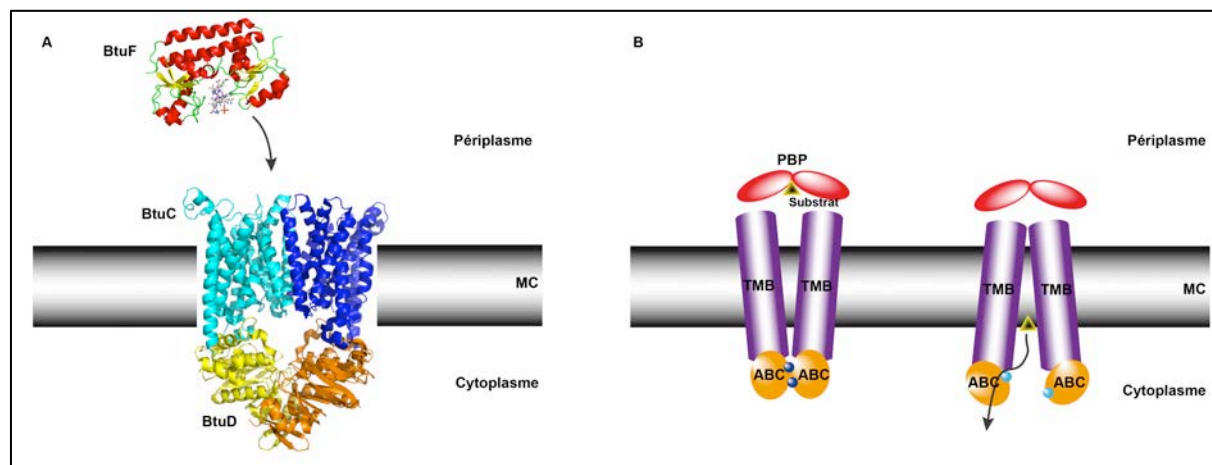


Figure 25 : Représentation de la structure d'un transporteur ABC

(A) Représentation de la structure du transporteur ABC de la vitamine- B_{12} , BtuCD. La protéine périplasmique BtuF (PBP) est représentée en complexe avec la vitamine- B_{12} au niveau du périplasm (PDB 1N2Z). Les deux domaines transmembranaires BtuC (TMB), formant la perméase, sont représentés en cyan et bleu au niveau de la membrane cytoplasmique (MC), les domaines ATPases (ABC) sont représentés en jaune et orange au niveau du cytoplasme (PDB 2QI9). (B) Représentation des deux états conformationnels illustrant le mécanisme permettant la translocation du ligand vers le cytoplasme grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP (sphères bleues) en ADP (cyan).

Dans la plupart des cas, les gènes qui codent pour ces transporteurs se présentent sous forme d'un opéron incluant le gène qui code pour le TBDT. Les domaines transmembranaires de la perméase du transporteur ABC sont codés par deux gènes homologues et peuvent former un homodimère ou un hétérodimère. Ces domaines possèdent en moyenne dix hélices transmembranaires et appartiennent à la famille de type II des transporteurs ABC (Rees *et al.*, 2009 ; Locher, 2009). Ils possèdent un site de liaison pour le substrat et des boucles intra-cytoplasmiques, au niveau de l'hélice 6, qui permettent l'interaction avec les domaines ATPases (Dawson & Locher, 2006 ; Jones *et al.*, 2009, Locher *et al.*, 2009 ; Rees *et al.*, 2009). La perméase est en permanence fermée d'un côté de la membrane afin d'empêcher la diffusion passive de substrats. Les domaines ATPases du transporteur ABC sont codés par un unique gène. Ils se composent de deux lobes présentant cinq séquences conservées (Walker A ou boucle P, Walker B, boucles A, D et Q) et un motif LSGGQ (ou boucle C) qui correspond à la signature de cette famille de protéine. La boucle Q est impliquée dans l'interaction avec les domaines transmembranaires

(Rees *et al.*, 2009). La fixation de deux molécules d'ATP initie la dimérisation des domaines ATPases *via* leur boucle P et leur motif LSGGQ (Hollenstein *et al.*, 2007 ; Locher, 2009 ; Rees *et al.*, 2009 ; Lu & Zgurskaya, 2012). Les protéines périplasmiques, malgré leur faible identité de séquence, partagent des homologies fonctionnelles et structurales importantes. Elles possèdent généralement une séquence signal qui permet l'adressage au niveau du périplasma et sont formées de deux lobes reliés par une chaîne polypeptidique. Chacun des lobes est constitué d'un feuillet β entouré par plusieurs hélices α . Le repliement des deux lobes vers l'intérieur permet la fixation du substrat (Chu *et al.*, 2010). A l'inverse des TBDT qui sont spécifiques d'un sidérophore, les protéines périplasmiques sont spécifiques d'une classe de sidérophores (hydroxamate, catécholate, carboxylate) (Ferguson & Deisenhofer, 2004) (**Figure 26**).

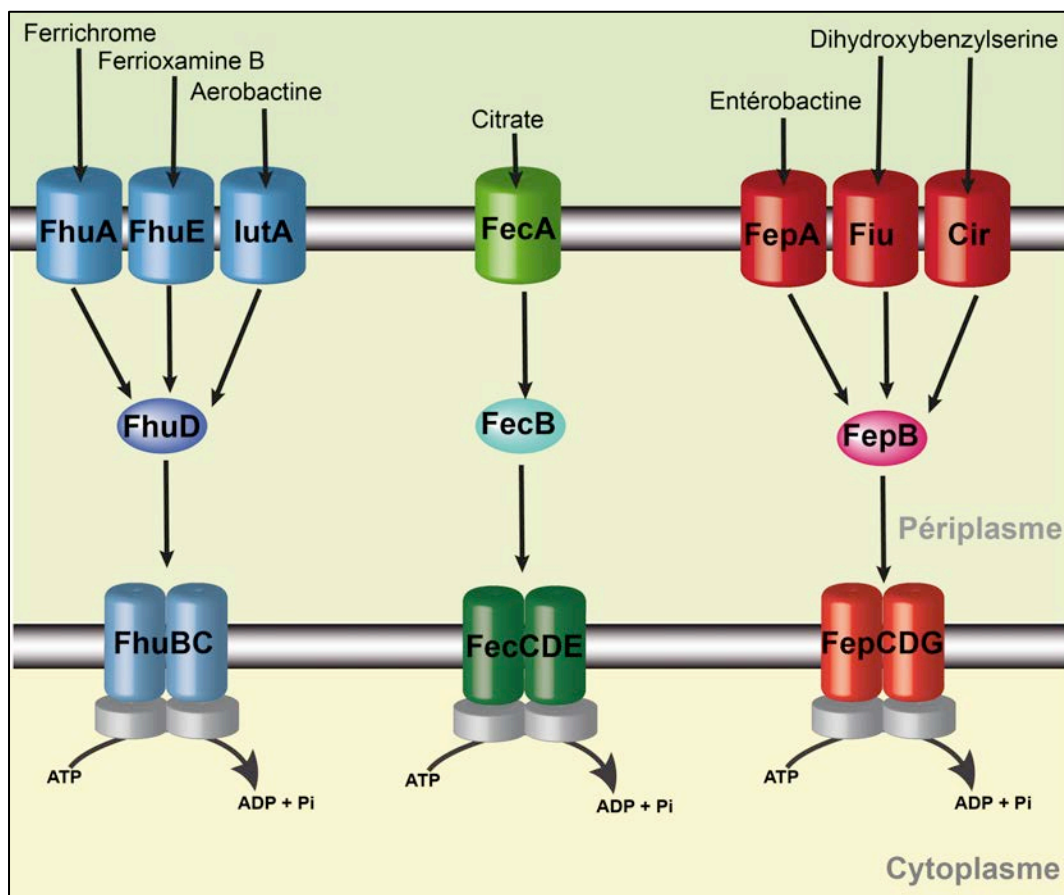


Figure 26 : Schéma des différents systèmes de transport du fer chez *E. coli*

Les transporteurs de la membrane externe FhuA, IutA et FhuE transportent les sidérophores de type hydroxamate. FepA, Cir et Fiu transportent les sidérophores de type catécholate. FecA transporte les sidérophores de type carboxylate comme le citrate. Le transport au travers de la membrane cytoplasmique implique les protéines périplasmiques FhuD (hydroxamates), FepB (catechols) et FecB (carboxylates) associée aux transporteurs ABC FhuBC, FepCDG et FecCDE, respectivement.

Le transporteur ABC de la vitamine-B₁₂ chez *E. coli* est le modèle le mieux décrit et dont les structures ont été résolues. Un mécanisme de transport a été proposé. Premièrement le substrat est transporté au travers de la membrane par un TBDT spécifique, puis il est pris en charge par une protéine périplasmique. Les domaines transmembranaires du transporteur ABC sont ouverts vers le périplasma. La liaison de la protéine périplasmique chargée engendre des changements de conformation au niveau des hélices α des domaines transmembranaires (hélices 3 à 5). Ces domaines se referment grâce à l'hydrolyse de deux molécules d'ATP, générant ainsi l'ouverture du canal qui libère alors le substrat dans le cytoplasme avant de retourner à son état initial (**Figure 25B**) (Locher, 2009 ; Jones *et al.*, 2009 ; Rees *et al.*, 2009 ; Korkhov *et al.*, 2012 ; Mehmood *et al.*, 2012). Même s'il est probable que le mécanisme soit proche, le mécanisme moléculaire de translocation des ferri-sidérophores est encore peu connu. Une étude récente montre que ce mécanisme peut être très spécifique, puisque le transport de deux sidérophores énantiomères (pyochéline et énantioyochéline) au travers de la membrane cytoplasmique adopte deux voies bien distinctes (Reimann, 2012).

4.2.5 Dissociation et recyclage du complexe fer-sidérophore

Pour que le fer puisse être utilisé dans les différents processus métaboliques, il doit être dissocié de son sidérophore. Cette dissociation peut s'effectuer dans le périplasma, comme pour la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Hannauer *et al.*, 2010), ou dans le cytoplasme de la bactérie pour les voies ferrichrome et entérobactine, chez *E. coli* (Hartmann & Braun, 1980 ; Matzanke *et al.*, 1986). Ce mécanisme met en jeu soit une dissociation du ferri-sidérophore par hydrolyse partielle ou totale du sidérophore (Langman *et al.*, 1972 ; Rauscher *et al.*, 2002), soit une dissociation par réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ (Fontecave, 1994 ; Matzanke *et al.*, 2004) ou une modification chimique du sidérophore, comme pour le ferrichrome chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (Hannauer *et al.*, 2010a).

Après dissociation, le sidérophore peut être recyclé dans le milieu extracellulaire afin d'effectuer un nouveau cycle de transport. Ce recyclage a été mis en évidence chez *P. aeruginosa* et implique la pompe à efflux PvdRT-OpmQ qui est également responsable de la sécrétion de sidérophore nouvellement synthétisé (Imperi *et al.*, 2009 ; Hannauer *et al.*, 2010b).

4.3 Transport de l'hème

4.3.1 Acquisition de l'hème via les hémophores

L'acquisition du fer est un paramètre critique pour la survie et la virulence de bactéries pathogènes. Chez l'hôte colonisé, l'hème est la source majeure de fer pour les bactéries pathogènes. Le fer est généralement incorporé dans des molécules d'hème, dans le corps humain 75% du fer est sous forme héminique (Tong & Guo, 2009). L'utilisation de l'hème exogène par des pathogènes humains comme *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marescens*, implique une liaison de l'hème ou des hémoprotéines sur des transporteurs à la surface de la cellule (Tong & Guo, 2009). Une fois dans le cytoplasme, la molécule d'hème est dégradée par une hème oxygénase afin de libérer le fer ferreux (Barker *et al.*, 2012). Les bactéries Gram-négatives et Gram-positives secrètent des hémophores dont la fonction est de capter l'hème environnemental. Les hémophores qui affichent des analogies fonctionnelles avec les sidérophores ont été découverts en 1994 chez *S. marescens* (Letoffe *et al.*, 1994). Ces hémophores sont des protéines qui possèdent une très forte affinité pour l'hème. Ils sont capables d'extraire l'hème des hémoprotéines et de le transférer à un transporteur spécifique au niveau de la membrane externe permettant l'internalisation de la molécule d'hème au niveau du périplasme (Wandersman & Stoljilkovic, 2000).

Trois systèmes d'acquisition de l'hème ont été identifiés chez les bactéries Gram-négatives. Le système le plus connu implique une **liaison directe de l'hème** ou **d'une hémoprotéine** avec un TBDT spécifique, situé au niveau de la membrane externe, ainsi l'hème est transporté dans le périplasme. Ensuite, le passage de l'hème dans le cytoplasme s'effectue *via* un transporteur ABC (Tong & Guo, 2009). Les systèmes les plus connus sont *hemRSTUV* chez *Yersinia enterocolitica* (Stojiljkovic & Hantke, 1992), *hmuRSTUV* chez *Y. pestis* (Hornung *et al.*, 1996 ; Woo *et al.*, 2012), *shuASTUV* chez *Shigella dysenteriae* (Burkhard & Wilks, 2007) et *phuRSTUVW* chez *P. aeruginosa* (Lansky *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2007). Le second système de transport implique un TBDT, un **hémophore extracellulaire** ainsi qu'un transporteur ABC pour le passage au travers de la membrane interne. Le mieux décrit à ce jour est le système *hasRADEB* de *Serratia marescens* (Cescau *et al.*, 2007 ; Krieg *et al.*, 2009 ; Caillet-Saguy *et al.*, 2012). L'hémophore HasA a pour fonction de fixer l'hème

libre ou d'extraire l'hème des hémoprotéines au niveau du milieu extracellulaire. Le complexe formé interagit avec un TBDT spécifique, HasR, au niveau de la membrane externe. Chez *N. meningitidis* un troisième **système d'acquisition bipartite** a été mis en évidence. Il implique un TBDT de la membrane externe HpuB et une lipoprotéine membranaire associée HpuA. Ce récepteur bipartite est en mesure d'extraire et de transporter l'hème issu de l'hémoglobine ou du complexe haptoglobine-hémoglobine (Lewis *et al.*, 1998 ; Tong & Guo, 2009). On notera également que l'hème libre est capable de diffuser passivement au travers des membranes (**Figure 27B**).

4.3.2 Transport direct de l'hème

Le transport direct de l'hème chez les bactéries Gram-négatives est un système très conservé. Les bactéries pathogènes sécrètent de l'hémolysine capable de générer la lyse des érythrocytes et la libération de l'hémoglobine. Chez *P. aeruginosa* le système *phu* est capable d'utiliser cette hémoprotéine comme source d'hème. Le transporteur PhuR est en mesure de reconnaître et de transporter l'hème à partir de l'hème libre, ou issu de l'hémoglobine, de l'hémopexine, de la myoglobine ou du complexe hémoglobine-haptoglobine. Après son passage dans le périplasme, l'hème est lié par la protéine de liaison périplasmique PhuT. Un transporteur ABC au niveau de la membrane interne, composé des protéines PhuUVW, transfère l'hème vers une protéine chaperonne PhuS, au niveau du cytoplasme (Ochsner *et al.*, 2000 ; Ho *et al.*, 2007). Une fois dans le cytoplasme, PhuS libère l'hème vers une hème oxygénase (HemO) (O'Neill *et al.*, 2012) qui ouvre l'anneau porphyrique libérant le Fe^{2+} , du monoxyde de carbone et de la biliverdine. Le groupe de gènes codant pour ce système de transport est régulé négativement par la protéine Fur (**Figure 27**).

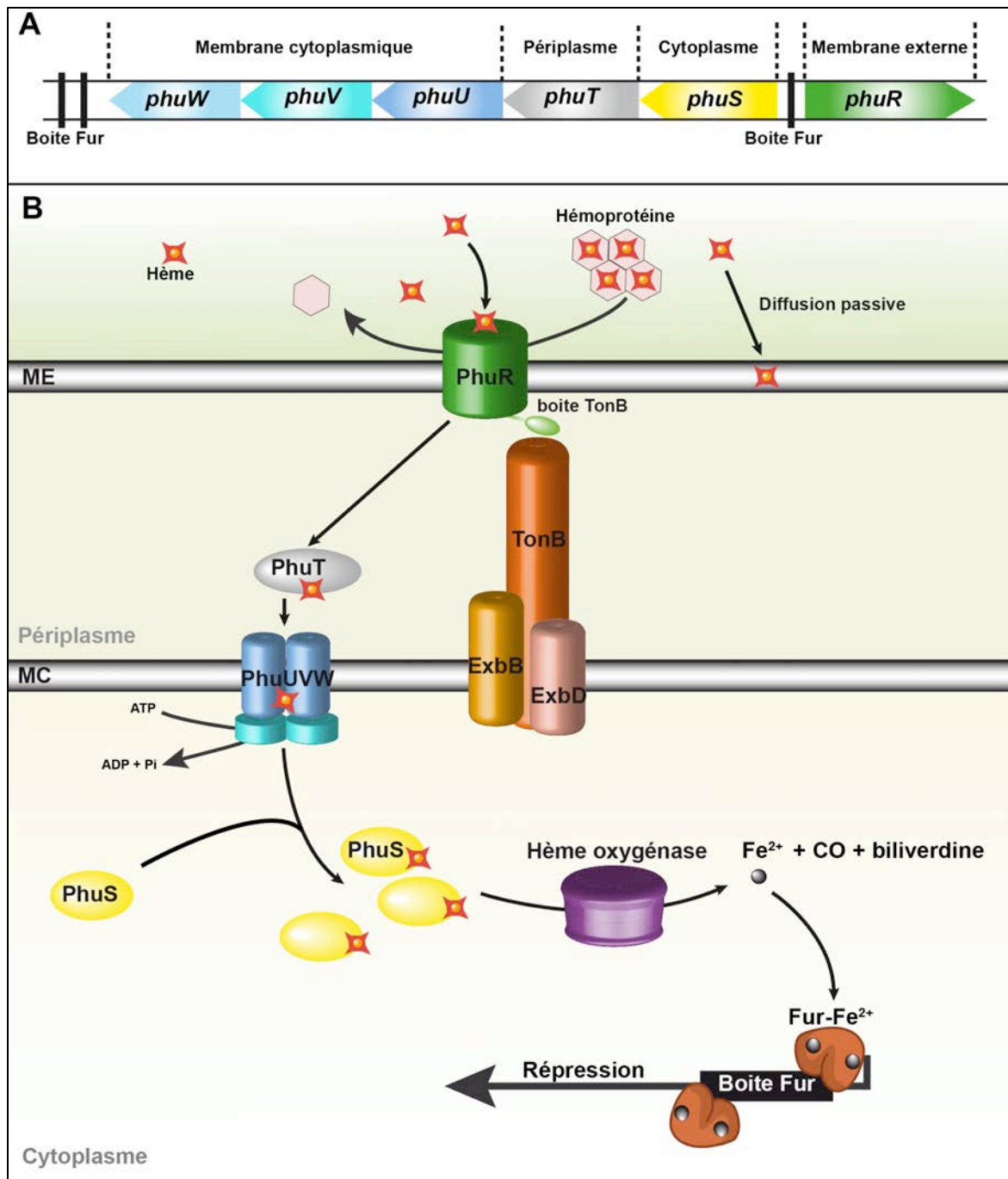


Figure 27 : Représentation schématique du transport direct de l'hème

Représentation schématique de l'opéron *phu* chez *P. aeruginosa* (**A**) et représentation du mécanisme de transport de l'hème (**B**). L'hème peut diffuser de manière passive au travers de la membrane. Cependant, l'hème et les hémoprotéines peuvent être reconnus par le transporteur *PhuR*, de la membrane externe. L'hème est alors transporté vers le périplasme grâce à l'énergie fournie par le système *TonB*. La protéine périplasmique *PhuT* transmet l'hème au transporteur ABC *PhuUVW*, de la membrane cytoplasmique (MC). Ce dernier internalise la molécule au niveau du cytoplasme. *PhuS* incorpore l'hème avant sa dégradation par l'hème oxygénase, libérant ainsi le Fe^{2+} . Le fer ferreux peut alors se lier à la protéine *Fur* afin de réguler l'expression du système.

4.3.3 Systèmes de transport de l'hème via les hémophores

Les hémophores bactériens sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Grâce à une affinité supérieure, ils récupèrent l'hème de différentes hémoprotéines. Deux systèmes de transport de l'hème *via* des hémophores ont été identifiés : le système *has* et le système *hxu*.

4.3.3.1 *Le système d'acquisition *has* et son hémophore*

L'hémophore de type HasA (Heme acquisition system) a été identifié chez *S. marescens*. Cet hémophore est conservé chez plusieurs bactéries Gram-négatives, notamment *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Y. pestis* ou *Y. enterocolitica* (Letoffe *et al.*, 1998). Il est capable de lier l'hème libre ou d'extraire l'hème à partir de protéines de stockage comme l'hémoglobine, l'hémopexine ou la myoglobine (Wandersman & Delepelaire, 2012). HasA est une protéine globulaire monomérique de 19 kDa dont la structure en complexe avec l'hème a été résolue (Arnoux *et al.*, 1999). HasA est composée de deux faces : une de quatre hélices α et l'autre de sept brins β . HasA possède une affinité de 18 pM pour l'hème (Izadi *et al.*, 1997). La liaison se fait grâce aux résidus His-32, Tyr-75 et His-83 présents sur les deux boucles des deux faces (**Figure 28**) (Arnoux *et al.*, 1999). Si on compare la forme holo-HasA à la forme apo-HasA, on observe un déplacement de 30 Å de la boucle portant l'histidine-32 (Wandersman & Stoljilkovic, 2000). Des études sur la liaison de l'hème montre qu'il s'agit d'un mécanisme à deux étapes, dans un premier temps l'hème se lie à la Tyr-75. Cette liaison engendre dans un second temps le repliement de la boucle portant l'His-32 qui vient piéger la molécule d'hème (Yukl *et al.*, 2010).

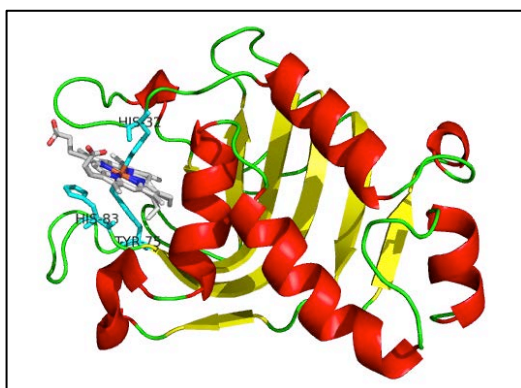


Figure 28 : Représentation de la structure l'hémophore HasA

Représentation de la structure de l'hémophore HasA lié à une molécule d'hème (en gris), les résidus (His-32, His-83 et Tyr-75) impliqués dans la liaison sont représentés en cyan (PDB 1B2V).

Un alignement de séquence montre une identité de séquence allant de 30 à 50% selon les espèces (Tong & Guo, 2009). Les variabilités majeures sont situées au niveau des deux boucles piégeant la molécule d'hème. Les quatre derniers résidus en position C-terminale sont conservés et contiennent la séquence signal pour la sécrétion de l'hémophore (Figure 29). Parmi les trois résidus liant la molécule d'hème, l'His-83 et la Tyr-75 sont conservés alors que l'His-32 peut être remplacée par une glutamine ou un aspartate selon les espèces (Figure 29).

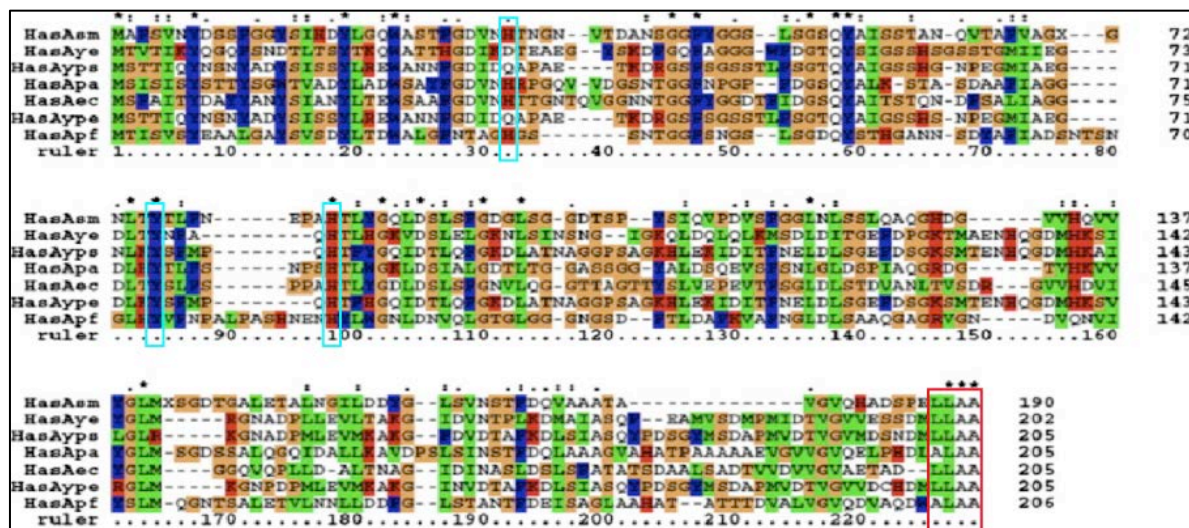


Figure 29 : Alignement des séquences de l'hémophore HasA

Alignement des séquences protéiques de l'hémophore HasA chez *S. marescens* (sm), *Y. enterocolitica* (ye), *Y. pseudotuberculosis* (yps), *P. aeruginosa* (pa), *Erwinia carotovora subsp. Artroseptica* (ec), *Y. pestis* (ype) et *P. fluorescens* (pf). Les quatre derniers résidus, conservés chez HasA, sont encadrés en rouge. Les résidus conservés impliqués dans la liaison de la molécule d'hème sont encadrés en cyan. Adaptée de (Tong & Guo, 2009).

L'hémophore HasA se lie à un transporteur spécifique HasR. Comme les autres TBDT, la translocation de l'hème vers le périplasme par HasR, dépend de l'énergie fournie par la protéine HasB (protéine homologue à TonB) (Lefevre *et al.*, 2008 ; Braun & Hantke, 2011). HasR se compose d'un tonneau à 22 brins β anti-parallèles et d'un domaine bouchon. Deux histidines sont conservées, l'His-189 au niveau du domaine bouchon et l'His-603 du tonneau responsable de liaison de l'hème. Le transfert de l'hème de HasA vers le transporteur HasR s'effectue via des interactions protéiques impliquant les boucles L6, L8 et L9 du transporteur et deux feuillets β de HasA (résidus 51-60 et 95-105) (Figure 30) (Barjon *et al.* 2007 ; Wandersman & Delepelaire, 2012). Lorsque les deux protéines interagissent, l'affinité de HasA pour l'hème diminue et devient inférieure à celle de HasR,

permettant ainsi le transfert de l'hème vers son transporteur (Caillet-Saguy *et al.*, 2012). HasR est également capable de lier et de transporter l'hème libre (Krieg *et al.*, 2009 ; Smith & Wilks, 2012).



Figure 30 : Représentation de la structure du complexe HasA-HasR

Représentation de la structure du transporteur HasR liant le complexe HasA-hème (PDB 3CSL). Le transporteur HasR se compose d'un tonneau à 22 brins β (en cyan) obstrué par un domaine bouchon (en rouge). Les longues boucles L6, L8 et L9 et les deux feuillets β de HasA impliqués dans la liaison de l'hémophore sont représentés respectivement en bleu et en mauve. Les résidus His-603 du tonneau et His-189 du bouchon responsable de la liaison de l'hème, ainsi que les His-83 et Tyr-75 de l'hémophore, sont représentés sous forme de bâtonnets. Une partie de la structure du tonneau a été retirée afin de visualiser le domaine bouchon à l'intérieur de HasR.

4.3.3.2 Le système d'acquisition *hxu* et son hémophore

Un système à hémophore *hxu* (Hemopexin utilization) a été décrit chez *Haemophilus influenzae* (Cope *et al.*, 1995), et qui a besoin d'hème exogène pour sa croissance en conditions aérobies. Un groupe de trois gènes, *hxA*, *hxB*, *hxC* est nécessaire pour l'utilisation du complexe hème-hémopexine (Tong & Guo, 2009). L'hémophore HxA est une protéine sécrétée de 100 kDa (Cope *et al.*, 1994 ; Fournier *et al.*, 2011). Selon la souche, HxA est soit ancré dans la membrane, soit présent dans le milieu extracellulaire (Wong *et al.*, 1995). HxA reconnaît le complexe hème-hémopexine et libère l'hème à proximité de HxC, récepteur de la membrane externe appartenant à la classe des TBDT (Cope *et al.*, 1994 ; Cope *et al.*, 1995 ; Fournier *et al.*, 2011 ; Wandersman & Delepelaire, 2012). Il n'y aurait pas

réellement de capture de l'hème par HxuA, comme pour HasA, mais la libération de l'hème à proximité du transporteur permet de favoriser sa liaison (Wandersman & Delepelaire, 2012).

Le seul hôte pour *H. influenzae* est l'homme. Cette bactérie pathogène est responsable d'un grand nombre d'infection locale (otites, méningites...). Cette espèce ne possède pas de voie de biosynthèse d'hème alors que celui-ci est nécessaire pour sa croissance en conditions aérobies. *H. influenzae* a la particularité d'exprimer un grand nombre de TBDT, l'un d'eux appartenant au système *hxuABC*. Il permet d'internaliser l'hème provenant de l'hémopexine (Cope *et al.*, 1998). Comme pour les autres types de TBDT, ce transport est dépendant de l'énergie véhiculée par le système TonB de la membrane interne.

Les alignements réalisés sur plusieurs souches d'*H. influenzae* montrent une homologie de séquence de 66% pour HxuA. La protéine HxuB est une protéine de 60 kDa, impliquée dans la sécrétion de l'hémophore HxuA (Cope *et al.*, 1994). En revanche, HxuC est nécessaire pour le transport de l'hème et semble fonctionner comme un transporteur TonB-dépendant de la membrane externe (Morton *et al.*, 2007). HxuB et HxuC ont également des séquences très conservées, avec respectivement 91 et 83% d'homologie. L'ensemble de ces trois gènes est nécessaire pour le transport de l'hème libre ou de l'hème issu du complexe hème-hémopexine, *in vivo*. Ainsi, ces deux protéines représentent des cibles de choix pour la création de vaccin contre le pathogène *H. influenzae* (Morton *et al.*, 2007).

4.3.4 Transport de l'hème via un récepteur bipartite HpuAB chez *Neisseria meningitidis*

La bactérie *N. meningitidis* est un pathogène exclusivement humain et responsable de pathologies comme la méningite. En parallèle des systèmes de transport de fer à partir d'hémoprotéines comme la transferrine ou la lactoferrine, cette espèce exprime un transporteur de l'hème TonB-dépendant à deux partenaires, le transporteur HpuAB. Il est capable de transporter l'hème lié à l'hémoglobine mais préférentiellement celui issu de complexes hémoglobine-haptoglobine (Rohde & Dyer, 2004). Les alignements de séquence, basés sur les structures cristallographiques de FepA, FhuA et FecA, permettent d'établir que la protéine HpuB (85 kDa) est un transporteur de la membrane externe. Il est formé d'un

tonneau β dont le pore est obstrué par un domaine bouchon en position N-terminale (Rohde & Dyer, 2004). Des expériences de liaison d'hémoglobine, marquée à l' ^{125}I ode, réalisées sur différents mutants ont permis d'établir que ce transporteur est capable d'interagir avec la protéine TonB (Rohde *et al.*, 2002). HpuA est une lipoprotéine périphérique associée au transporteur HpuB. L'absence de transport chez des simples mutants de HpuA ou HpuB montre que ces deux protéines sont absolument nécessaires pour l'acquisition de l'hème. En présence d'hémoglobine-hème la majorité du transporteur n'est pas capable de lier son ligand (Rohde *et al.*, 2002). Seulement une petite sous population présente un site de liaison. L'interaction avec la protéine TonB déplace cet équilibre et permet la translocation du complexe hème-fer dans le périplasma (**Figure 31**) (Rohde *et al.*, 2002 ; Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002).

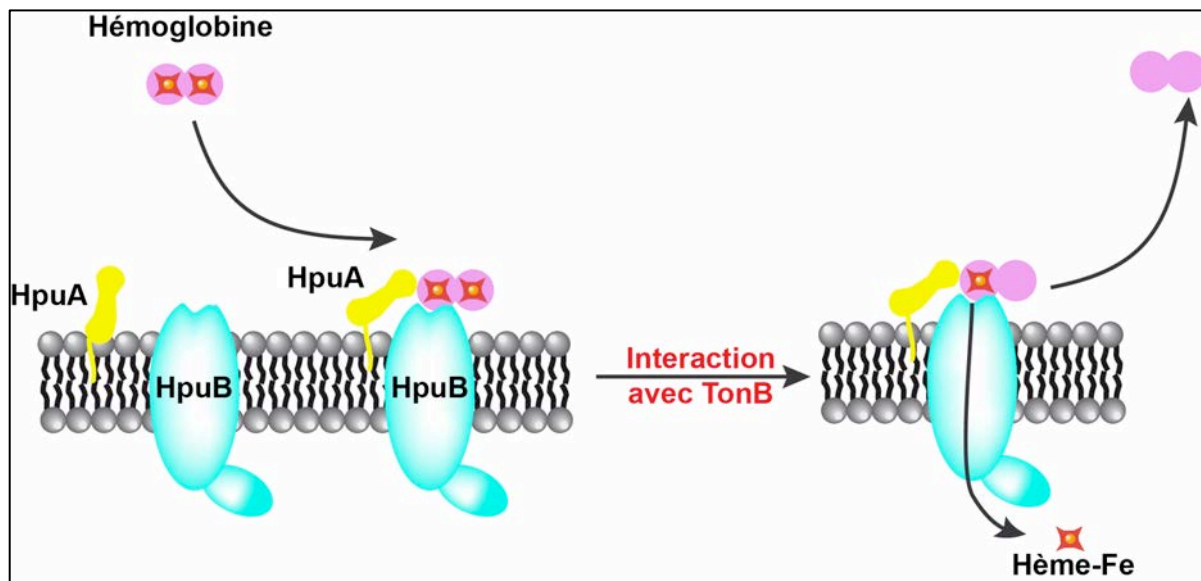


Figure 31 : Représentation schématique du transport de l'hème via HpuAB.

*Représentation schématique du transport de l'hème chez *N. meningitidis* via le transporteur bipartite HpuAB. En absence d'énergie la majorité du complexe HpuAB n'est pas correctement associée pour lier l'hémoglobine-hème. Cependant un petit sous ensemble de la population de HpuAB est capable de lier le complexe au niveau d'un site de haute affinité mais il n'y a pas de transport. L'énergisation grâce à la protéine TonB favorise une conformation de HpuAB capable de lier l'hémoglobine avec une haute affinité. Ensuite le complexe hème-fer est internalisé et l'apo-hémoglobine relarguée.*

4.3.5 Transport de l'hème au travers de la membrane externe

Chez les bactéries Gram-négatives, l'hème libre ou l'hème issu d'hémoprotéines est transporté dans le périplasme grâce à des TBDT. Plus d'une trentaine de ces transporteurs ont été identifiés chez un large panel de bactéries Gram-négatives (Wandersman & Stoljilkovic, 2000 ; Tong & Guo, 2009). Le transporteur HemR chez *Y. enterocolitica* a été largement étudié. Des expériences de mutagenèse montrent que deux résidus conservés (His-128 et His-461) sont impliqués dans la liaison de la molécule d'hème. Ils sont situés entre les deux motifs conservés que sont les boîtes FRAP et NPL (Bracken *et al.*, 1999). Certaines souches comme *Bordetella pertussis*, *B. bronchiseptica*, *P. fluorescens* ou *P. aeruginosa* expriment des TBDT (BhuR, PfhR et PhuR respectivement) qui ne possèdent pas ces deux motifs. Cette observation suggère une différence au niveau des mécanismes de liaisons. En fonction de la concentration d'hème dans le milieu extracellulaire, certains transporteurs d'hémophores peuvent lier l'hème libre aussi bien que le complexe hémophore-hème, c'est le cas du transporteur HasR chez *S. marescens*. En 2007, chez *Shigella dysenteriae* un nouveau transporteur ShuA a été caractérisé. Des expériences de mutagenèse montrent que les His-86 et His-420 sont essentielles pour la reconnaissance, la liaison et le transport de l'hème (Burkhard & Wilks, 2007).

Les structures connues de ShuA (Cobessi *et al.*, 2010), HasR (Krieg *et al.*, 2009) et un modèle réalisé de HmuR suggèrent que les TBDT spécifiques du transport de l'hème sont composés de deux domaines. Le premier domaine est un tonneau β pourvu de longues boucles extracellulaires et de coudes courts au niveau du périplasme. Le deuxième domaine, en position N-terminale, est un domaine bouchon qui vient obstruer le pore du tonneau. La liaison de l'hème implique toujours des histidines au niveau du site de liaison. Ces structures en forme de tonneau s'avèrent essentielles et nécessaires pour le transport de l'hème au travers de la membrane externe (Tong & Guo, 2009). Le transport de l'hème est dépendant du système TonB qui permet l'énergisation du transporteur.

4.3.6 *Transport de l'hème vers le cytoplasme*

Globalement le transport de l'hème vers le cytoplasme de la bactérie est très proche du transport des ferri-sidérophores. Lorsque l'hème passe dans le périplasma, il est lié par une protéine de liaison périplasmique spécifique de l'hème (nommé HTP ou HBP) appartenant à un transporteur ABC de la membrane interne. Plusieurs HBP ont été identifiées et caractérisées chez différentes espèces, elles partagent 30 à 90% d'identité de séquence (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002). On remarque qu'une tyrosine est très conservée (Tyr-71 chez PhuT, Tyr-67 chez ShuT). La structure cristallographique de ShuT montre que cette tyrosine conservée peut être impliquée dans la liaison axiale de l'hème entre les deux lobes (**Figure 32**) (Ho *et al.*, 2007). La liaison de l'hème sur les HBP induit un changement de conformation au niveau du site de liaison, notamment la réorientation de la tyrosine qui joue un rôle majeur dans la fixation et la libération de la molécule d'hème.

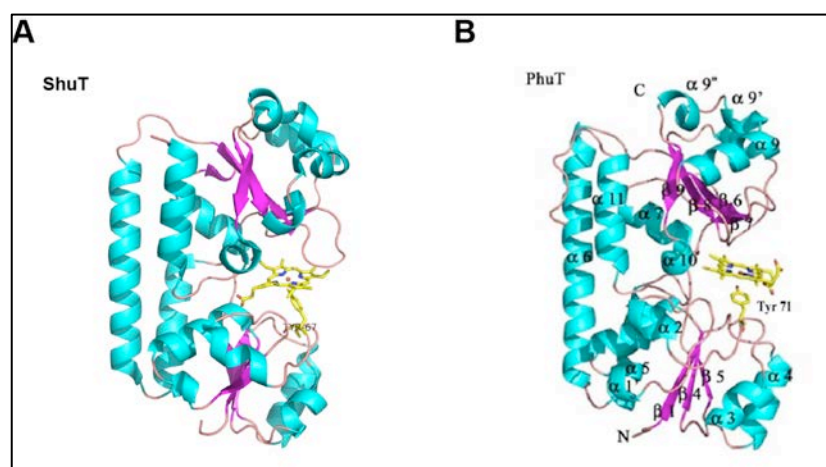


Figure 32 : Représentation des structures des protéines ShuT et PhuT

Représentation des structures des protéines périplasmiques de liaison de l'hème ShuT (A) chez S. dysenteriae (PDB 2R7A) et PhuT (B) chez P. aeruginosa (Tong & Guo, 2009). La Tyr-67 de ShuT, la Tyr-71 de PhuT et la molécule d'hème sont représentées sous forme de bâtonnets jaunes. Ces résidus conservés participent à la liaison de la molécule d'hème.

Le transport vers le cytoplasme implique ensuite un transporteur ABC, de type II (Woo *et al.*, 2012). Ce transporteur est composé d'une perméase et d'une ATPase spécifique de l'hème. Le transport du ligand requiert une interaction entre l'HBP et un motif EAAXXXG de la perméase correspondante (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002). La translocation de l'hème dans le cytoplasme est dépendante de l'hydrolyse d'ATP (Tong & Guo, 2009 ; Woo *et al.*, 2012).

4.3.7 *Dissociation du complexe hème-fer dans le cytoplasme*

Avant d'être pris en charge par une hème oxygénase, l'hème est séquestré par une protéine de liaison au niveau du cytoplasme. Chez *P. aeruginosa* la protéine PhuS a été identifiée au niveau de l'opéron *phu*. Cet intermédiaire permet notamment d'éviter la toxicité liée à un excès d'hème libre. Chez *Bartonella henselae*, la protéine HemS est capable à la fois de lier l'hème au niveau du cytoplasme mais également de le dégrader (Liu *et al.*, 2012). Ces protéines de liaison cytoplasmiques possèdent une poche de fixation formée par trois hélices α et un feuillet β en forme de dôme (**Figure 33**). Au niveau de la structure de cette protéine, l'His-196 coordonne le fer du complexe hème-HemS. L'Arg-102 est également impliquée dans la stabilisation de la liaison (Schneider *et al.*, 2006). Une fois dans le cytoplasme, l'hème est rapidement lié par une hème oxygénase permettant ainsi aux bactéries d'extraire le fer (Wilks, 2002).



Figure 33 : Représentation de la structure du complexe Hème-HemS

Représentation de la structure de HemS en complexe avec l'hème (PDB 2J0P). L'hème est représenté sous forme de bâtonnet avec l'atome de fer central représenté en sphère de van der Waals. Les résidus impliqués dans la liaison de l'hème (His196 et Arg102) sont représentés en bâtonnets.

Le transfert de la molécule d'hème entre les protéines PhuS chez *P. aeruginosa* et l'hème oxygénase HemO est un mécanisme induit par liaison de l'hème. Des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) ont montrées que PhuS et HemO s'associaient avec une stoechiométrie 1:1 lorsque PhuS était chargée en hème. Cette liaison d'hème sur PhuS génère des changements conformationnels au niveau de deux histidines (His-209 et His-212). Le complexe hème-PhuS induit une interaction avec HemO et le passage de l'hème vers l'hème

oxygénase (O'Neill *et al.*, 2012). Des travaux récents ont montré que PhuS ou HemS avaient une double fonction : (i) dans le transfert de l'hème vers l'hème oxygénase, (ii) dans la régulation du taux de fer et d'hème intracellulaire (Kaur *et al.*, 2009 ; Barker *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2012).

Chez *E. coli* un mécanisme d'extraction du fer sans altération de la protoporphyrine a été mis en évidence. Ce mécanisme implique la protéine EfeB qui est capable d'extraire le fer de l'hème au niveau du périplasme, le fer est alors transporté dans le cytoplasme sans l'action d'une perméase de la membrane interne. La protéine YfeX prendrait en charge le fer internalisé (Letoffe *et al.*, 2009).

4.4 Acquisition du fer *via* la transferrine et la lactoferrine

4.4.1 Acquisition du fer grâce à un transporteur bipartite

Certains pathogènes appartenant aux familles de *Pasteurellaceae*, *Moraxellaceae* et *Nisseriaceae* possèdent des systèmes capables d'assimiler le fer à partir de la transferrine ou de la lactoferrine (Yang *et al.*, 2011). Ces bactéries sont notamment responsables d'infections majeures chez l'homme comme la méningite, la pneumonie, l'otite ou la blennorragie. Certaines de ces bactéries ne sont pas capable de produire de sidérophores pour acquérir le fer et utilisent donc le fer lié à la transferrine (Tf) et la lactoferrine (Lf) pour se développer chez l'hôte.

La première protéine de liaison de la transferrine (Tbp) a été identifiée chez *Neisseria gonorrhoeae* (Cornelissen & Hollander, 2011). Ce système de transport se compose de deux partenaires protéiques : un TBDT (TbpA) et un co-récepteur (TbpB) qui est une lipoprotéine.

TbpA présente une structure composée d'un tonneau à 22 brins β dont le pore est obstrué par un domaine bouchon. La structure du transporteur TbpA a été résolue en 2012 en complexe avec la transferrine humaine révélant une partie du mécanisme moléculaire de la translocation du fer (Noinaj *et al.*, 2012a).

La lipoprotéine TbpB est exposée à la surface de la cellule et lie de manière préférentielle la transferrine chargée en fer (Calmettes *et al.*, 2011). TbpB participe à l'extraction du fer en synergie avec TbpA, et pourrait être impliquée dans le relargage de la transferrine (Siburt *et al.*, 2009 ; Noinaj *et al.*, 2012b). *In vivo*, TbpB est un facteur essentiel à la colonisation de l'hôte. Sa structure montre que TbpB est composée de deux lobes, présentant chacun huit brins β . Le lobe N permet

l'interaction avec le lobe C de la Tf, impliquant les résidus His-143, Asp-159 et Lys-206 du lobe N de TbpB et l'His-349 du lobe C de la Tf. Cette interaction fige la conformation de la transferrine dans un état fermé afin de séquestrer l'atome de fer (**Figure 34**). Le lobe C de TbpB interagit avec la Tf mais avec une plus faible affinité (Noinaj *et al.*, 2012b).

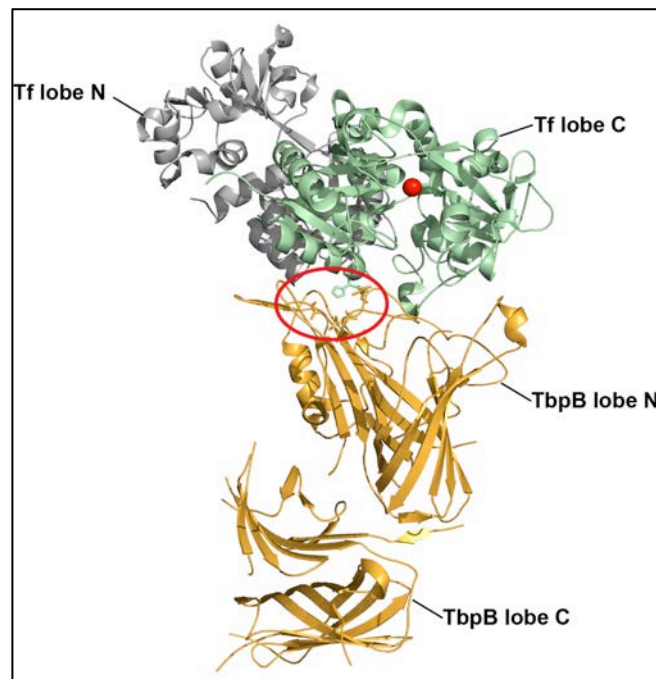


Figure 34 : Représentation de TbpB et de son interaction avec la transferrine.

Représentation de la structure du co-récepteur TbpB (en orange) de N. meningitidis lié à la transferrine humaine (Tf) (lobe C en vert et lobe N en gris) (PDB 3VE1). Le lobe N de TbpB permet la liaison avec le lobe C de la transferrine impliquant les résidus His-143, Asp-159 et Lys-206 du lobe N de TbpB et l'His-349 du lobe C de la transferrine (représentés sous forme de bâtonnets dans le cercle rouge). L'atome de fer est représenté en sphère de van der Waals (en rouge).

Chez ce type de bactéries pathogènes, une deuxième voie d'acquisition du fer *via* la lactoferrine a été identifiée, impliquant un transporteur spécifique LbpA et un co-récepteur associé, la lipoprotéine LbpB (Beddek & Schryvers, 2010).

D'après l'homologie de séquence avec les TBDT, LbpA se compose également d'un tonneau à 22 brins β et d'un domaine bouchon en position N-terminale qui permet le transport du fer au travers de la membrane. Les alignements de séquence des parties N-terminales de LbpA montre que la boîte TonB possède une séquence conservée KEI/VTV, différente de celle des autres TBDT. Au niveau de l'opéron *lbp*, on trouve également un co-récepteur LbpB. Bien qu'aucune donnée structurale ne soit actuellement disponible, cette protéine

présenterait probablement une structure à deux lobes, proche de celle de TbpB. Cependant, LbpB posséderait deux régions supplémentaires, chargées négativement, au niveau du lobe C-terminal. Au vue du nombre important de charges positives présentent sur la Lf, ces deux régions additionnelles de LbpB sembleraient être impliquées dans l'interaction spécifique avec la lactoferrine (Beddek & Schryvers, 2010).

4.4.2 Mécanisme de transport du fer au travers de la membrane externe

Le modèle actuel pour le transport du fer *via* la transferrine implique tout d'abord une liaison de la Tf avec TbpB, puis la formation d'un complexe TbpA-TbpB-transferrine, où TbpA et TbpB interagissent avec le lobe C de la Tf (**Figure 35B**). La formation de ce complexe serait dépendante de l'état d'énergisation de TbpA grâce à la protéine TonB. L'assemblage de ce complexe, génère la formation d'une poche ou chambre (d'environ 1000 Å³) qui permet d'orienter et de guider l'atome de fer au niveau du TBDT en vue de son passage vers le périplasme.

Le transporteur TbpA possède de longues boucles extracellulaires qui interagissent avec la transferrine (**Figure 35A**). Celles-ci peuvent s'étendre jusqu'à 60 Å au dessus de la membrane cellulaire : une longue boucle du tonneau, impliquée dans le transport du fer, se situe 25 Å au dessus du niveau de la membrane (Noto & Cornelissen, 2008 ; Noinaj *et al.*, 2012a). Des études réalisées sur des mutants montrent qu'un grand nombre de résidus présents dans les boucles, dans le domaine bouchon ou au niveau du tonneau β , sont essentiels pour lier la transferrine mais également pour la translocation du fer (Noinaj *et al.*, 2012b). Une hélice au niveau de la boucle L3 est impliquée dans la dissociation du complexe transferrine-fer, en venant s'insérer dans la fente du lobe C de la Tf. Cette insertion permet à la Leu-359 de TbpA d'interagir avec l'Asp-634 de la Tf et de briser l'interaction de charge entre les résidus Lys-534 et Arg-632 de la Tf (**Figure 35C**). La longue boucle du domaine bouchon vient également interagir avec la surface de la Tf. Ces deux interactions permettent d'ouvrir la structure du lobe C de la Tf de 24°, pouvant alors libérer l'atome de fer. Ensuite, la translocation du fer au travers de TbpA met en jeu une séquence conservée EIEYE, au niveau du domaine bouchon,

capable de coordonner le fer et de canaliser son passage de la chambre vers le périplasma (**Figure 35D**) (Noinaj *et al.*, 2012a).

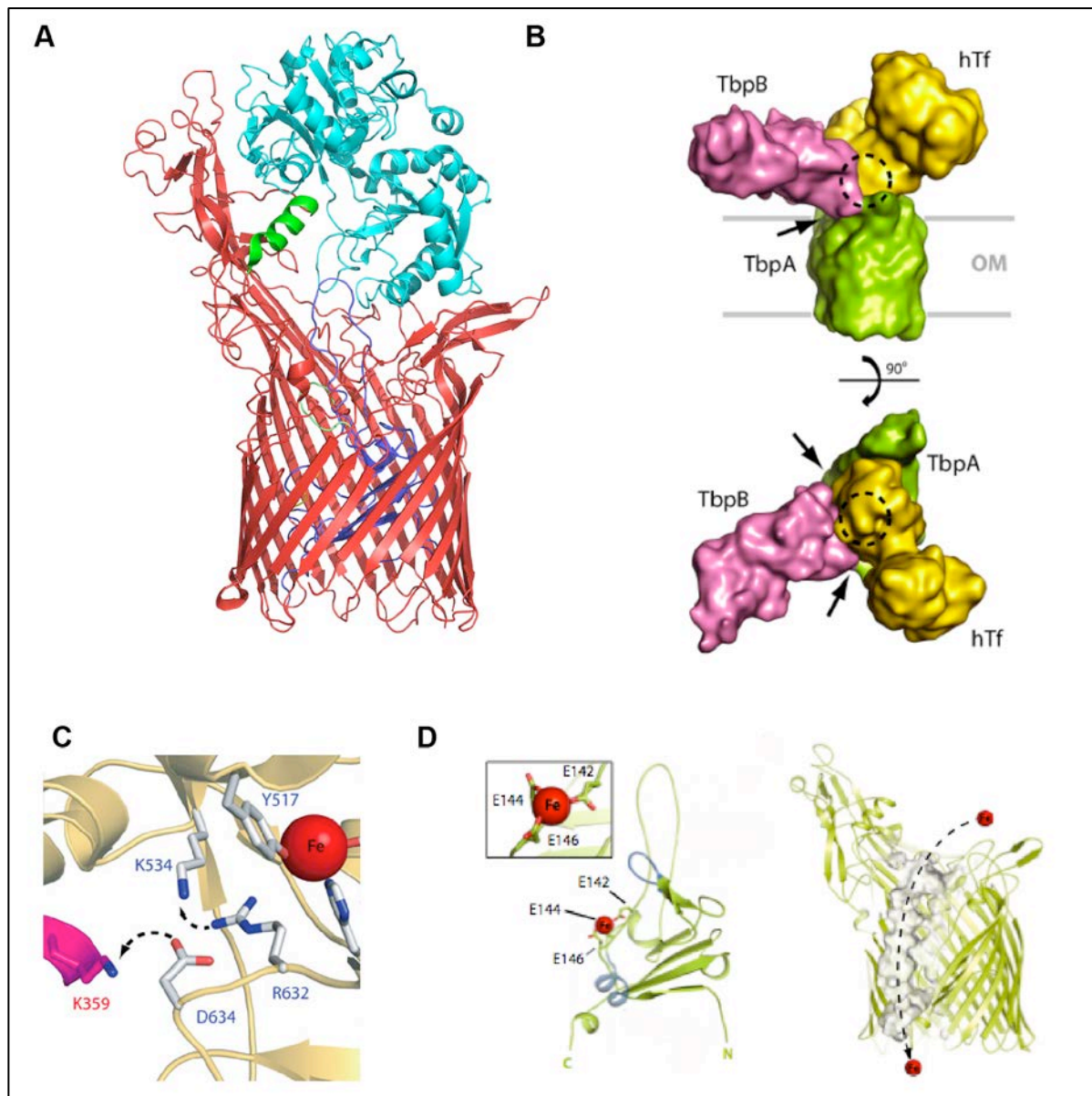


Figure 35 : Acquisition du fer de la transferrine via le complexe TbpA-TbpB

(A) Représentation de la structure du transporteur TbpA en complexe avec la transferrine (PDB 3V89). Le tonneau β , composé de longues boucles extracellulaire, est représenté en rouge avec en vert l'hélice de la boucle L3 et le domaine bouchon en bleu. La transferrine est représentée en cyan. (B) Représentation du complexe TbpA-TbpB-Tf. Chacune des protéines est représentée en surface et les flèches indiquent les zones d'interactions entre TbpA et TbpB, le cercle pointillé indique la position de la chambre créée lors de la formation de ce complexe (Noinaj *et al.*, 2012b). (C) L'interaction entre la Lys-359 de la boucle L3 de TbpA et l'Asp-634 de la transferrine permet de libérer l'interaction de charges des résidus Lys-534 et Arg-632 de la Tf (Noinaj *et al.*, 2012a) et d'ouvrir la fente du lobe C de la Tf. (D) La séquence conservée EIEYE de TbpA crée un passage au sein du tonneau qui permet la translocation du fer vers le périplasma (Noinaj *et al.*, 2012b).

4.4.3 *Transport du fer à travers la membrane cytoplasmique*

Suite au transport du fer, la protéine de liaison périplasmique FbpA vient lier l'atome de Fer. Cette protéine de 37 kDa (**Figure 36**) possède un lobe proche de celui de la transferrine qui permet la coordination du fer (Parker Siburt *et al.*, 2012). Différentes études ont montrées que FbpA sous sa forme apo interagit avec le transporteur TbpA (Siburt *et al.*, 2009). Lorsque le domaine bouchon libère le fer à la sortie du tonneau β , la proximité de FbpA facilite son transfert vers la protéine de liaison spécifique. Dès lors que le complexe FbpA-Fe est formé, son affinité pour TbpA diminue. FbpA-Fe traverse alors l'espace périplasmique pour s'associer à une perméase FbpB qui appartient au transporteur ABC (Sebastian & Genco, 1999). Ce transporteur FbpBC transporte le fer du périplasme vers le cytoplasme grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP au niveau de FbpC (Cornelissen & Hollander, 2011).

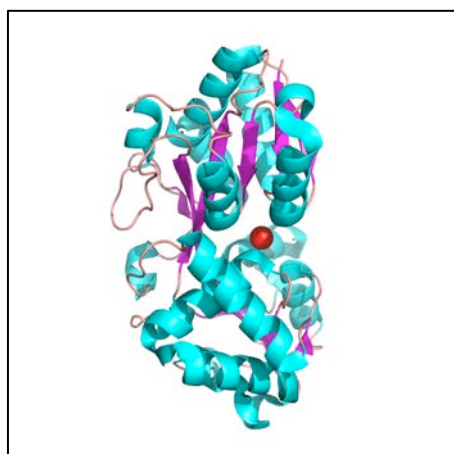


Figure 36 : Représentation de la structure de la protéine FbpA liée au fer

Représentation de la structure de la protéine de liaison FbpA lié à un atome de fer, en rouge (PDB 1D9Y).

4.5 Régulation de l'acquisition des systèmes de transport du fer

Précédemment nous avons vu que le fer est un élément essentiel pour la croissance bactérienne. Pour acquérir et transporter le fer environnemental à l'intérieur de la cellule, les bactéries ont développé des mécanismes sophistiqués. Malgré tout, le fer peut être toxique pour la cellule notamment lorsqu'il génère des radicaux libres. Aucun mécanisme d'excrétion du fer à l'extérieur de la bactérie n'a été identifié. Cependant une régulation de la concentration intracellulaire en fer est mobilisée pour contrôler la synthèse des protéines de transport et de stockage.

4.5.1 La protéine Fur : un régulateur négatif

L'expression de la majorité des gènes impliqués dans le contrôle de la concentration en fer chez la bactérie est régulée par un répresseur Fur (*Ferric Uptake Regulator*). Cette protéine a été identifiée chez *E. coli* (Bagg & Neilands, 1987). Elle est composée d'un domaine de liaison à l'ADN (N-terminal) et d'un domaine de dimérisation (en C-terminal) (**Figure 37A**). Le domaine de dimérisation contient deux cystéines conservées qui permettent de lier les ions métalliques, comme le Zn^{2+} qui est nécessaire pour l'activité de la protéine Fur (Jacquamet *et al.*, 1998 ; Lee & Helmann, 2007). La protéine Fur possède un site de fixation pour le Fe^{2+} , qui permet ensuite au dimère de se lier sur une séquence nucléotidique spécifique appelée boîte Fur. Cette liaison engendre la répression de l'expression d'une multitude de gènes (Butcher *et al.*, 2012 ; Katigbak & Zang, 2012).

Lorsqu'une concentration élevée en fer est atteinte dans le cytoplasme de la bactérie, Fur s'associe aux ions Fe^{2+} induisant un changement de conformation de la protéine et son association sous forme de dimère. Un dimère s'associe de chaque côté de la double hélice d'ADN (Lee & Helmann, 2007 ; Lavrrar & McIntosh, 2003), il se fixe avec une forte affinité sur la boîte Fur, réprimant alors l'expression des gènes qui régulent l'homéostasie du fer. La boîte Fur est une séquence nucléotidique palindromique très conservée (**Figure 37B**) chez un grand nombre d'espèces. A l'inverse, dans des conditions de carence en fer, la protéine reste sous forme monomérique libre et inactive. La polymérase peut alors initier la transcription et l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition ou le stockage du fer.

De nombreuses études montrent que la séquence de la protéine Fur est très conservée suggérant un mécanisme identique chez de nombreux micro-organismes. On retrouve ce type de régulation dans les voies d'acquisition du fer à partir de l'hème (Tong & Guo, 2009), des sidérophores, de la transferrine ou de la lactoferrine (Thomas & Sparling, 1996 ; Cornelissen & Hollander, 2011). Ce dispositif peut réguler plusieurs fonctions vitales impliquées dans l'homéostasie de différents métaux, dans la biogenèse des membranes et des flagelles ou encore dans la conversion et la production d'énergie (Butcher *et al.*, 2012).

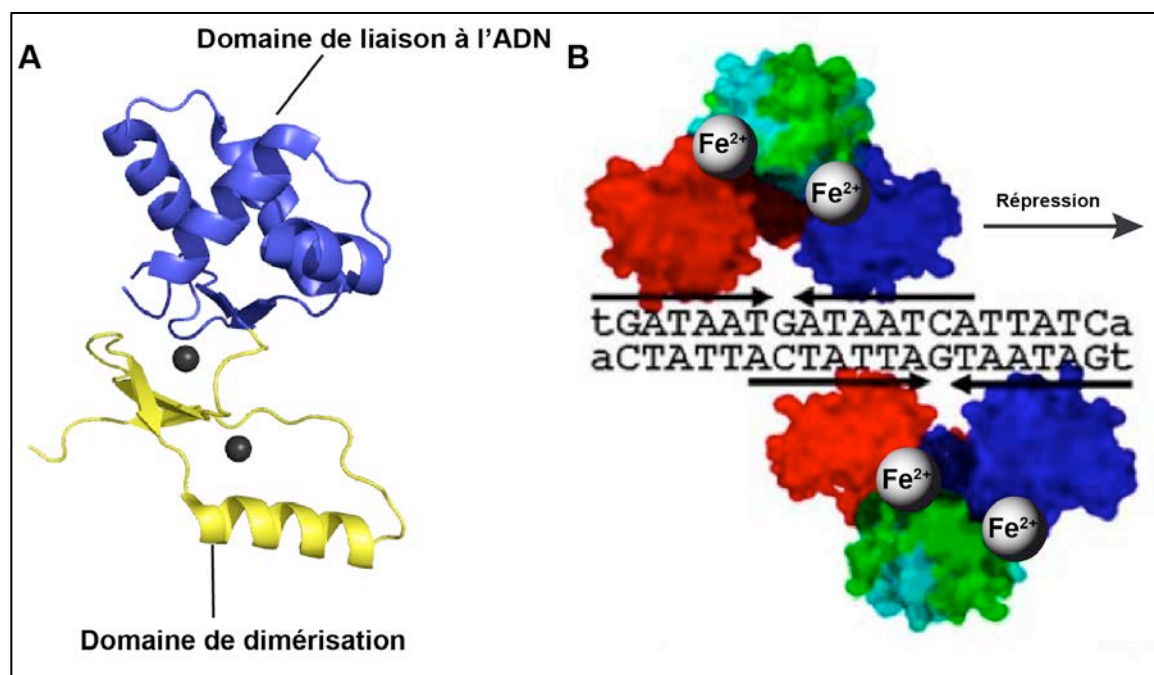


Figure 37 : Représentation de la structure de la protéine Fur et de sa liaison à l'ADN

Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine Fur de *P. aeruginosa* (PDB 1MZB) liant deux ions métalliques (sphère grise). Les sous-unités de liaison à l'ADN et de dimérisation de la protéine sont représentées en bleu et jaune, respectivement (A). En présence de fer, la protéine Fur sous forme de dimère vient se lier sur une séquence nucléotidique spécifique, nommée boîte Fur et réprime l'expression génique (B) (adaptée de (Lee & Helmann, 2007)).

4.5.2 Régulation positive par les facteurs ECF

En parallèle de la répression par le système Fur, une régulation positive du transport du fer s'effectue grâce au domaine de signalisation des TBDT. La transcription est induite au niveau de la surface de la cellule et un signal est transmis jusqu'au cytoplasme par un mécanisme impliquant le TBDT, un facteur sigma régulateur de la membrane interne (appelé aussi facteur anti-sigma) et un facteur sigma cytoplasmique appartenant à la famille des ECF (ExtraCytoplasmic Function) (Braun, 1997 ; Schalk *et al.*, 2004). Les facteurs sigma de la famille des ECF forment un groupe de petits facteurs de transcription qui sont exprimés en réponse à des facteurs environnementaux. Ils sont présents chez un grand nombre de bactéries et contrôlent l'expression des gènes associés à la virulence bactérienne, au transport d'ions métalliques, à la réponse au stress oxydatif, au choc osmotique ou à la chaleur (Missiakas & Raina, 1998 ; Brooks & Buchanan, 2008).

L'interaction du ferri-sidérophore avec son TBDT induit un changement de conformation au niveau du transporteur et particulièrement au niveau du domaine de signalisation. Celui-ci peut alors interagir avec un facteur sigma régulateur ancré

dans la membrane interne. Un facteur sigma cytoplasmique se dissocie et celui-ci permet le recrutement de l'ARN polymérase qui initie la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer (**Figure 38**).

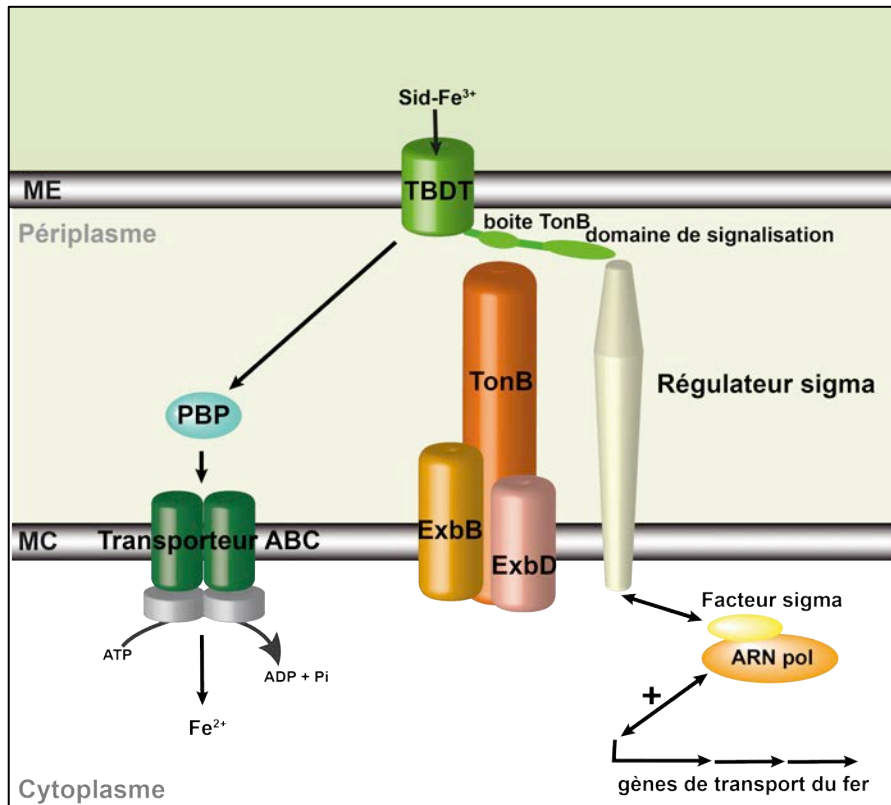


Figure 38 : Schéma de la régulation positive du transport du fer

Représentation schématique du transport du fer et de la régulation positive par les facteurs sigma. Le ferri-sidérophore est transporté dans le périplasma via son TBDT, grâce à l'énergie fournie par le système TonB. Un transporteur de type ABC couplé à une protéine périplasmique (PBP) permet ensuite le passage du fer vers le cytoplasme. La liaison du ferri-sidérophore génère le changement de conformation du domaine de signalisation du transporteur qui interagit avec le facteur sigma régulateur. Celui-ci active alors avec facteur sigma capable de se fixer sur l'ARN polymérase et d'induire la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer.

Chez *E. coli*, le système d'acquisition *fec* est induit par la liaison du citrate ferrique. Dans ce cas le transporteur de la membrane externe est FecA. Des expériences de double hybride ont permis d'identifier le facteur anti-sigma FecR qui interagit avec le TBDT au niveau du périplasma. FecR permet ensuite le recrutement d'un facteur sigma FecI au niveau du cytoplasme qui peut induire la transcription de l'opéron *fec* par l'ARN polymérase (Braun, 1997 ; Brooks & Buchanan, 2008). Chez *P. aeruginosa*, la liaison de la ferri-pyoverdine sur le transporteur FpvA engendre la transduction d'un signal qui met en jeu le facteur anti-sigma FpvR. Ce système a la particularité de posséder deux facteurs sigma : Fpvl et PvdS (Visca *et al.*, 2002 ;

Beare *et al.*, 2003). Dans ce système, FpvI mobilise l'ARN polymérase qui va induire la transcription de *fpvA*, alors que PvdS va initier la transcription de gènes nécessaire à la production du sidérophore pyoverdine. Chez *S. marescens*, deux gènes ont été identifiés devant l'opéron *has*. Ils codent pour un facteur sigma HasI et un facteur anti-sigma régulateur HasS, de la membrane interne (Tong & Guo, 2009).

5 Le transport du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*

L'organisme modèle du laboratoire est *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie est un bâtonnet Gram-négatif, aérobic stricte et mobile grâce à un flagelle (**Figure 39**). Elle peut croître sous forme planctonique et de biofilm.



Figure 39 : *P. aeruginosa* observée par microscopie électronique

La taille des bactéries est de 0,5 x 2 à 3 μm .
(Image © James A. Sullivan)

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de 10 à 20% des infections nosocomiales, et qui provoque des infections létales chez les patients atteints de mucoviscidose et les patients immunodéprimés comme les grands brûlés ou les patients atteints de cancer.

Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grand génome bactérien avec 6,3 millions de paires de bases, contre 4,6 millions pour *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997). Le séquençage du génome de la souche *P. aeruginosa* PAO1 en 2000 (Stover *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence la grande capacité métabolique de cette souche et un grand nombre de gènes impliqués dans différents systèmes de régulation et de transport de nutriments.

Au cours de l'infection, cette bactérie pathogène produit un grand nombre de facteurs de virulence (Pitt, 1986) essentiels à l'établissement et au maintien de l'infection. Les sidérophores produit par *P. aeruginosa* sont également considérés comme des facteurs de virulence. En effet, grâce à leur forte affinité pour le fer, ils sont capables d'extraire ce métal de la transferrine et de la lactoferrine de l'hôte (Lamont *et al.*, 2009). Pour faire face à ses besoins en fer, *P. aeruginosa* synthétise

et sécrète deux sidérophores majoritaires : la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline (Pch). Je détaille ici ces deux voies de transport afin de pouvoir discuter les résultats obtenus lors de mon travail (présenté dans la Partie II).

5.1 La voie pyoverdine

5.1.1 Les pyoverdines

Les pyoverdines (Pvd) forment une famille importante de sidérophores (Chapitre 4.2.1) produit par l'ensemble des souches fluorescentes de *Pseudomonas*. Les Pvd sont sécrétées dans le milieu extracellulaire dans des conditions de carence en fer. Elles sont de couleur vert-jaune fluorescente. Leur implication dans les mécanismes d'acquisition du fer a été mis en évidence en 1978 (Meyer & Abdallah, 1978 ; Meyer & Hornsperger, 1978), et la première structure d'une Pvd a été résolue par RMN en 1981 (Teintze *et al.*, 1981). Aujourd'hui plus de 60 analogues de la Pvd ont été identifiés (Meyer *et al.*, 2008), elles sont toutes constituées de 3 parties :

- un chromophore dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline) conservé chez l'ensemble des Pvd, responsable de la couleur et de la fluorescence de la molécule (Meyer, 2000),
- une chaîne latérale en position C3 du chromophore, constituée dans la plupart des cas d'un diacide carboxylique ou de son amide correspondante,
- une chaîne peptidique variable linéaire composée de 8 à 12 acides aminés, en position C1 du chromophore. Cette chaîne peptidique peut être cyclique ou partiellement cyclique (Visca *et al.*, 2007).

Actuellement, dans le cas de *P. aeruginosa*, 4 groupes de pyoverdines ont été identifiés qui diffèrent au niveau de leur chaîne peptidique. A chacune de ces Pvd est associé un TBDT spécifique (Cornelis *et al.*, 1989). Dans ce manuscrit, je parlerai uniquement de la Pvd de type I associée au transporteur FpvAI, présent chez *P. aeruginosa* PAO1, dont le mécanisme moléculaire a été le plus largement étudié. Cette pyoverdine se compose d'un chromophore lié à un octapeptide partiellement cyclisé et à une chaîne latérale variable (**Figure 40**) donnant 3 isoformes. La forme majoritaire trouvée dans les cellules planctoniques contient un acide succinique et a une masse de 1333 Da. La chélation du fer se fait avec une stoechiométrie 1:1 via le

cathécol et les deux hydroxamates avec une constante d'association de 10^{32} M^{-1} (Albrecht-Gary *et al.*, 1994).

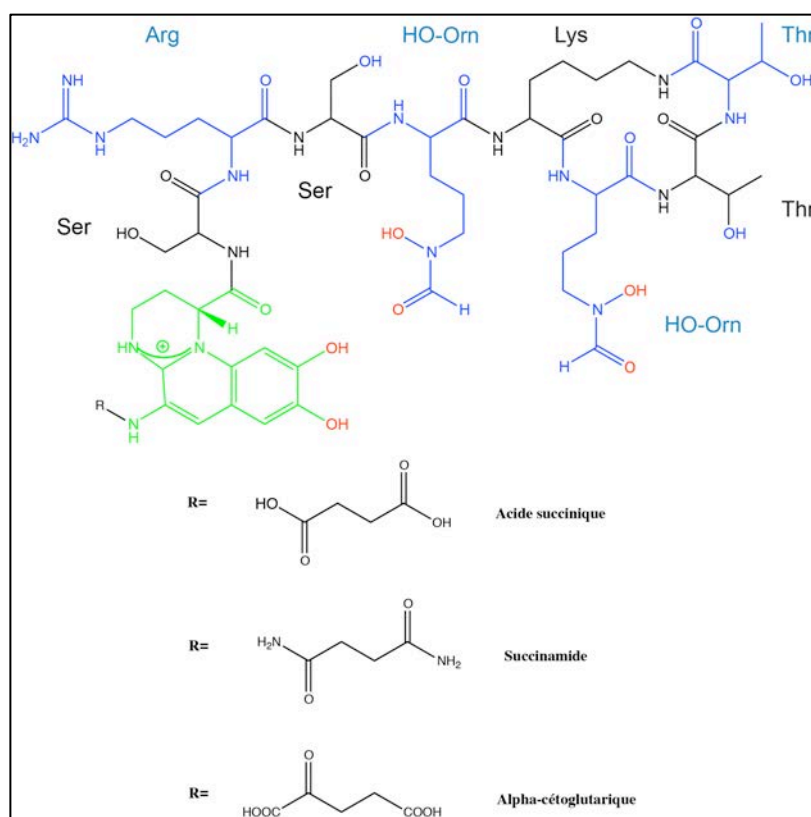


Figure 40 : Structure de la pyoverdine produite par *P. aeruginosa* (PAO1)

La pyoverdine est composée d'un chromophore en vert, d'une chaîne peptidique de 8 acides aminés représentée en bleu et noir, et d'une chaîne latérale R qui peut être soit un acide succinique, un succinamide ou un acide α -cétoglutarique (en noir). Les atomes impliqués dans la liaison du fer sont représentés en rouge.

5.1.2 Biosynthèse et sécrétion de la pyoverdine

L'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse, la sécrétion de la pyoverdine et l'acquisition du fer par la pyoverdine est localisé sur le « locus Pvd ». Comme un grand nombre de sidérophore, la Pvd est synthétisée par un système impliquant des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS). Cette biosynthèse débute dans le cytoplasme et se termine dans le périplasme. Elle implique la formation d'un précurseur non fluorescent par les NRPS : PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD. Le premier module de l'enzyme PvdL couple une chaîne grasse à un résidu L-Glu du précurseur de la Pvd (Gulick & Drake, 2011 ; Hannauer *et al.*, 2012b ; Schalk & Guillon, 2012b). Cette chaîne grasse correspond à un acide myristique ou myristoléique qui permet l'ancrage du précurseur au niveau de la membrane

cytoplasmique. A ces NRPS s'ajoutent des enzymes auxiliaires qui catalysent des réactions intermédiaires : PvdH, PvdA et PvdF (**Figure 41a**) (Visca *et al.*, 2007 ; Schalk & Guillon, 2012b). Le précurseur de la Pvd contenant la chaîne grasse passe dans le périplasme *via* un transporteur ABC, PvdE. La maturation du précurseur a lieu au niveau du périplasme et la formation du chromophore de la Pvd implique les enzymes PvdNOPQ, où PvdQ retire la chaîne grasse du précurseur (**Figure 41b**) (Visca *et al.*, 2007 ; Yeterian *et al.*, 2010, Gulick & Drake 2011 ; Schalk & Guillon, 2012b). La pyoverdine synthétisée est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à une pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Hannauer *et al.*, 2010b).

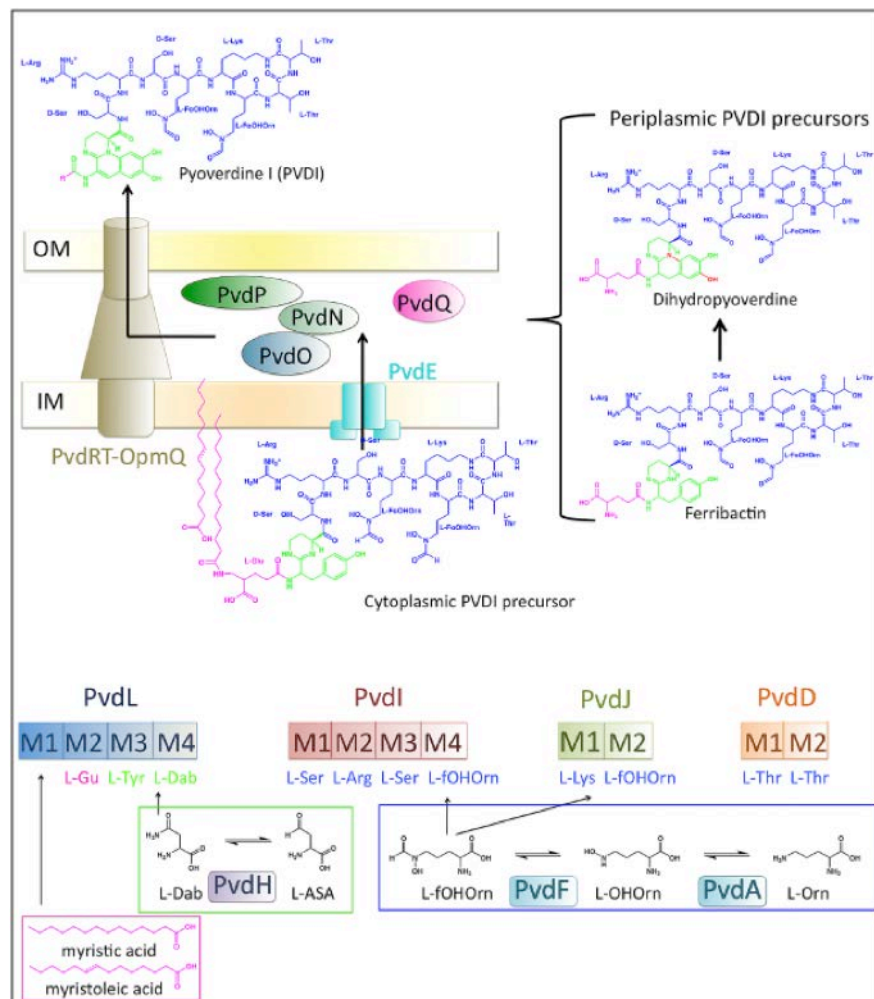


Figure 41 : Schéma de la voie de biosynthèse de la pyoverdine chez *P. aeruginosa*

Schéma de la voie de biosynthèse de la Pvd par les NRPS et les enzymes PvdH, PvdF et PvdA, au niveau du cytoplasme. Chaque NRPS est découpé en plusieurs sous-domaines M1 à M4 (catalysant des réactions d'adénylation, de ligation, de thiolation ou d'épimérisation). Le précurseur non fluorescent passe dans le compartiment périplasmique grâce au transporteur ABC, PvdE. La maturation du chromophore a lieu au niveau du périplasme, grâce aux enzymes PvdNOPQ. La pyoverdine néosynthétisée est ensuite excrétée dans le milieu extracellulaire via la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Schalk & Guillon, 2012b).

5.1.3 *Transport du fer par la pyoverdine*

Une fois dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer avec une très forte affinité et le transporte vers le périplasma de la bactérie grâce à un transporteur membranaire spécifique FpvA appartenant à la famille des TBDT (Poole *et al.*, 1993). FpvA reconnaît spécifiquement le complexe Pvd-Fe et le transporte vers le périplasma. Les structures de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe ont été résolues par cristallographie, au sein du laboratoire (**figure 42**) (Wirth *et al.*, 2007 ; Cobessi *et al.*, 2005b). La structure de la forme apo du récepteur a été résolue lors de ce projet (Brillet *et al.*, 2007), elle sera présentée et discutée dans la Partie II - Chapitre 1.

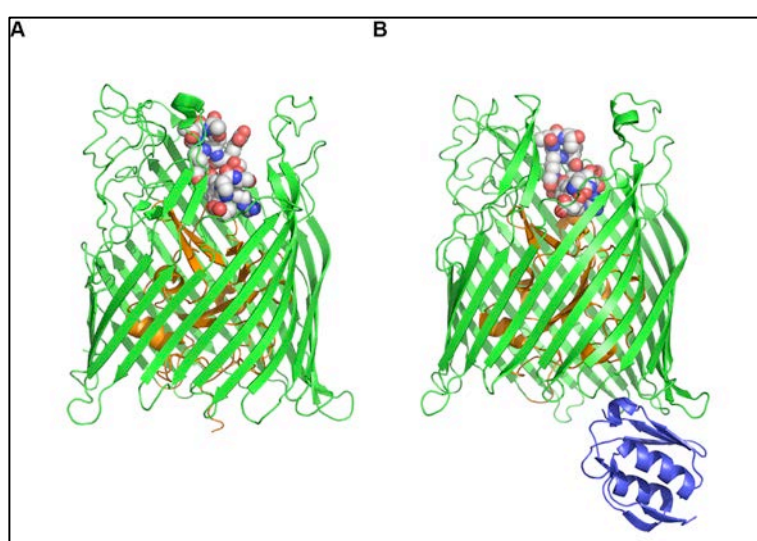


Figure 42 : Représentation de la structure de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe

Structure du transporteur FpvA en complexe avec la Pvd (PDB 1XKH) (A) et en complexe avec Pvd-Fe (PDB 2IAH) (B). Le tonneau est représenté en vert, le bouchon en orange. Le domaine de signalisation en bleu n'est visible qu'au niveau de la structure de FpvA-Pvd-Fe. La Pvd et le complexe Pvd-Fe sont représentés en sphères de van der Waals. La boîte TonB n'est pas visible sur ces deux structures.

FpvA adopte le repliement classique des TBDT. La séquence signal en position N-terminale (résidus 1-43) est suivie du domaine de signalisation (résidus 44-138), du domaine bouchon (résidus 139-276) et du tonneau β composés de 539 résidus (**Figure 42**). Le tonneau est composé de 22 brins β transmembranaires antiparallèles connectés par onze longues boucles extracellulaires (3 à 33 résidus) et dix coudes courts périplasmiques (3 à 10 résidus). Le domaine bouchon vient fermer le pore du tonneau et il est composé de 6 brins β connectés par des hélices α . Le domaine de signalisation localisé au niveau du périplasma est composé de deux hélices α prises en « sandwich » entre deux feuillets β . On trouve ensuite une boucle

de connexion (résidus 119-138) contenant la boîte TonB responsable de l'interaction avec la partie C-terminale de la protéine TonB (Cobessi *et al.*, 2005b ; Wirth *et al.*, 2007). La mutation ou la délétion du domaine de signalisation affecte la production de Pvd mais n'a pas d'effet délétère sur le transport du complexe Pvd-Fe (James *et al.*, 2005 ; Shen *et al.*, 2002).

Le site de liaison de la ferri-pyoverdine est localisé au niveau de la face extracellulaire du transporteur. Il est principalement constitué d'acides aminés aromatiques (6 Tyr, 3 Trp) appartenant au bouchon et au tonneau (**Figure 43**) (Schalk *et al.*, 2009 ; Nader *et al.*, 2007 ; Wirth *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2005). L'affinité de FpvA pour le complexe Pvd-Fe est de 0,5 nM et est énergie indépendante (Clement *et al.*, 2004). Les structures de FpvA en complexe avec différentes Pvd ont montré un changement de conformation au niveau de la boucle L7 (Greenwald *et al.*, 2009), amenant les résidus Trp-599 et Tyr-600 vers le ferri-sidérophore. Des expériences de mutagenèse ont également mis en évidence l'implication des boucles L4, L7 et L9 dans le transport de la Pvd-Fe (Nader *et al.*, 2007). Un mouvement important du domaine de signalisation a été mis en évidence grâce à la résolution de la structure de la forme vide du transporteur (Brillet *et al.*, 2007), et sera discuter dans la Partie II.

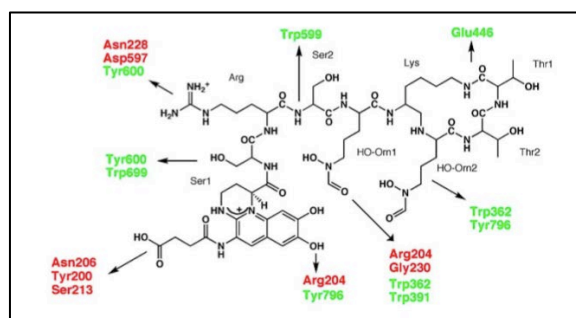


Figure 43 : Schéma des interactions entre la pyoverdine et FpvA

Représentation des différents résidus du bouchon (rouge) et du tonneau (vert) impliqués dans l'interaction avec les différentes parties de la pyoverdine (Schalk *et al.* 2009).

Ce site peut lier plusieurs Pvd analogues produites par différentes souches de *P. aeruginosa* (Greenwald *et al.*, 2009 ; Schons *et al.*, 2005). Le transporteur FpvA peut également lier et transporter d'autres complexe pyoverdine-métal, ensuite la pompe à efflux PvdRT-OpmQ prend le relai pour réexcréter les métaux indésirables dans le milieu extracellulaire (Braud *et al.*, 2009 ; Schalk *et al.*, 2011 ; Hannauer *et al.*, 2012a). Comme pour l'ensemble des TBDT, le mécanisme

moléculaire de translocation du complexe Pvd-Fe à travers FpvA n'a pas encore été élucidé.

Dans la voie pyoverdine, le complexe Pvd-Fe est dissocié par réduction du fer au niveau du périplasme (Schalk *et al.*, 2002 ; Greenwald *et al.*, 2007 ; Hannauer *et al.*, 2012a). Un alignement de séquence montre qu'une protéine de l'opéron PA2403-PA2404-PA2405-PA2406 présente des homologues de séquence avec les cytochromes *b561*, impliqués dans le transfert d'électrons dans les cellules eucaryotes. La délétion du gène PA2403 inhibe totalement la dissociation du complexe Pvd-Fe chez *P. aeruginosa* (résultats de l'équipe, non publiés). Les 4 gènes de cet opéron codent pour des protéines de membrane interne, nommées FpvGHJK, suggérant que cette dissociation se déroule dans le périplasme à proximité de la membrane interne (**Figure 44**).

Le passage du ferri-sidérophore au niveau de la membrane interne des bactéries Gram-négatives fait généralement intervenir un transporteur ABC (Koster, 2001). Le mécanisme de passage du fer vers le cytoplasme n'a pas encore été entièrement identifié. Cependant, au niveau du locus Pvd, on trouve l'opéron contenant les gènes *fpvCDEF*. Un alignement de séquence montre que les protéines FpvC et FpvF correspondent à des protéines périplasmiques, dont le rôle sera discuté dans la Partie II, chapitre 3. FpvD et FpvE correspondent respectivement aux domaines ATPases et perméases d'un transporteur ABC qui pourraient assurer le transport du fer ferreux au travers de la membrane interne (**Figure 44**).

5.1.4 Régulation de l'acquisition du fer par la voie pyoverdine

La régulation de l'expression des gènes de la voie pyoverdine se fait par la Pvd-Fe. Cette régulation implique une transduction de signal entre le transporteur FpvA localisé à la membrane externe et les facteurs sigma cytoplasmiques PvdS et FpvI. Cette signalisation passe par l'intermédiaire du facteur anti-sigma FpvR. En présence de Pvd-Fe, FpvA interagit avec FpvR grâce à un changement conformationnel du domaine de signalisation (Brillet *et al.*, 2007 ; Schalk *et al.*, 2009). Cette interaction engendre la libération de deux facteurs sigma PvdS et FpvI qui activent l'expression de gènes associés. FpvI engendre la transcription du gène *fpvA* et PvdS active les gènes codants pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la Pvd (**Figure 44**) (Beare *et al.*, 2003 ; Redly & Poole, 2003 ; Redly & Poole,

2005). Dans la cellule, lorsque la concentration en fer ferreux est trop importante, le Fe^{2+} se fixe à la protéine Fur. Le complexe formé se fixe sur les sites spécifiques appelés « boîtes Fur » présents au niveau du promoteur des gènes régulés par le fer dans le génome de *P. aeruginosa*. Ainsi la transcription des gènes cibles est bloquée (**Figure 44**) (Escolar *et al.*, 1999 ; Butcher *et al.*, 2012).

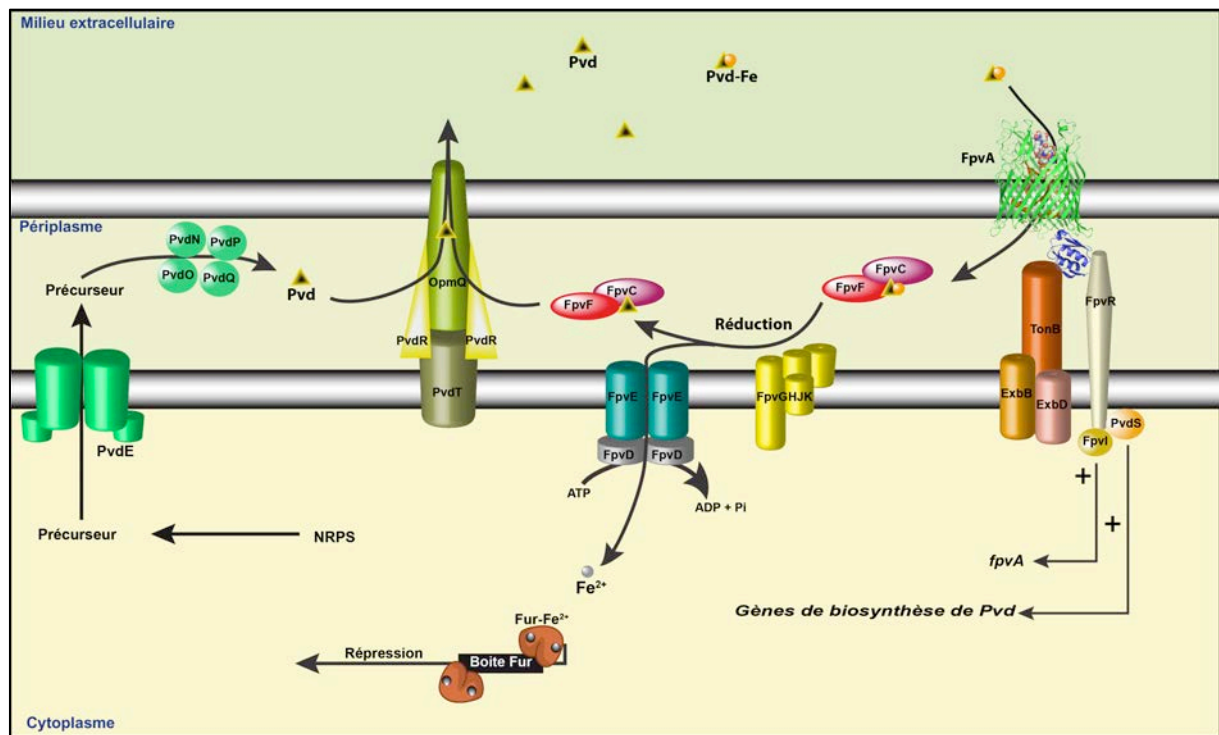


Figure 44 : Schéma global de la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*

La synthèse de la pyoverdine est initiée dans le cytoplasme et débute par la synthèse d'un précurseur par les NRPS. Ce précurseur est exporté vers le périsplasme par un transporteur ABC, PvdE. Dans le périsplasme, les enzymes PvdNOPQ assurent la maturation du précurseur afin d'obtenir la pyoverdine. La Pvd est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire via la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Une fois dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer. Le complexe Pvd-Fe ainsi formé est reconnu par un TBDT spécifique de la membrane externe, FpvA (PDB 2IAH). La fixation du complexe sur le transporteur engendre des changements conformationnels permettant à FpvA d'interagir avec TonB et avec FpvR. Ce mouvement a été mis en évidence lors de ce travail. La translocation de la Pvd-Fe au travers du transporteur vers le périsplasme nécessite un apport énergétique fourni par le complexe TonB-ExbB-ExbD, de la membrane interne. L'interaction avec FpvR permet la libération de deux facteurs sigma PvdS et FpvI qui activent l'expression des gènes de biosynthèse de la Pvd et du transporteur FpvA. Dans le périsplasme, le complexe Pvd-Fe est pris en charge par les protéines périsplasmiques FpvC et FpvF. Cette interaction a été mise en évidence lors de ce travail. Le complexe serait ensuite dissocié par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette réduction pourrait s'effectuer grâce à une ou plusieurs protéines du complexe FpvGHJK de la membrane interne. Le fer ferreux est ensuite transporté vers le périsplasme grâce au transporteur ABC FpvDE. En cas de surcharge en fer, la protéine Fur fixe le Fe^{2+} , dimérise et se lie à l'ADN afin de réprimer les gènes impliqués dans le transport du fer. Après dissociation, la Pvd est recyclée vers le milieu extracellulaire via la pompe à efflux PvdRT-OpmQ.

5.2 La voie pyochéline

5.2.1 La pyochéline

La pyochéline, Pch, est un sidérophore produit et sécrété par *P. aeruginosa*. Il est produit en plus faible quantité que la Pvd et présente une affinité plus faible pour le fer : 10^{16} M^{-1} (Brandel *et al.*, 2012). La Pch est un sidérophore dérivé de la thiazolidine [2(2-o-hydroxyphényl-2-thiazolin-4-yl)-3-méthylthiazolidine-4-carboxylic acid] (Cox *et al.*, 1981). Cette molécule a la particularité de posséder trois centres chiraux en position C4', C2'' et C4''. *P. aeruginosa* produit deux diastéréoisomères PchI et PchII (**Figure 45**). La Pch est capable de chélater le fer avec une stoechiométrie 2:1 ($\text{Pch}_2:\text{Fe}$) (Tseng *et al.*, 2006), et comme la Pvd, elle est capable de chélater d'autres métaux comme le molybdène, le cobalt, le cuivre, le manganèse, le nickel ou le zinc (Braud *et al.*, 2009b).

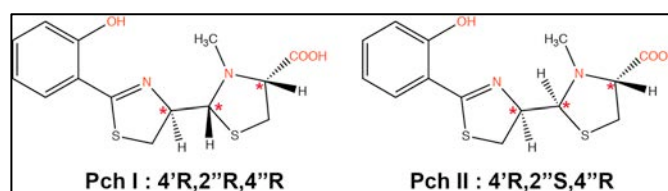


Figure 45 : Structures des diastéréoisomères de la pyochéline produits par *P. aeruginosa*

Les atomes en rouge interviennent dans la chélation du fer. Les atomes de carbones marqués d'une * représentent les trois centres chiraux.

5.2.2 Biosynthèse de la pyochéline

La biosynthèse de la pyochéline (Pch) est effectuée au niveau du périplasme par des NRPS. L'ensemble des gènes de biosynthèse est regroupé sur un même locus en deux opérons : *pchDCBA* et *pchEFGHI* (**Figure 46**).

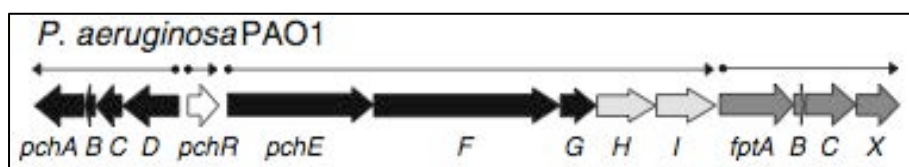


Figure 46 : Représentation schématique du locus pyochéline chez *P. aeruginosa*

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la pyochéline sont représentés en noir, le gène *pchR* impliqué dans la régulation en blanc. Les gènes impliqués dans le transport de la Pch sont représentés en gris foncé et les gènes *pchHI*, codant pour un transporteur ABC, en gris clair (Youard *et al.*, 2011).

La pyochéline est issue de l'assemblage de deux cystéines, d'une molécule de salicylate et d'un groupement méthyle. Les enzymes PchA et PchB permettent la synthèse du salicylate à partir du chorismate. PchD active ensuite le salicylate permettant son interaction avec PchE et la condensation avec la première cystéine. L'ajout de la seconde cystéine est réalisé par PchF. La synthèse s'achève par la réduction de la double liaison de la 2-hydroxyphényl-bisthiazoliny-S-PchF par PchG et aboutit à la formation de pyochéline (**Figure 47**) (Youard *et al.*, 2011 ; Reimmann *et al.*, 2001).

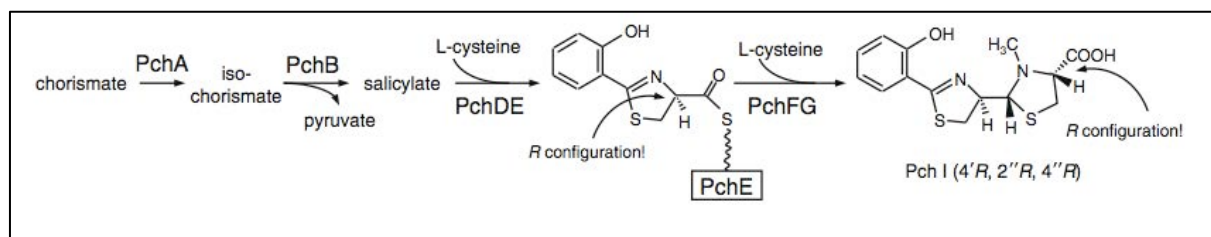


Figure 47 : Schéma la synthèse la pyochéline

Mécanisme de synthèse de la pyochéline chez P. aeruginosa à partir du chorismate et de la condensation avec deux cystéines (Youard et al., 2011).

Au niveau du locus Pch, trois gènes ne semblent pas essentiels à la biosynthèse de la Pch : *pchC*, *pchH* et *pchI*. Les protéines PchHI correspondent à un transporteur ABC. En effet, la délétion de ces deux gènes ne réduit pas la quantité de Pch synthétisée (Youard *et al.*, 2011 ; Reimmann *et al.*, 2001). PchC appartient à la famille des thioestérases et permettrait d'optimiser la synthèse de Pch en éliminant les substrats inappropriés liés aux protéines PchE et PchF (Youard *et al.*, 2011 ; Reimmann *et al.*, 2004). Jusqu'à présent, le mécanisme de sécrétion de ce sidérophore n'a pas été élucidé et les protéines impliquées n'ont pas été identifiées.

5.2.3 Transport du fer par la pyochéline

Après sécrétion dans le milieu extracellulaire, la Pch chélate le fer et le complexe formé est reconnu par son transporteur spécifique, FptA, appartenant à la famille des TBDT. La structure de ce transporteur a été résolue au laboratoire en 2005 (**Figure 48**) (Cobessi *et al.*, 2005a). Comme tous les membres de cette famille, FptA se compose d'un tonneau à 22 brins β antiparallèles dont le pore est obstrué par le domaine bouchon situé en position N-terminale, mais il ne possède pas de

domaine de signalisation. Au niveau de la structure cristallographique, le fer est chélaté par une molécule de pyochéline tétradendate et la coordination du fer est complétée par deux oxygènes provenant d'une molécule d'éthylène glycol (**Figure 48C**). Cet éthylène glycol provient de la condition de cristallisation, où il a été utilisé comme cryoprotectant pour la congélation du cristal.

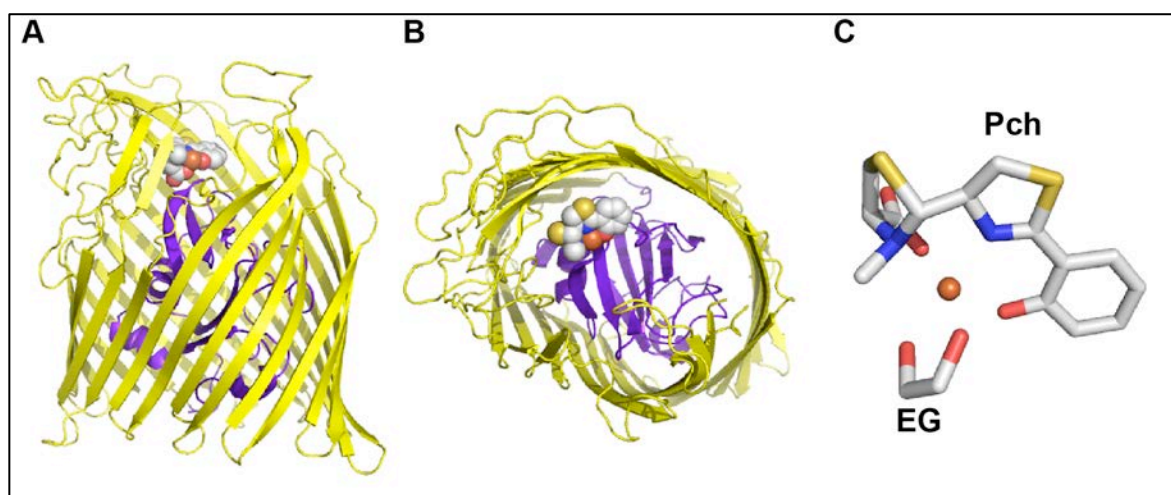


Figure 48 : Représentation de la structure du transporteur FptA-Pch-Fe

La structure de FptA a été résolue en complexe avec Pch-Fe (PDB 1XKW). Le transporteur se compose d'un tonneau à 22 brins β antiparallèles (jaune) et d'un domaine bouchon (violet), en position N-terminale, qui vient obstruer le tonneau (vue de face **A**, vue de dessus **B**). Le ferri-sidérophore est représenté en sphères de van der Waals. Dans la structure cristallographique, le fer est chélaté par une molécule de Pch et un éthylène glycol (EG), utilisé comme cryoprotectant pendant la cristallisation (**C**). L'atome de fer est représenté en sphère de van der Waals (orange).

Le site de liaison du complexe Pch-Fe est essentiellement constitué de résidus hydrophobes provenant du tonneau et du bouchon, ce qui permet la fixation de ce sidérophore hydrophobe particulièrement peu soluble dans l'eau. L'énergie nécessaire à la translocation de la ferri-pyochéline au travers du transporteur FptA, provient de la force proton motrice transmise par la machinerie TonB de la membrane interne (**Figure 49**) (Hoegy *et al.*, 2005). La pyochéline est un sidérophore produit à la fois par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* et qui possède trois centres chiraux. Cependant, chacune des souches synthétise un des deux énantiomères : *P. aeruginosa* produit la pyochéline et *P. fluorescens* synthétise l'énantiopyochéline (EPch). Au laboratoire, différents travaux ont montrés la spécificité de liaison des transporteurs FptA (*P. aeruginosa*) et FetA (*P. fluorescens*) pour ces deux énantiomères de la pyochéline (Hoegy *et al.*, 2009). Cette particularité sera discutée dans la Partie II, avec la présentation de la structure du transporteur

FetA (Brillet *et al.*, 2011). Après son passage dans le périplasme, le transport du complexe Pch-Fe vers le cytoplasme est probablement assuré par la perméase FptX chez *P. aeruginosa* (Cuiv *et al.*, 2004), et par un transporteur ABC FetCDE chez *P. fluorescens* (**Figure 49**) (Youard *et al.*, 2011). Une fois dans le cytoplasme, le complexe est dissocié par un mécanisme inconnu à ce jour.

5.2.4 Régulation de la voie pyochéline chez *P. aeruginosa*

Le transport du fer *via* la pyochéline est réprimé par la protéine Fur lorsqu'elle est complexée avec du Fe²⁺ (Ochsner *et al.*, 1995). Le complexe se lie alors sur les boîtes Fur que l'on retrouve au niveau des promoteurs des opérons *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Youard *et al.*, 2011). En condition de carence en fer, Fur se dissocie de la boîte Fur et permet l'expression des gènes de la voie Pch (**Figure 49**).

L'expression optimale de la voie pyochéline nécessite l'activateur de transcription PchR (Heinrichs & Poole, 1996 ; Heinrichs & Poole, 1993). La ferri-pyochéline active PchR, permettant alors à ce régulateur de se fixer sur une séquence nucléotidique de 32 paires de bases (boîte PchR) au niveau des promoteurs des opérons du locus Pch (Michel *et al.*, 2005) ; en parallèle il réprime sa propre expression (**Figure 49**) (Youard *et al.*, 2011 ; Michel *et al.*, 2005). La régulation de la synthèse de l'énantiopyochéline chez *P. fluorescens* dépend également des protéines Fur et PchR (Youard *et al.*, 2007 ; Youard & Reimmann, 2010).

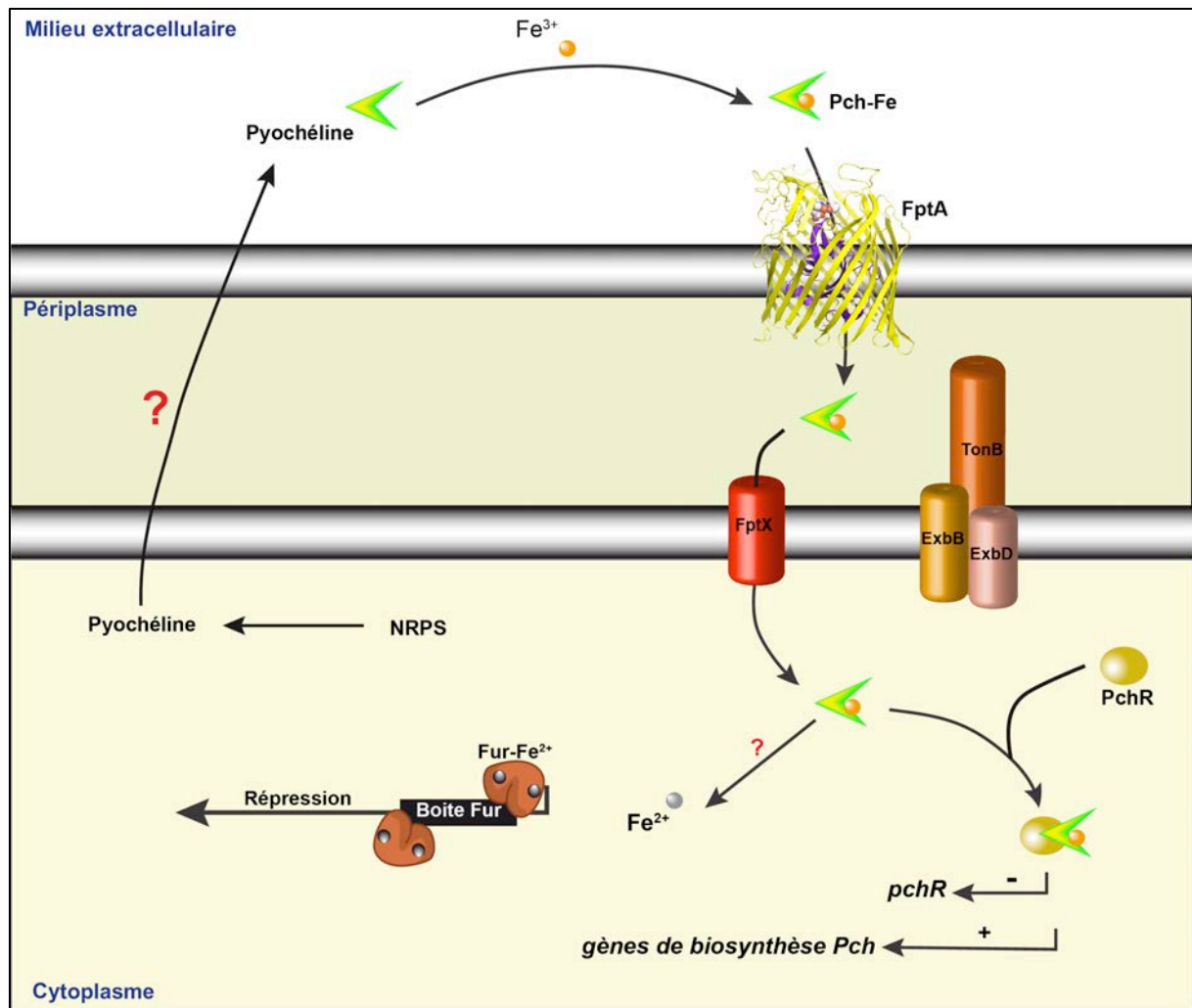


Figure 49 : Schéma de la voie de biosynthèse de la pyochéline chez *P. aeruginosa*

La synthèse de la pyochéline est effectuée dans le cytoplasme par les NRPS. La Pch est ensuite sécrétée vers le milieu extracellulaire par un mécanisme inconnu. Dans le milieu extracellulaire, la Pch chélate le fer et le complexe formé est reconnu et transporté par FptA (PDB 1XKW), au niveau de la membrane externe grâce à l'énergie fournie par la machinerie TonB de la membrane interne. La translocation du complexe au travers de la membrane cytoplasmique est assurée par la perméase FptX. Une fois dans le cytoplasme le complexe Pch-Fe se lie à l'activateur de transcription PchR qui va activer l'expression des gènes de la voie Pch, en parallèle il va réprimer sa propre expression. Le mécanisme de dissociation du ferri-sidérophore au niveau cytoplasmique est encore inconnu. Lors d'une surcharge en fer, Fur lie le Fe^{2+} et réprime la voie Pch.

Objectifs

Durant mon activité professionnelle, je me suis tout d'abord intéressé au mécanisme de transport du fer *via* le transporteur de membrane externe FpvA, chez *P. aeruginosa*. Malgré la publication des premières structures de TBDT à la fin des années 90, les mécanismes de translocation des ligands au travers de cette famille de protéine demeuraient inconnus. En 2005, Le premier objectif de mon travail avec le Dr David COBESSI a été de résoudre la structure de la forme vide de ce transporteur afin de la comparer aux deux structures connues FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe, de comprendre comment s'effectue la translocation du ligand et les changements de conformation impliqués.

Les projets d'études structurales de protéines membranaires restent extrêmement délicats en raison des propriétés biophysicochimiques particulières de ces protéines. Avec le Dr David COBESSI, nous avons donc cherché à développer des méthodes robustes pour la production, la purification et la cristallisation des protéines de la famille des TBDT. Une approche expérimentale pour le projet d'études structurales et fonctionnelles de transporteurs TonB-dépendants, exprimés chez les bactéries Gram-négatives a été développée dans ce contexte. Afin de valider notre méthodologie, nous avons travaillé sur quatre transporteurs différents : FauA exprimé chez *Bordetella pertussis*, ShuA exprimé chez *Shigella Dysenteriae*, SuxA exprimé chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et FetA exprimé chez *Pseudomonas fluorescens*. En septembre 2008, suite à mon affectation dans l'équipe du Dr Isabelle SCHALK, j'ai pu poursuivre le projet d'étude structurale et fonctionnelle du TBDT FetA en collaboration avec le Dr Cornelia REIMMANN à l'Université de Lausanne et le Dr David COBESSI à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

Enfin, ces deux dernières années, je me suis intéressé à une nouvelle famille de transporteur : les transporteurs ABC, et plus particulièrement au transporteur FpvCDEF. Ce dernier est impliqué dans l'acquisition du fer par le sidérophore Pvd chez *P. aeruginosa*. J'ai étudié par des approches de biochimie et de spectrométrie de masse en conditions natives la capacité des protéines FpvC et FpvF, associés à ce transporteur, à interagir et à lier le sidérophore chargé ou non en métal.

Partie II – Résultats scientifiques

1 Etudes fonctionnelles et structurales du transporteur FpvA de *Pseudomonas aeruginosa*

1.1 Contexte et objectifs du projet

Un des sidérophores majeurs produit par *P. aeruginosa* est la pyoverdine (Pvd) et son TBDT associé est FpvA. Comprendre le mécanisme de transport du fer chez cet organisme pathogène peut permettre d'envisager des stratégies visant à bloquer ou à détourner ce processus avec un objectif thérapeutique à la clé. Dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires qui régissent les interactions sidérophore/TBDT/TonB, des études structurales ont été menées sur le transporteur FpvA. Au laboratoire, les structures des formes FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe ont été résolues et publiées (**Figure 50**) (Cobessi *et al.*, 2005b ; Wirth *et al.*, 2007). Afin d'identifier les modifications conformationnelles de ce transporteur, l'objectif était d'obtenir la forme vide de FpvA afin de la comparer aux deux autres structures existantes.

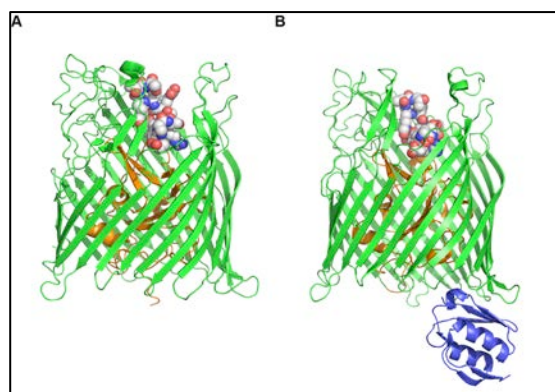


Figure 50 : Représentation des structures de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe

Structures des complexes FpvA-Pvd (PDB 1XKH) (A) et FpvA-Pvd-Fe (PDB 2IAH) (B). Pour chacune des molécules, le domaine bouchon est représenté en orange et le tonneau β en vert. La molécule de pyoverdine est représentée en sphères de van der Waals. Au niveau de la structure de FpvA-Pvd-Fe, l'atome de fer est représenté sous forme de sphère en rouge, le domaine de signalisation en bleu. Au niveau du complexe FpvA-Pvd, le domaine de signalisation n'est pas défini dans la densité probablement en raison de sa flexibilité.

1.2 Approches expérimentales

Pour les études structurales, il est nécessaire de surproduire et de purifier la protéine d'intérêt avec un haut degré de pureté (>95%). Deux souches capables de surproduire la protéine FpvA ont été utilisées pour cette étude. Une souche isolée

déficiente dans la production de pyoverdine (CDC5, (Ankenbauer *et al.*, 1986)) a été utilisée pour purifier FpvA. Une deuxième souche PAD06 a été utilisée, présentant une délétion pour une enzyme de la voie de biosynthèse de la pyoverdine : PvdA, enzyme catalysant la formation de N^5 -hydroxyornithine à partir de l'ornithine (Takase *et al.*, 2000). La souche PAD06 a été transformée avec un plasmide de surexpression du transporteur FpvA (pPVR2). Après extraction et solubilisation du récepteur grâce à un détergent non ionique : le *n*-octyl polyoxyéthylène (OPOE), j'ai purifié FpvA par une méthode en quatre étapes impliquant une colonne échangeuse d'anions, un gradient de sucrose, une colonne de « chromatofocusing » et une gel filtration. Ce protocole avait déjà permis de purifier les formes FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe avec un bon rendement et un niveau de pureté compatible avec les expériences de cristallisation. Pour la purification de FpvA à partir de la souche PAD06(pPVR2), j'ai complété avec une étape de chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions plus résolutive, de type MonoQ (GE Healthcare). Quand j'ai repris cette étude, grâce aux propriétés de fluorescence de la pyoverdine, j'ai effectué des tests de FRET afin de vérifier que la protéine FpvA était purifiée sous sa forme apo. En effet le recouvrement des spectres d'émission des résidus Trp et d'excitation de la pyoverdine permet de visualiser un transfert de fluorescence (FRET) correspondant à la fixation du ligand (**Figure 51**).

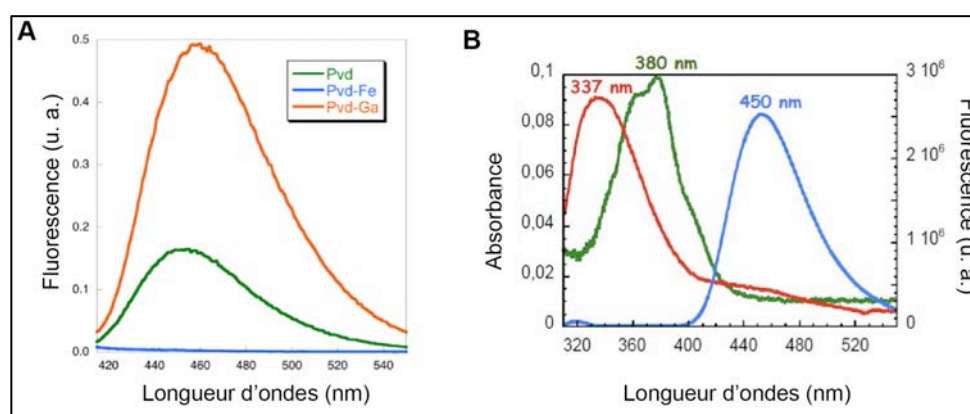


Figure 51 : Propriétés spectrales de la pyoverdine

(A) Spectres d'émission de la pyoverdine après excitation à 400 nm. Le spectre de la Pvd (vert) et le spectre du complexe Pvd-Fe (bleu) montre que la fixation du fer éteint la fluorescence du sidérophore. Le spectre du complexe Pvd-Ga (rouge) engendre l'augmentation du signal de fluorescence. (B) Représentation du recouvrement de spectres entre les résidus Trp de FpvA et la Pvd. Pvd ou Pvd-Ga possèdent un maximum d'absorption à 380 nm (vert), l'émission des Trp après excitation à 290 nm ont un maximum d'émission à 337 nm (rouge). Le recouvrement de ces deux spectres permet un transfert de fluorescence (FRET) et une émission de fluorescence de la pyoverdine à 450 nm (bleu).

Par la suite, j'ai réalisé un échange de tampon, par ultrafiltration, afin d'obtenir la protéine dans deux détergents différents : le C₈E₄ et le C₈E₅ (Bachem). Ces détergents ont déjà montré leur efficacité pour la cristallisation de FpvA-Pvd, FpvA-Pvd-Fe et d'autres protéines membranaires à tonneau β .

Pour la recherche des conditions de cristallisation, j'ai utilisé quatre matrices clairessemées : *MbClass suite*, *MbClass II suite*, *The Classics*, *The Classics suite* (Qiagen), les deux premières étant dédiées à la cristallisation des protéines membranaires. Pour ces expériences, j'ai utilisé la technique de diffusion de vapeur en gouttes assises, sur des plaques 96 puits contenant 3 réservoirs. Cette approche m'a permis de tester 1 536 conditions de cristallisation et a été réalisée grâce à un robot « *Cartesian Honeybee* », sur la plateforme de cristallisation du CEBGS, Illkirch. J'ai isolé plusieurs conditions de cristallisation, et travaillé en optimisation manuelle pour obtenir des cristaux de taille compatible ($\geq 100 \mu\text{m}^3$) avec les expériences de diffraction des rayons X.

1.3 Résultats

Les expériences de FRET réalisées sur la protéine purifiée à partir de la souche CDC5 montre une fluorescence résiduelle (**Figure 52A**). Par spectrofluorimétrie, j'ai observé un transfert de fluorescence entre les tryptophanes du récepteur et un probable précurseur du sidérophore lié au site de liaison du transporteur. J'ai déchargé le récepteur en réalisant une incubation dans un tampon acide (citrate pH 3,5). Cette étape a bien permis d'éliminer le précurseur présent sur le récepteur, sans altérer sa capacité de fixation de son ligand. En effet, la cinétique de FRET montre une fixation du complexe Pvd-Ga sur FpvA (**Figure 52B**). Malheureusement ce traitement n'a pas permis d'obtenir des cristaux de FpvA apo diffractant les rayons X.

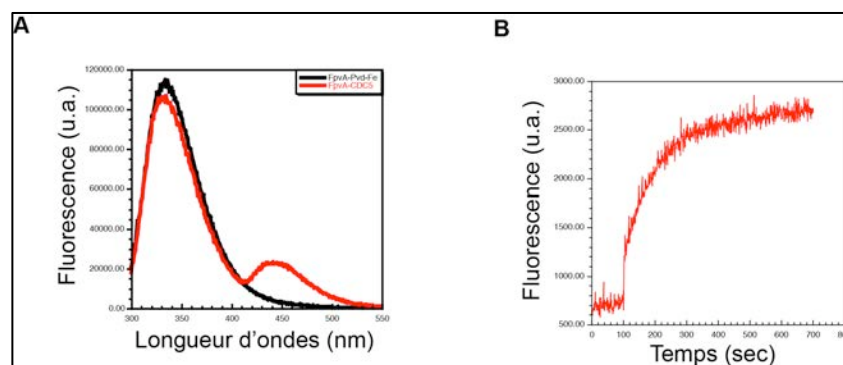


Figure 52 : Spectre d'émission de fluorescence de la protéine FpvA

Emission de fluorescence de la protéine FpvA purifiée à partir de la souche CDC5 après excitation à 290 nm (A). En présence de Pvd-Fe, aucun FRET n'est observé (noir) alors que la forme apo émet un signal à 450 nm correspondant à un probable précurseur de Pvd (rouge). Cinétique d'association de Pvd-Ga sur la protéine FpvA (B). L'émission de fluorescence de Pvd-Ga (450 nm) est enregistrée au cours du temps après excitation des Trp à 290 nm.

Grâce au protocole de purification mis en place sur la souche PAD06, j'ai purifié plusieurs milligrammes de protéines avec un rendement moyen de 1 mg par litre de culture bactérienne. Dans ce cas, le contrôle par FRET a permis de confirmer l'absence de pyoverdine liée au transporteur.

Le résultat des criblages pour la cristallogenèse a permis d'identifier plusieurs conditions de cristallisation dont : (i) MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) 0,1 M pH 6,5, Na_2HPO_4 1,5 M, (ii) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ 0,1 M pH 4,6, PEG 4000 12% (m/v). Une optimisation manuelle en plaques 24 puits m'a permis d'améliorer la qualité de ces cristaux (**Figure 53**).

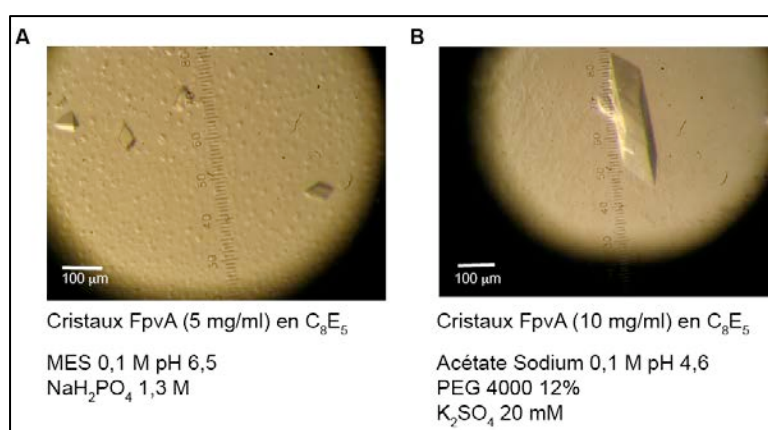


Figure 53 : Cristaux de la forme vide du transporteur FpvA

Plusieurs dizaines de cristaux ont été congelés soit directement dans l'azote liquide soit en utilisant des trempages dans différents cryoprotectants. Grâce aux

cristaux présentés sur la **figure 53A**, un jeu de donnée à 2,77 Å a été collecté par le Dr David COBESSI sur la ligne ID23-1 à l'ESRF de Grenoble.

La structure de FpvA-apo a été résolue, par le Dr David COBESSI, par remplacement moléculaire en utilisant les coordonnées atomiques de FpvA-Pvd-Fe (PDB 2IAH) (Wirth *et al.*, 2007). L'analyse de la structure de FpvA sous sa forme vide montre que ce récepteur adopte la conformation classique des TBDT : un tonneau à 22 brins β anti-parallèles obstrué par un domaine bouchon (**Figure 54A**). Le bouchon est connecté à un domaine de signalisation qui adopte une conformation de type β - α - β , semblable à celui des transporteurs FecA ou PupA résolus par RMN (Ferguson *et al.*, 2007 ; Garcia-Herrero & Vogel, 2005). Dans le cristal, on observe deux molécules dans l'unité asymétrique (A et B). La différence majeure entre ces molécules est la position du domaine de signalisation, et l'absence de densité électronique entre le bouchon et le domaine de signalisation de la molécule B. Cette différence de position du domaine de signalisation résulte probablement de l'action des composés présents dans la condition de cristallisation (1,3 M Na_2HPO_4), qui peuvent déstabiliser les interactions faibles entre le domaine périplasmique et le reste de la protéine. Dans la molécule A la structure de la boîte TonB a été entièrement résolue, alors que sur la molécule B on n'observe pas de densité en raison d'une probable flexibilité de cette région. Au niveau de la molécule A, les trois brins β du domaine de signalisation s'associent avec le brin β de la boîte TonB pour former un feuillet de quatre brins β .

Deux liaisons hydrogène sont observées entre les résidus de la boîte TonB et le feuillet β_2 du domaine de signalisation impliquant respectivement les résidus Ile-132/Tyr-72 et Thr-133/Gln-60. La comparaison avec les structures de FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe montre plusieurs changements de conformation (**Figure 54B**).

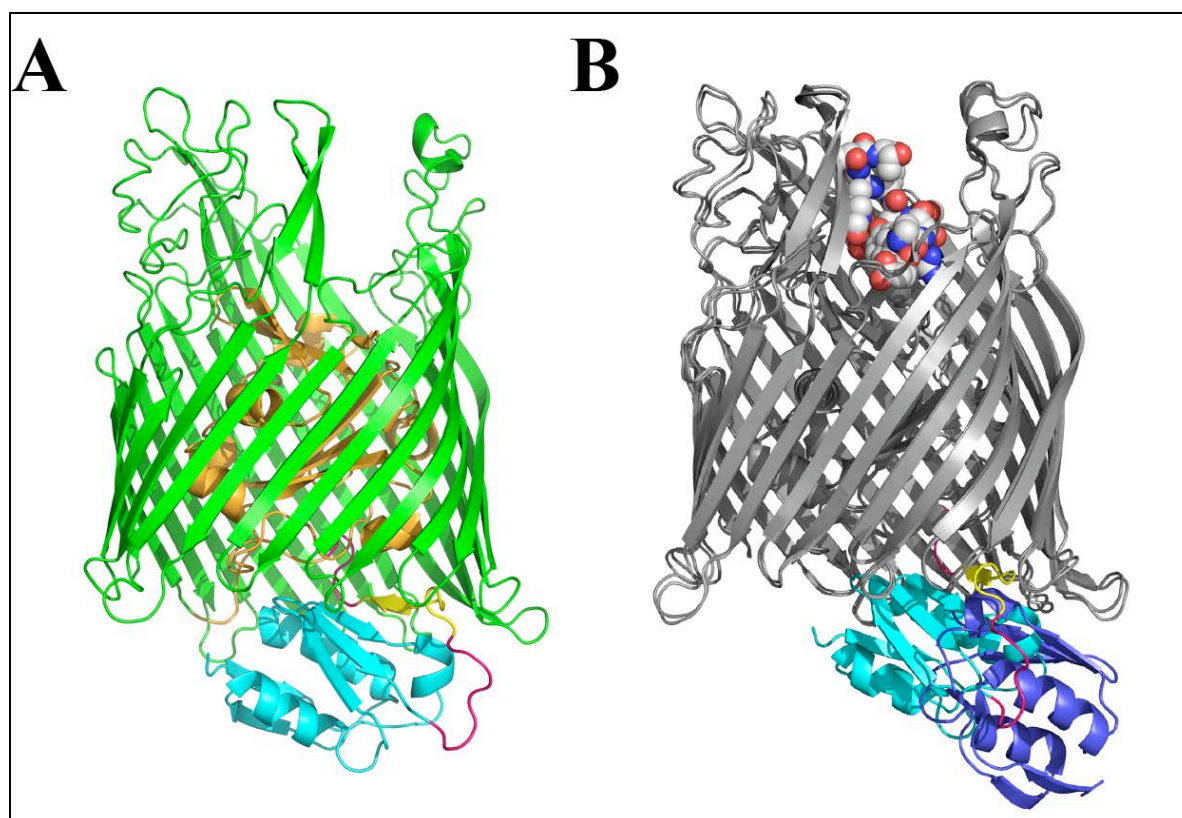


Figure 54 : Représentation de la structure de FpvA vide

Structures de FpvA sous sa forme vide (A). La boîte TonB, représentée en jaune, interagit avec un feuillet β du domaine de signalisation du transporteur FpvA. La superposition de FpvA et FpvA-Pvd-Fe (B) (PDB 2IAH) montre un mouvement du domaine de signalisation permettant la libération de la boîte TonB. Le domaine bouchon est représenté en orange et le tonneau β en vert. La molécule de pyoverdine est représentée en sphères de van der Waals, le domaine de signalisation en cyan pour FpvA et en bleu pour FpvA-Pvd-Fe.

Au niveau du domaine bouchon, la boucle contenant les résidus Ser-224 à Ala-233 se déplace pour interagir avec le sidérophore (Figure 3 de l'article), et l'Arg-204 rompt sa liaison hydrogène avec la Ser-232 pour venir interagir avec la Pvd (**Figure 55B**). Au niveau de la boucle extracellulaire L3, on observe un déplacement des résidus Gly-359 à Trp-362, permettant ainsi la fixation du sidérophore. Le résidu Trp-362 interagit alors avec la Pvd (**Figure 55A**). Si on compare à la structure de FpvA-Pvd-Fe le mouvement le plus important concerne le domaine de signalisation. En présence de Pvd-Fe, le domaine de signalisation se déplace et libère la boîte TonB permettant alors l'interaction avec la protéine TonB, nécessaire à la translocation de la pyoverdine (Figure 4, publication n°9).

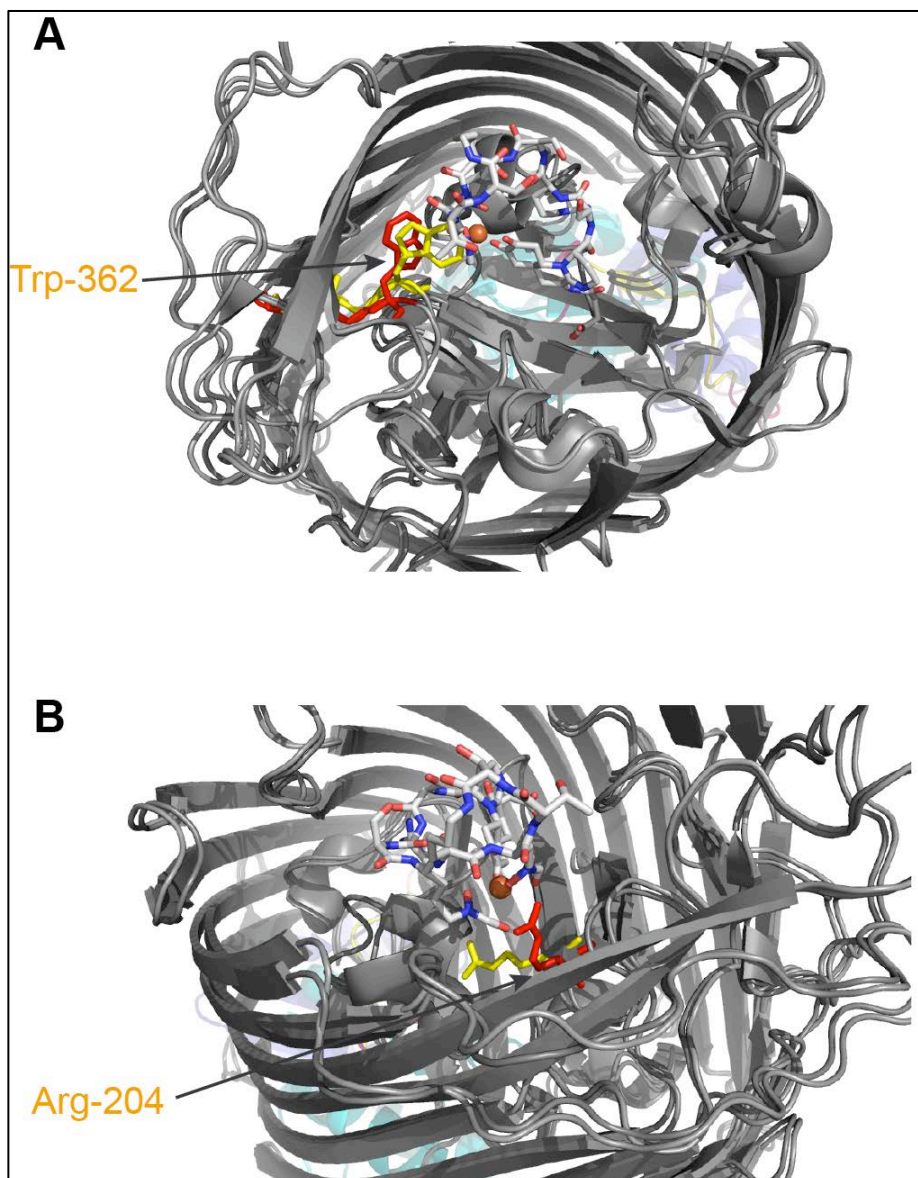


Figure 55 : Superposition des structures de FpvA et FpvA-Pvd-Fe

La superposition des structures de FpvA (PDB 2O5P) et FpvA-Pvd-Fe (PDB 2IAH) montre un déplacement des résidus de la boucle extracellulaire L3, notamment du Trp-362 qui vient interagir avec le complexe Pvd-Fe, représenté en bâtonnets (**A**). On observe également qu'en présence du ligand l'Arg-204 change d'orientation et pointe vers le complexe Pvd-Fe (**B**). Les résidus Trp-362 et Arg-204 sont représentés en jaune pour FpvA et en rouge pour FpvA-Pvd-Fe. L'atome de fer est représenté en sphère de van der Waals orange.

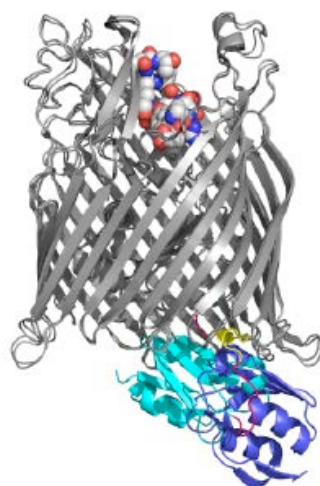
1.4 Conclusion

Mon travail a permis de résoudre la structure du transporteur FpvA, sous sa forme vide, et de comparer cette structure avec celles des complexes FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe. Le transport de petites molécules au travers de la membrane externe des bactéries Gram-négatives par les TBDT est énergie-dépendant. L'observation des structures des complexes FhuA-TonB ou BtuB-TonB montre que ce transport

implique une interaction directe entre une courte séquence de la partie N-terminale du récepteur (boîte TonB) et la protéine TonB localisée dans la membrane interne. L'analyse et la comparaison des différentes structures de FpvA montre que, pour le récepteur vide, les résidus de la boîte TonB sont sous forme d'un brin β qui interagit avec trois feuillets β du domaine de signalisation du transporteur empêchant ainsi son interaction avec les trois feuillets β de la protéine TonB. Pour que FpvA puisse interagir avec TonB, il est nécessaire d'avoir un mouvement et un mécanisme d'échange de brins β , ce qui est compatible avec les analyses et les comparaisons des structures des différentes formes du transporteur FpvA. Ce n'est qu'au niveau de FpvA-Pvd-Fe que la position du domaine de signalisation autorise une interaction de la boîte TonB avec la protéine TonB d'une part, et du domaine de signalisation avec le régulateur FpvR d'autre part. Ces résultats montrent que différents changements de conformation ont lieu afin de permettre le transport du ferri-sidérophore et l'activation de la cascade de signalisation. Ces travaux ont été publiés en 2007 dans le journal **Structure** (Publication n°9, (Brillet *et al.*, 2007)) et la structure a été déposée dans la base de données PDB sous le code 2O5P. Un article publié récemment sur le transporteur FecA (Mokdad *et al.*, 2012) montre également le mouvement de ce domaine de signalisation après fixation du complexe citrate-Fe. L'ajout de la partie périplasmique de la protéine TonB génère également un mouvement de rotation de ce domaine favorisant la libération de la boîte TonB et l'interaction avec le facteur régulateur FecR. Ces différents mouvements permettent la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer (Mokdad *et al.*, 2012).

1.5 Publication : Brillet *et al.*, 2007, *Structure*

Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., Cobessi, D. A β strand lock exchange for signal transduction in TonB-dépendant transducers on the basis of a common structural motif. *Structure*, 2007, Vol 15, n°11, p. 1383-1391.



A β Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif

Karl Brillet,¹ Laure Journet,¹ Hervé Célia,¹ Laetitia Paulus,¹ Aude Stahl,¹ Franc Pattus,¹ and David Cobessi^{1,*}

¹Institut Gilbert-Lautiat, UMR7175 CNRS/Université Louis Pasteur, Strasbourg I, Département Récepteurs et Protéines Membranaires, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brandt, BP 10413, F-67412 Illkirch, France

*Correspondence: cobessi@esbs.u-strasbg.fr

DOI 10.1016/j.str.2007.08.013

SUMMARY

Transport of molecules larger than 600 Da across the outer membrane involves TonB-dependent receptors and TonB-ExbB-ExbD of the inner membrane. The transport is energy consuming, and involves direct interactions between a short N-terminal sequence of receptor, called the TonB box, and TonB. We solved the structure of the ferric pyoverdine (Pvd-Fe) outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* in its apo form. Structure analyses show that residues of the TonB box are in a β strand which interacts through a mixed four-stranded β sheet with the periplasmic signaling domain involved in interactions with an inner membrane sigma regulator. In this conformation, the TonB box cannot form a four-stranded β sheet with TonB. The FhuA-TonB or BtuB-TonB structures show that the TonB-FpvA interactions require a conformational change which involves a β strand lock-exchange mechanism. This mechanism is compatible with movements of the periplasmic domain deduced from crystallographic analyses of FpvA, FpvA-Pvd, and FpvA-Pvd-Fe.

INTRODUCTION

Iron is an essential element for most living organisms (Posey and Gherardini, 2000) and necessary for the virulence of pathogenic Gram-negative bacteria. Although iron is one of the most abundant elements on earth, its bioavailability is very poor (Neilands, 1995): under aerobic conditions or at physiological pH, it precipitates to form insoluble iron oxy-hydroxide complexes. Its free concentration in biological fluids is very low (10^{-18} M), and less than that required for bacterial growth ($\sim 10^{-7}$ M to 10^{-8} M) (Stintzi et al., 2000). Under iron-limiting conditions, most bacteria synthesize and secrete iron chelators, called siderophores, which bind iron (III) and make it available

for the cell (Ferguson and Deisenhofer, 2002). During infection, these iron siderophores, which are small molecules (MW 350–1500 Da), compete with iron storage proteins for iron. Iron siderophores, and other molecules larger than 600 Da such as vitamin B12, do not diffuse through the outer membrane passively and do not use nonspecific or substrate-specific porins for entry. Metal siderophores are transported by TonB-dependent receptors (Ferguson and Deisenhofer, 2002, 2004) using an energy-consuming mechanism involving interactions between the TonB box of the receptor and TonB of the TonB-ExbB-ExbD complex located in the inner membrane. In the crystal structure of two siderophore receptors (FhuA and BtuB) interacting with the C-terminal domain of TonB (Pro153–Asn233 in BtuB-TonB or Arg158–Thr235 in FhuA-TonB), the TonB box is folded into a β strand and interacts with the mixed three-stranded β sheet of the TonB periplasmic part, thereby forming a mixed four-stranded β sheet (Pawelek et al., 2006; Shultis et al., 2006).

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen which infects injured, immunodeficient, or otherwise compromised patients. Under iron-limiting conditions, the bacterium secretes a major siderophore, pyoverdine (Pvd) (Poole and McKay, 2003). Pvd contributes to infection by competing with transferrin for iron, and thereby overcomes the iron-withholding mechanism present in mammals. The pyoverdine receptor, FpvA, is embedded in the outer membrane in a complex with Pvd (Schalk et al., 1999). FpvA belongs to the TonB-transducer family. Members of this family are TonB-dependent transporters with a signaling domain, upstream from the TonB box, which interacts with a sigma regulator of the inner membrane (Koeblnik, 2005), called FpvR in *P. aeruginosa*. These transducers are able to regulate their own synthesis as well as that of their cognate siderophore, and this regulation depends solely on ferric siderophore binding (Braun et al., 2003; Schalk et al., 2004). The three-dimensional structures of the outer membrane transducer FecA from *Escherichia coli* (Ferguson et al., 2002; Yue et al., 2003) and FpvA from *P. aeruginosa* (Cobessi et al., 2005a) have now been solved. Structural studies of FpvA-Pvd-Fe are the only source so far of structural data on interactions of the signaling domain folded with the rest of the receptor (Wirth et al., 2007). In this structure,

Table 1. X-Ray Data Statistics

Wavelength (Å)	0.97565
Resolution (Å)	47.14–2.77 (2.92–2.77)
Space group	C2
Cell parameters (Å)	189.88, 128.78, 139.15, $\beta = 130.55^\circ$
Total reflections	248,120 (20,956)
Unique reflections	63,018 (7,865)
Completeness (%)	97.5 (83.7)
I/ σ I	13.7 (2.7)
R _{sym} (%) ^a	8.0 (39.1)

Values in parentheses correspond to the statistics in the highest-resolution shell.

^a $R_{\text{sym}} = \sum \sum |I_i - I_m| / \sum \sum I_i$, where I_i is the intensity of the measured reflection and I_m is the mean intensity of this reflection.

the TonB box was not observed in the electron density, and the loop of 20 residues connecting the signaling domain to the membrane part of the protein was also not found. The fold of the FpvA signaling domain is similar to those of FecA (Garcia-Herrero and Vogel, 2005; Wirth et al., 2007) and PupA from *Pseudomonas putida* (Ferguson et al., 2007) solved by NMR.

We report here the full-length crystal structure of a transducer where residues of the TonB box are in a β strand which forms a mixed four-stranded β sheet with the three-stranded β sheet of the signaling domain. In this conformation, the residues of TonB are buried between the signaling domain and the plug and barrel and cannot interact with TonB through a four-stranded β sheet. Interactions between TonB and the TonB box require structural changes of the receptor involving displacement of the signaling domain in the periplasm. This mechanism is strongly supported by structural comparisons and modeling based on the FhuA-TonB and BtuB-TonB structures.

RESULTS

Structural Differences in the Asymmetric Unit Reveal Structural Plasticity of FpvA

FpvA was crystallized in a solution containing between 1.3 and 1.4 M Na₂HPO₄ and 0.1 M MES (pH 6.5) in space group C2 (Table 1). Two molecules are in the asymmetric unit. The membrane part is involved in the intermolecular contacts in the asymmetric unit and the crystals are type II membrane protein crystals. The overall folding of the protein is consistent with the classical fold of TonB-dependent transducers: a 22 β -stranded barrel of which the lumen is occluded by the plug domain connected to the periplasmic signaling domain which displays a β - α - β fold (Wirth et al., 2007). The pH of the crystallization solution is 5.6 and several mono-anionic phosphate ions (Table 2) bound to glutamate carboxylate groups were identified in the F_o – F_c electron density map.

Table 2. Refinement and Model Statistics

Resolution range (Å)	30.47–2.77 (2.84–2.77)
Number of reflections used for R _{cryst} calculation	56,582 (3,041)
Number of reflections used for R _{free} calculation	3,195 (184)
Data cutoff F/ σ_F	0.0
R _{cryst} value (%) ^a	20.77 (29.9)
R _{free} value (%)	24.72 (33.0)
Number of nonhydrogen protein atoms	12,110
Number of phosphate ions	10
Mean B factors, protein main-chain atoms (Å ²)	39.87
Mean B factors, protein side-chain atoms (Å ²)	40.88
Ramachandran plot	
Residues in most favored regions (%)	87.7
Residues in additionally allowed regions (%)	11.4
Residues in generously allowed regions (%)	0.8
Residues in disallowed regions (%)	0.0
Rms differences from ideal geometry	
Bond length (Å)	0.011
Bond angle (°)	1.388

Values in parentheses correspond to the statistics in the highest-resolution shell.

^a $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} (Brunger, 1992) is the same as R_{cryst} but calculated for n% data omitted from the refinement where n is 5.1% for FpvA.

Continuous electron density was observed from Gln44 to Phe815 in one molecule of the asymmetric unit (molecule A), whereas in the second (molecule B), the electron density covered from Gln44 to Val117 and from Gln136 to Phe815. The molecules can only be superimposed from Gln136 to Phe815. The root-mean-square deviation (rmsd) is 0.578 Å for the overall structure. The main difference between the two molecules is the position of the signaling domain, and the lack of electron density connecting the signaling to the plug domain in molecule B (Figures 1 and 2). The signaling domain is not at the same location, and two distinct interaction zones between the domain and the rest of the protein are observed (Figure 2). In molecule A, the mixed three-stranded β sheet of the signaling domain forms a four-stranded β sheet with residues of the TonB box (Figure 1D). The fourth strand involves the residues Met131–Thr133. The Ile132 main chain is hydrogen bonded to the Tyr72 main chain, and the Thr133 carbonyl group is hydrogen bonded to the Gln60 side chain. Ile132

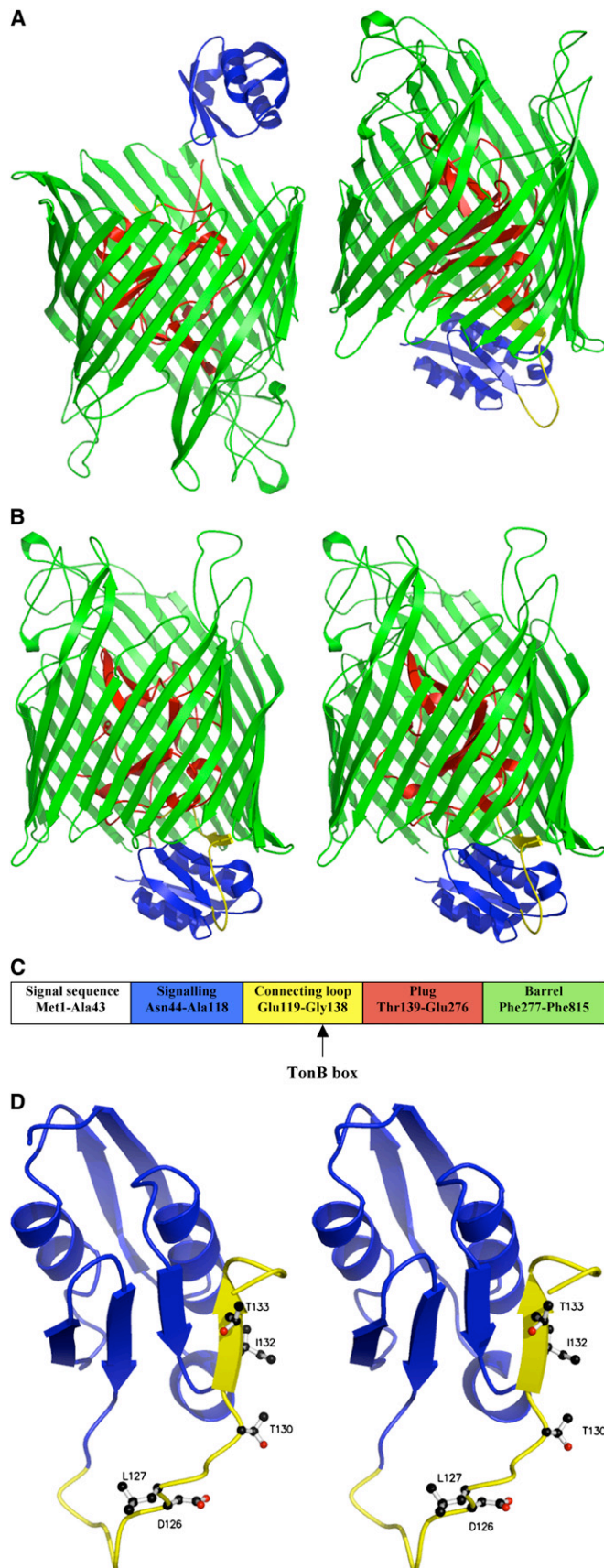


Figure 1. The FpvA Structure in Its Apo Form

(A) A view of the asymmetric unit. The signaling domain is colored blue. The loop connecting the signaling domain to the plug domain is colored yellow (molecule A). The plug is colored red and the barrel is in green.

(B) A stereoview of the full-length FpvA (molecule A).

(C) The FpvA domains (Wirth et al., 2007) including the connecting loop (yellow), which contains the TonB box composed of Asp126, Leu127, Thr130, Ile132, and Thr133 (Ferguson et al., 2007).

(D) A stereoview of the four-stranded β sheet between residues of the TonB box located in a β strand and the three-stranded β sheet of the periplasmic signaling domain. Residues of the TonB box (Ferguson et al., 2007) are drawn in ball-and-stick representations and the connecting loop containing the TonB box is colored yellow.

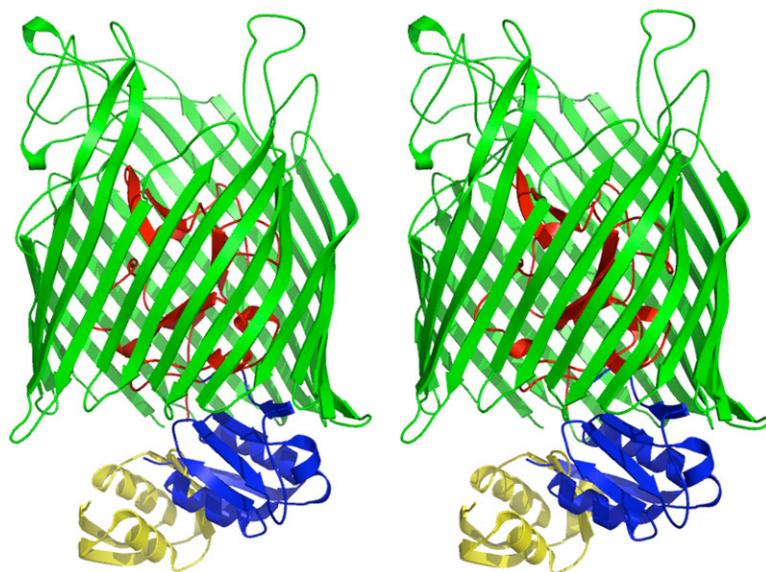


Figure 2. Stereoview of the Superimposition of the FpvA Molecules of the Asymmetric Unit

The two positions of the signaling domain are shown. For clarity, only one barrel and one plug have been drawn.

and Thr133 belong to the TonB box (Ferguson et al., 2007) (Figure 1D).

The signaling domains can be superimposed with a 0.68 Å rmsd value. The largest deviations are observed from Gln109 to Asn111 (as large as 3.43 Å for Gly110). Eighty-one interatomic contacts less than 3.6 Å are observed between Gln44–Gln136 and Leu137–Phe815 in molecule A: 34 can be considered to be hydrogen bonds. In molecule B, 21 interatomic contacts of less than 3.6 Å are observed between Gln44–Val117 and Leu137–Phe815; 6 of these are hydrogen bonds.

Structural Comparisons with FpvA-Pvd and FpvA-Pvd-Fe: Extracellular Conformational Changes Mediate Periplasmic Structural Changes

FpvA and FpvA-Pvd superimpose with an rmsd value of 0.87 Å. Upon Pvd binding, large conformational changes are observed in the Pvd-binding pocket (Figures 3A and 3B). In the plug, Ser224–Ala233 does not superimpose, and large distances of up to 7.50 Å (Tyr231 C α atom) are observed between equivalent residues (Figures 3A and 3B). In FpvA, the Arg204 guanidinium group is hydrogen bonded to the Ser232 hydroxyl and carbonyl group. In FpvA-Pvd, this interaction does not exist because of the conformational change of the binding pocket and because the Arg204 points toward Pvd. In the barrel, Gly359–Trp362 are not superimposed. In FpvA-Pvd, Trp362 interacts with Pvd: movements of this part of the barrel allow FpvA to bind Pvd. The TonB box no longer interacts with the signaling domain and its conformation is changed.

In the periplasmic domain, Ala129–Gln136 does not superimpose (Figures 3A and 3C). The signaling domain is not observed in FpvA-Pvd, although the core of the plug domain does not show any conformational changes; the conformational changes observed in the extracellular loops can be attributed to crystal packing rather than to Pvd binding.

The rmsd value between FpvA and FpvA-Pvd-Fe is 0.735 Å for all residues. FpvA-Pvd-Fe and FpvA-Pvd superimpose well between residues Thr139 and Phe815, and the differences described between FpvA and FpvA-Pvd are also observed between FpvA and FpvA-Pvd-Fe but particularly in the N-terminal part. Indeed, the FpvA-Pvd-Fe structure was solved for residues Gln44–Ala118 and Thr139–Phe815 (Wirth et al., 2007). The other large difference is the location of the signaling domains, which does not correspond to those observed in FpvA (Figure 4). The rmsd value between the signaling domains is 0.63 Å. The Gly101–Gly103 region does not superimpose.

Structure Comparison with FhuA-TonB and BtuB-TonB: A β Strand Exchange and Conformational Changes Are Required for Signal Transduction

Interactions between FhuA and the periplasmic part of TonB involve the TonB box folded as a β strand with the three-stranded β sheet of the TonB periplasmic part (Pawelek et al., 2006), forming a mixed four-stranded β sheet. A similar topology is observed for the interaction between BtuB and the periplasmic part of TonB (Shultis et al., 2006). However, the location of TonB is different in the two complexes. A part of the TonB box of FpvA is folded as a β strand and interacts with the β sheet of the signaling domain, and in this conformation there is not enough space around the TonB box to bind the TonB periplasmic part. The periplasmic part of FpvA must therefore undergo a conformational change to create the space to bind to TonB.

FpvA-TonB Model Based on Structure Comparisons: A Complex for Transmembrane Signal Transduction

We superimposed FpvA and FpvA-Pvd-Fe onto FhuA-TonB and BtuB-TonB. Only in FpvA-Pvd-Fe is the signaling domain in a position to allow interactions with TonB

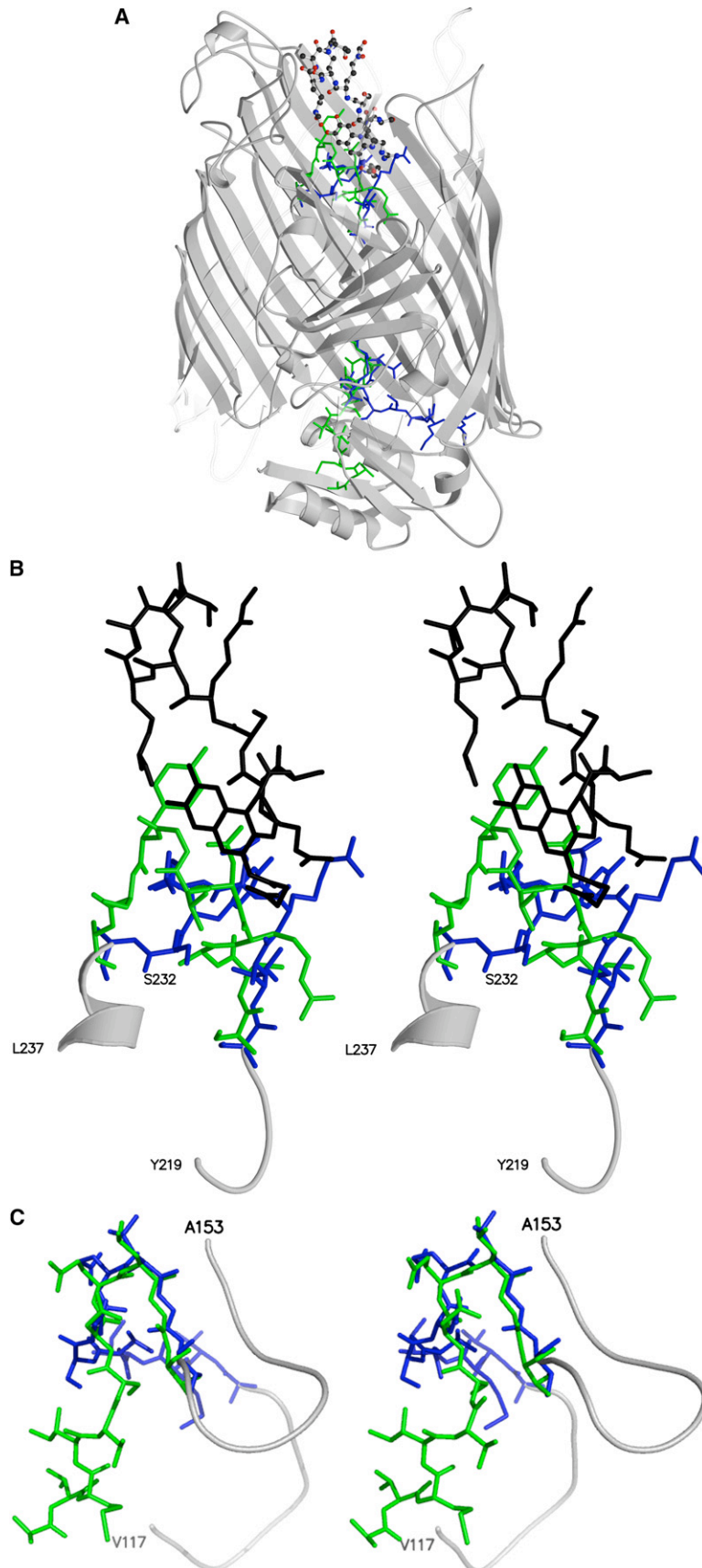


Figure 3. Main Conformational Changes Observed in FpvA upon Pvd Binding

(A) A view of the two main conformational changes.

(B) A stereoview of the conformational change of the main chain from Thr225 to Ala233 in the plug domain. FpvA is colored blue and FpvA-Pvd is in green. The pyoverdine is represented in stick form and is colored black. Tyr219, Ser232, and Leu237 are labeled.

(C) A stereoview of the conformational change observed in the N-terminal part of the plug domain containing residues of the TonB box upon Pvd binding in the extracellular pocket. FpvA is colored blue and FpvA-Pvd is in green. The N-terminal and C-terminal parts are labeled.

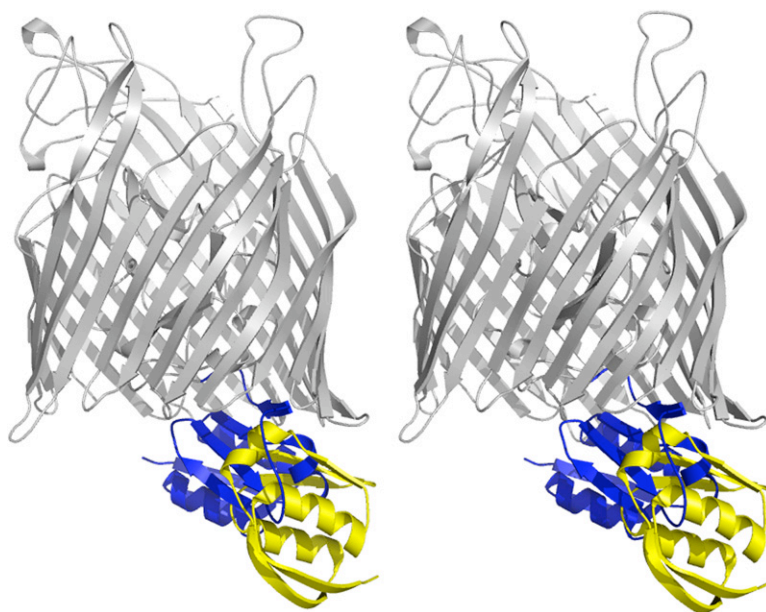


Figure 4. Stereoview of the Superimposition of FpvA onto FpvA-Pvd-Fe

The different positions occupied by the signaling domain are shown. For clarity, only the barrel and plug of FpvA are drawn, and are colored gray. The signaling domain of FpvA-Pvd-Fe is colored yellow.

(Figure 5C). A small number of forbidden contacts are observed between side chains of the periplasmic domain and TonB of FhuA-TonB, and all can be avoided by side-chain rotation. Molecule B of FpvA can be superimposed onto BtuB-TonB, but several forbidden contacts are made between the barrel domain and TonB. Forbidden contacts resulting from the overlap of domains are observed between the periplasmic domain of molecule A and TonB of FhuA-TonB or BtuB-TonB.

DISCUSSION

We crystallized FpvA with two molecules in different conformations in the asymmetric unit. The signaling domain occupies two distinct positions delineating two zones of interactions with the barrel domain. The difference between the two positions probably results from the crystallization conditions (1.3–1.4 M Na_2HPO_4), which may destabilize interactions between the signaling domain and the rest of the protein. This suggests that the interactions between the periplasmic domain and the rest of the protein are weak.

The structure of the TonB box has been completely solved: a part of the TonB box is folded as a β strand in molecule A and interacts with the three-stranded β sheet of the signaling domain (Figure 1D). The absence of electron density for the TonB box in molecule B indicates that it has substantial flexibility, and this may be a consequence of the position of the signaling domain. TonB box flexibility has been suggested previously (Cobessi et al., 2005a) for FpvA-Pvd: in this complex, the TonB box is in an extended conformation and the signaling domain is not observed in the electron density maps. This conformation may allow interactions between TonB and FpvA, and such interactions are necessary for Pvd release (Clement et al., 2004).

Pvd binding leads to conformational changes in its recognition pocket. The main chain from Thr225 to Ala233 in the plug domain and the side chains of several residues undergo conformational changes to create enough space for Pvd binding. In FpvA-Pvd and FpvA-Pvd-Fe, the Arg204 guanidinium group interacts with Pvd. Pvd and Pvd-Fe binding at the extracellular face leads to flexibility of the N-terminal part. This flexibility is even greater in FpvA-Pvd-Fe, in which the TonB box cannot be detected in electron density following Pvd-Fe binding (Wirth et al., 2007), and the signaling domain is located in a different position to that it adopts in FpvA. The flexibilities of the TonB box and signaling domain probably allow FpvA to interact with both (1) FpvR to regulate the expression of PvdS and Fpvl, responsible for transcription of pyoverdine biosynthetic genes and *fpva* gene (Redly and Poole, 2005), and (2) TonB for energy transduction. There is no biochemical data available to indicate whether there is formation of a ternary complex between the receptor, TonB, and FpvR or between their counterparts in other bacteria, for example FecA/FecR in *E. coli*. However, the interactions between these three proteins suggest that they are probably in close proximity to each other in the membranes.

The conformation of the N-terminal part of FpvA has to change to allow interactions between TonB and the TonB box; this interaction would otherwise be prevented by interactions between residues of the TonB box and the signaling domain which form a four-stranded β sheet. Structural comparisons with TonB-FhuA and TonB-BtuB suggest that the position of the signaling domain in FpvA also prevents interactions with TonB. Consequently, the signaling domain has to move away from either of the two observed positions in FpvA, to allow the interaction between the TonB box and TonB to take place (Figure 5). The interaction involving the signaling domain is probably

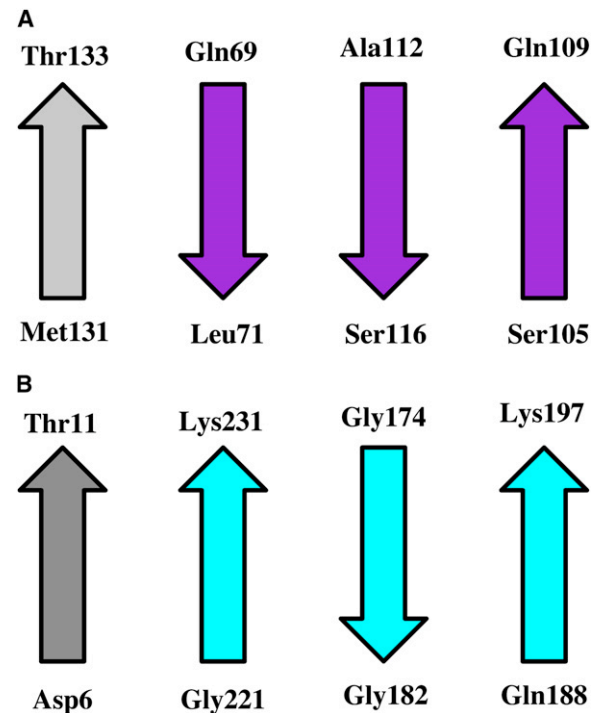
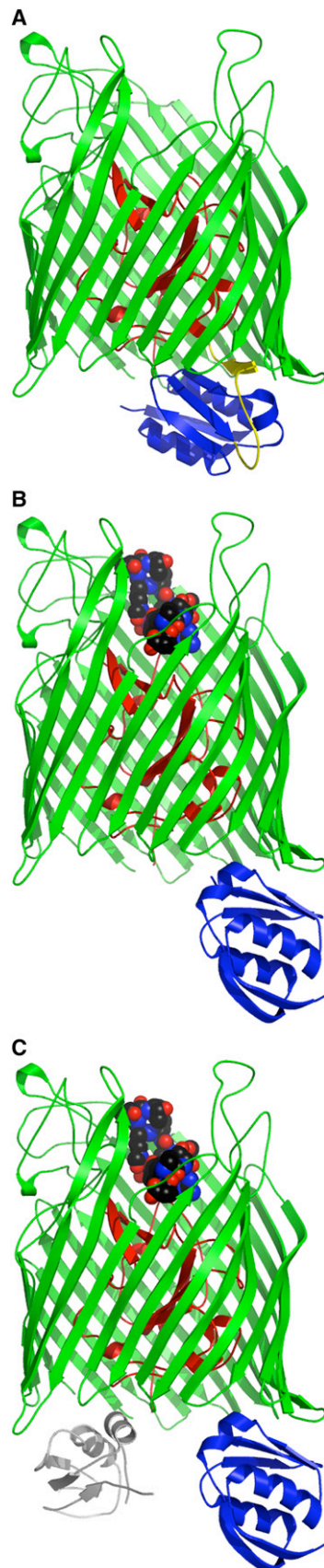


Figure 6. The β Strand Lock Exchange

Topologies of the four-stranded β sheet observed in FpvA between the TonB box and the three-stranded β sheet of the signaling domain (A), and between the TonB box and the TonB periplasmic domain in BtuB-TonB (B). The TonB box is colored gray.

weak, such that it can be displaced to interact with the inner membrane protein FpvR. One of the three observed positions for the periplasmic domain is compatible, according to modeling analyses, with interactions between TonB and the TonB box. The FpvA-Pvd-Fe structure may represent the interactions with the inner membrane proteins TonB and FpvR. It is possible that in such complexes FpvA could also interact with FpvR. Indeed, the two-stranded β sheet of the signaling domain is exposed to the solvent and contains residues which when mutated in FecA (Breidenstein et al., 2006) strongly affect signaling.

The conformational change (Figure 5) is also essential for interactions between TonB and the TonB box. In FpvA, this interaction is prevented by the interaction between residues of the TonB box folded as a β strand and the three-stranded β sheet of the signaling domain. The same type of structural motif (Figure 6) is also observed in the crystal structures of BtuB-TonB and FhuA-TonB:

Figure 5. View of the Sequential Conformational Change that Can Occur upon Pvd-Fe Binding

(A) FpvA: the TonB box is buried.

(B) Fpva-Pvd-Fe: the TonB box is flexible and the signaling domain has moved.

(C) A model of the complex between the periplasmic part of TonB and Fpva-Pvd-Fe based on the superimposition of Fpva-Pvd-Fe onto FhuA-TonB. The periplasmic domain of TonB is colored gray, and a space-filling representation is used for pyoverdine.

there is interaction between the TonB box folded as a β strand and the three-stranded β sheet of the periplasmic part of TonB; however, the structure of the protein complex involving FhuA does not superimpose onto that involving BtuB. To allow interactions through a conserved structural motif and the β strand exchange, the signaling domain must interact with the protein weakly. Sequence analyses do not reveal similarities between the β strands of TonB and the signaling domain involved in interactions with the TonB box. Presumably, therefore, only the conformation of the backbone is important. The core of FpvA shows the same overall conformation in all the structures described. This raises the question of the mechanism involved in the conformational change in the periplasm following the binding of the ligands at the extra-cellular face of the receptor.

The TonB box may therefore be a lock for signal transduction. Its destabilization after Pvd-Fe binding may allow movements of the signaling domain facilitating interaction with FpvR and, by destabilizing its interactions with the signaling domain, interaction with TonB through a four-stranded β sheet (Figure 5). The interaction between the signaling domain and FpvR leads to the activation of the sigma factors involved in transcription of the *fpvA* and pyoverdine biosynthetic genes. The interaction between TonB and the TonB box allows the energy transduction for iron-siderophore transport which necessitates a conformational change of the receptor. These observations and considerations suggest that there is a sequential mechanism for the conformational changes coupled to the transport and signal transduction involving FpvR and TonB.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification

The plasmid pPVR2, carrying the *fpvA* gene under the control of its own promoter (Poole et al., 1993), was used to transform the *P. aeruginosa* *pvdA*-deficient mutant PAD06 by an MgCl_2 -based method (Mercer and Loutit, 1979). These strains are unable to synthesize Pvd and overproduce FpvA when grown in a succinate medium (Demange et al., 1990). FpvA was purified as described previously for FptA (Cobessi et al., 2005b), with an additional anion-exchange chromatography step after gel filtration. At the end of the purification, ultrafiltration at 10,000 $\times$ g was used for detergent exchange with a 50 kDa molecular weight cutoff (Amicon, Millipore).

Crystallization

Initial screening was conducted at 293K using the sitting-drop vapor-diffusion method and the sparse-matrix sampling approach (Jancarik and Kim, 1991) with the Classic, Classic Lite, MbClass, and MbClass II sparse matrices from Nextal; 0.5% and 1% C8E4 or C8E5 were used. Aliquots of 0.5 μl of protein solution were mixed with an equal reservoir volume in 96-well plates, and several crystallization conditions were found. Crystallization conditions were refined using Cryshem plates and the sitting-drop vapor-diffusion method by mixing 0.5, 1, or 2 μl of protein solution with an equal reservoir volume, and the samples were equilibrated with the same precipitant. Crystals of FpvA were obtained by mixing 1.3–1.4 M NaH_2PO_4 , 0.1 M MES (pH 6.5) with 5 mg/ml FpvA in 1% C8E5.

Data Collection

Prior to data collection, crystals of FpvA were soaked in a solution containing 30% glycerol as the cryoprotection agent. X-ray diffraction

experiments were performed at 100K with crystals mounted in cryoloops and flash-frozen in liquid nitrogen. The data were collected on beamline ID23-1 at the European Synchrotron Radiation Facility. The data were processed using XDS (Kabsch, 1993) and scaled using SCALA (Evans, 1993). Statistics concerning data reduction and merging are summarized in Table 1.

Structure Resolution and Refinement

The structure was solved by molecular replacement using MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) from CCP4 (1994) and the residues from Thr139 to Phe815 of FpvA-Pvd-Fe as a molecular model (Wirth et al., 2007). The signaling domain and the connecting loop between the signaling domain and the plug were added in the $2F_o - F_c$ electron density map. The model was rebuilt using O (Jones et al., 1991) and cycles of translation/libration/screw refinement and energy minimization were carried out using REFMAC5 (Murshudov et al., 1997). The atomic coordinate file contains two FpvA molecules with the residues Gln44–Phe815 (molecule A), Gln44–Val117 and Gln136–Phe815 (molecule B), as well ten phosphate ions and one detergent molecule.

Model quality was assessed using PROCHECK (Laskowski et al., 1993) and WHATCHECK (Hooft et al., 1996). The majority of residues (87.7%) are in the most favored parts of the Ramachandran plot, 12.2% are in allowed regions, and no residue is found in disallowed regions. At the end of the refinement, the R and R_{free} (Brunger, 1992) factors were 20.8% and 24.7%, respectively (Table 2). The interactions between residues were found using CONTACT from CCP4 and a 3.6 Å distance cutoff. All the drawings were prepared using MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), PyMOL (DeLano, 2002), Raster3D (Merritt and Murphy, 1994), and CCP4. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (Berman et al., 2000) under ID code 2O5P.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the ID23-1 beamline at the ESRF for their kind assistance during data collection, and the “European Community—Research Infrastructure Action” under FP6 “Structuring the European Research Area Programme” contract RII3/CT/2004/5060008. This work was supported by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM), the ACI Interface Physique, Chimie, Biologie and the Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques program of the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie, and the Centre National de la Recherche Scientifique.

Received: July 19, 2007

Revised: August 27, 2007

Accepted: August 27, 2007

Published: November 13, 2007

REFERENCES

- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- Braun, V., Mahren, S., and Ogierman, M. (2003). Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 173–180.
- Breidenstein, E., Mahren, S., and Braun, V. (2006). Residues involved in FecR binding are localized on one side of the FecA signaling domain in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 6440–6442.
- Brunger, A.T. (1992). The R_{free} value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472–475.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.

- Clement, E., Mesini, P.J., Pattus, F., and Schalk, I.J. (2004). The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* 43, 7954–7965.
- Cobessi, D., Celia, H., Folschweiler, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2005a). The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 347, 121–134.
- Cobessi, D., Celia, H., and Pattus, F. (2005b). Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 352, 893–904.
- DeLano, W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System (Palo Alto, CA: DeLano Scientific).
- Demange, P., Bateman, A., Mertz, C., Dell, A., Piemont, Y., and Abdallah, M.A. (1990). Bacterial siderophores: structures of pyoverdins Pt, siderophores of *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192, and pyoverdins Pf, siderophores of *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Identification of an unusual natural amino acid. *Biochemistry* 29, 11041–11051.
- Evans, P.R. (1993). Data reduction. In *Proceedings of CCP4 Study Weekend on Data Collection and Processing*, L. Sawyer, N. Isaacs, and S. Bailey, eds. (Warrington, UK: Daresbury Laboratory), pp. 114–122.
- Ferguson, A.D., and Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors—structural perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 318–332.
- Ferguson, A.D., and Deisenhofer, J. (2004). Metal import through microbial membranes. *Cell* 116, 15–24.
- Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., Van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* 295, 1715–1719.
- Ferguson, A.D., Amezcuca, C.A., Halabi, N.M., Chelliah, Y., Rosen, M.K., Ranganathan, R., and Deisenhofer, J. (2007). Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 513–518.
- Garcia-Herrero, A., and Vogel, H.J. (2005). Nuclear magnetic resonance solution structure of the periplasmic signalling domain of the TonB-dependent outer membrane transporter FecA from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 58, 1226–1237.
- Hooft, R.W.W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E.E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272.
- Jancarik, J., and Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409–411.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* 47, 110–119.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.
- Koebnik, R. (2005). TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.* 13, 343–347.
- Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Mercer, A.A., and Loutit, J.S. (1979). Transformation and transfection of *Pseudomonas aeruginosa*: effects of metal ions. *J. Bacteriol.* 140, 37–42.
- Merritt, E.A., and Murphy, M.E.P. (1994). Raster3D version 2.4—a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 869–873.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
- Neilslands, J.B. (1995). Siderophores, structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
- Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M., and Coulton, J.W. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* 312, 1399–1402.
- Poole, K., and McKay, G.A. (2003). Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* 8, D661–D686.
- Poole, K., Neshat, S., Krebes, K., and Heinrichs, D.E. (1993). Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175, 4597–4604.
- Posey, J.E., and Gherardini, F.C. (2000). Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288, 1651–1653.
- Redly, G.A., and Poole, K. (2005). FpvIR control of fpvA ferric pyoverdine receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of an interaction between Fpvi and FpvR and identification of mutations in each compromising this interaction. *J. Bacteriol.* 187, 5648–5657.
- Schalk, I.J., Kyslik, P., Prome, D., Van Dorssealer, A., Poole, K., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (1999). Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implication for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* 38, 9357–9365.
- Schalk, I.J., Yue, W.W., and Buchanan, S.K. (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron siderophores. *Mol. Microbiol.* 54, 14–22.
- Shultz, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N., and Wiener, M.C. (2006). Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* 312, 1396–1399.
- Stintzi, A., Barnes, C., Xu, J., and Raymond, K.N. (2000). Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10691–10696.
- Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025.
- Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007). From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J. Mol. Biol.* 368, 398–406.
- Yue, W.W., Grizot, S., and Buchanan, S.K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J. Mol. Biol.* 332, 353–368.

Accession Numbers

The atomic coordinates and structure factors of FpvA in its apo form have been deposited in the Protein Data Bank under ID code [2O5P](#).

2 Etudes structurales de différents transporteurs TonB-dépendants

L'analyse de séquences des génomes montre que l'ensemble des bactéries Gram-négatives possèdent des gènes codant pour des TBDT. En 2005 seulement quatre structures de TBDT avaient été résolues : FepA, FhuA, FecA et BtuB d'*E. coli*. Au laboratoire, deux nouvelles structures de FpvA et FptA, chez *P. aeruginosa*, ont été résolues sous leur forme apo ou holo (Brillet *et al.*, 2007 ; Cobessi *et al.*, 2005b ; Cobessi *et al.*, 2005a ; Greenwald *et al.*, 2009 ; Wirth *et al.*, 2007). Dans le cadre de nos efforts pour comprendre la cristallisation des protéines membranaires et les mécanismes moléculaires du transport du fer chez les bactéries Gram-négatives, nous avons choisi de développer une stratégie permettant d'aller facilement du clonage à la cristallisation de cette famille de protéines. Nous avons choisi d'étudier plusieurs cibles : (i) ShuA transporteur de l'hème/hémoglobine chez *Shigella dysenteriae*, pathogène chez l'homme et responsable de la dysenterie, (ii) FauA transporteur de l'alcaligine ferrique chez *Bordetella pertussis*, pathogène chez l'homme et responsable de la coqueluche, (iii) SuxA transporteur du saccharose chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, pathogène des végétaux responsable du pourrissement noir des feuilles et (iv) FetA transporteur de l'énantiopyochéline ferrique chez *Pseudomonas fluorescens*, pathogène opportuniste chez l'homme responsable d'infections. N'ayant pas travaillé directement sur SuxA, je n'en parlerai pas dans ce manuscrit.

2.1 **Structure du transporteur de l'alcaligine FauA, chez *Bordetella pertussis***

Bordetella pertussis est une bactérie Gram-négative, de petite taille, encapsulée et immobile. C'est un organisme aérobic stricte dont la température de croissance se situe entre 35 et 37°C. *B. pertussis* est un agent pathogène respiratoire responsable de la coqueluche, qui engendre une infection localisée au niveau des bronches. Ce pathogène produit et sécrète l'alcaligine, un sidérophore contenant plusieurs groupements hydroxamates (**Figure 56**) (Brickman & Armstrong, 1999). Après sécrétion dans le milieu extracellulaire et chélation du fer, le complexe

alcaligine-fer traverse la membrane externe grâce au transporteur FauA (Brickman & Armstrong, 1999 ; Brickman & Armstrong, 2007). FauA appartient à la famille des TBDT, nous avons donc entrepris de résoudre sa structure tridimensionnelle.

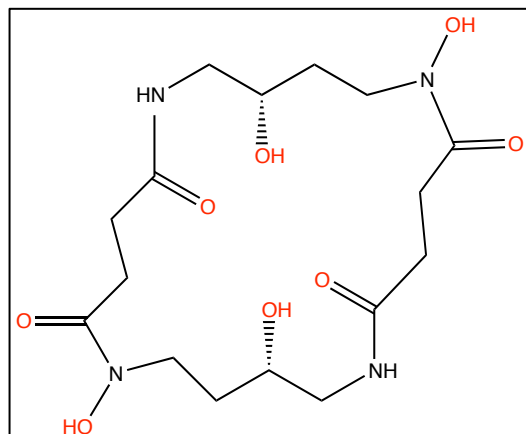


Figure 56 : Structure de l'alcaligine

Représentation de la structure de l'alcaligine, sidérophore produit par *B. pertussis*. Les quatre groupements hydroxamates de la molécule sont représentés en rouge.

2.2 Approches expérimentales

2.2.1 Clonage et expression des protéines cibles

Dans ce travail, que j'ai réalisé de manière autonome, la première stratégie choisie a été de placer une séquence étiquette His₆ au niveau de la partie N-terminale du transporteur. J'ai réalisé l'amplification par PCR du gène d'intérêt, en choisissant et en intégrant les sites de restriction adaptés au niveau des oligonucléotides (sites EcoRV et HindIII). Pour ces constructions la séquence signal native, identifiée en utilisant le serveur *SignalIP 4.1* (Petersen *et al.*, 2011), a été retirée. J'ai ensuite inséré le fragment amplifié dans un plasmide de surexpression d'*Escherichia coli*, contenant la séquence signal *pelB* d'*E. coli*, permettant un adressage de la protéine vers la membrane externe. Après expression, les membranes totales ont été préparées et séparées sur un gradient de sucrose à trois coussins : 20%, 50% et 60% (m/v). J'ai ensuite analysé la localisation de la protéine par immunodétection. Avec cette première stratégie, l'analyse montre que la protéine est adressée au niveau de la membrane interne de la bactérie et non à la membrane externe (**Figure 57A**).

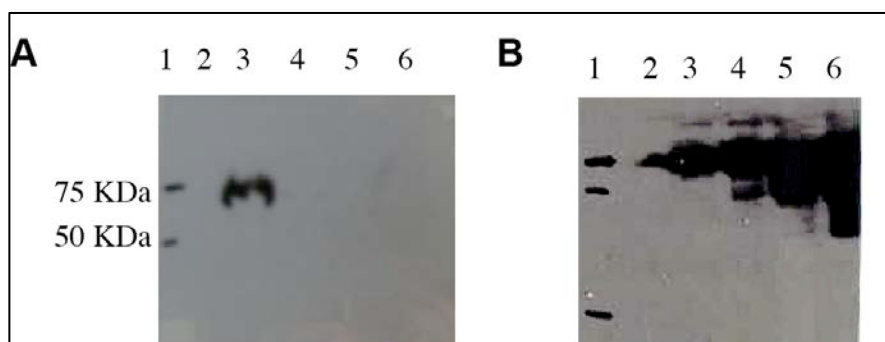


Figure 57 : Analyse de la localisation de la protéine par immunodétection après séparation sur gradient de sucrose

Détection de l'étiquette His₆ par immunoblot après séparation des membranes totales sur gradient de sucrose. **(A)** Les protéines marquées en position N-terminale sont exprimées faiblement et localisées au niveau de la membrane interne. **(B)** Les protéines marquées au niveau d'une boucle extracellulaire sont correctement adressées à la membrane externe et plus fortement exprimées. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire, piste 2 : partie supérieure du gradient, piste 3 : anneau de membranes internes, piste 4 : fraction intermédiaire, piste 5 : anneau de membranes externes, piste 6 : fraction inférieure du gradient.

Suite à ces résultats, j'ai mis en place une nouvelle approche expérimentale en plaçant l'étiquette His₆ au niveau d'une longue boucle extracellulaire L5. Cette fois l'analyse sur gradient de sucrose a bien montré une forte expression de la protéine et un adressage correct au niveau de la membrane externe (**Figure 57B**). Au laboratoire, j'ai employé cette stratégie pour le clonage des transporteurs FauA et ShuA, qui ont été exprimés dans un système hétérologue (*E. coli*, BL21(DE3)). Le clonage du transporteur SuxA a été réalisé par l'équipe d'Emmanuelle LAUBER (INRA, Toulouse). Le clonage du transporteur FetA a été réalisé par l'équipe du Dr Cornelia REIMMANN (Université de Lausanne, Suisse) en système homologue. Pour la surexpression de ces différentes protéines, j'ai testé différentes conditions en faisant varier la concentration de l'agent inducteur, le temps et la température d'induction.

2.2.2 Mise au point d'une méthode globale de purification.

La purification des différentes cibles a été effectuée selon un même modèle. J'ai basé la première étape de solubilisation sur un protocole utilisé au laboratoire pour la purification de FpvA, c'est-à-dire une première étape de lyse par sonication suivie d'une solubilisation spécifique des membranes internes avec un détergent doux, le N-Lauroylsarcosine. Après ultracentrifugation de l'échantillon, les protéines cibles de la membrane externe sont extraites et solubilisées en utilisant l'OPOE

comme détergent. L'insertion d'une étiquette histidine m'a amené à choisir une première étape de chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Le niveau de pureté n'étant pas suffisant pour les approches de cristallisation, j'ai séparé l'échantillon sur une colonne échangeuse d'anions, après dessalage des fractions. Pour chacune des cibles, j'ai choisi le tampon adapté pour ioniser correctement la protéine en fonction de son pI. Pour certains transporteurs, les fractions d'élution ont été rassemblées et chargées sur une colonne de gel filtration. Après purification, la qualité de l'échantillon a été contrôlée sur gel SDS-PAGE. Un échange de détergent a été effectué par ultrafiltration afin d'obtenir la protéine dans des détergents comme le C₈E₄, le C₈E₅, l'OG, le CHESO ou le LDAO, ayant déjà prouvé leur efficacité dans les expériences de cristallisation de protéines membranaires structurées en tonneau β .

2.2.3 Cristallisation des transporteurs FauA, ShuA, SuxA et FetA

Pour cristalliser chaque TBDT, j'ai utilisé quatre matrices clairsemées : *MbClass suite*, *MbClass II suite*, *The Classics*, *The Classics suite*. Ces tests ont été réalisés avec plusieurs détergents, à différentes concentrations (m/v), en tenant compte de la concentration micellaire critique (CMC) : C₈E₄ 0,75% (CMC = 0,22%), le C₈E₅ 0,75% (CMC = 0,15%), l'OG 1,4% (CMC = 0,2%), le CHESO 1,2 ou 1,8% (CMC = 0,6%) ou le LDAO 0,06% (CMC = 0,02%). Pour ces expériences, j'ai utilisé la technique de diffusion de vapeur en gouttes assises, sur des plaques 96 puits contenant 3 réservoirs. Ces criblages ont été effectués sur la plateforme de biologie structurale du CEBGS, à Illkirch. Ainsi, j'ai pu tester un minimum de 1 152 conditions de cristallisation pour ShuA et FauA, et 2 304 conditions pour le transporteur FetA. Les meilleurs résultats ont globalement été obtenus avec les cribles *MbClass suite* et *MbClassII suite*. Les cristaux obtenus étant de petite taille (50 μm^3), il était nécessaire de passer à une optimisation manuelle afin d'obtenir des cristaux de taille plus importante, isolés dans la goutte et en grande quantité pour les expériences de diffraction des rayons X. J'ai donc travaillé sur différentes conditions de cristallisation en faisant varier la concentration et la nature du sel ou de l'agent précipitant, ainsi que la concentration en protéine et la taille des gouttes. Ce travail a été effectué en gouttes assises sur plaques 24 puits, en utilisant la technique de diffusion de vapeur.

2.3 Résultats

Le protocole mis en place m'a permis d'obtenir des rendements de purification allant de 0,2 à 3,6 mg de protéines par litre de culture selon la protéine, rendements très intéressants pour des protéines membranaires. Ce protocole étant reproductible, la pureté et la stabilité des échantillons m'a permis d'obtenir des quantités suffisantes pour passer aux expériences de cristallogénèse (**Figure 58A**).

Pour le récepteur FauA, j'ai rapidement obtenu des cristaux de la forme vide du transporteur (**Figure 58B**). Après optimisation des conditions de cristallisation (**Figure 58C**), un premier jeu de données a été collecté à 3 Å par le Dr David COBESSI sur la ligne BM-30A à l'ESRF de Grenoble, puis un jeu à 2,3 Å a été enregistré sur la ligne PROXIMA-1 au synchrotron SOLEIL, à Gif-sur-Yvette.

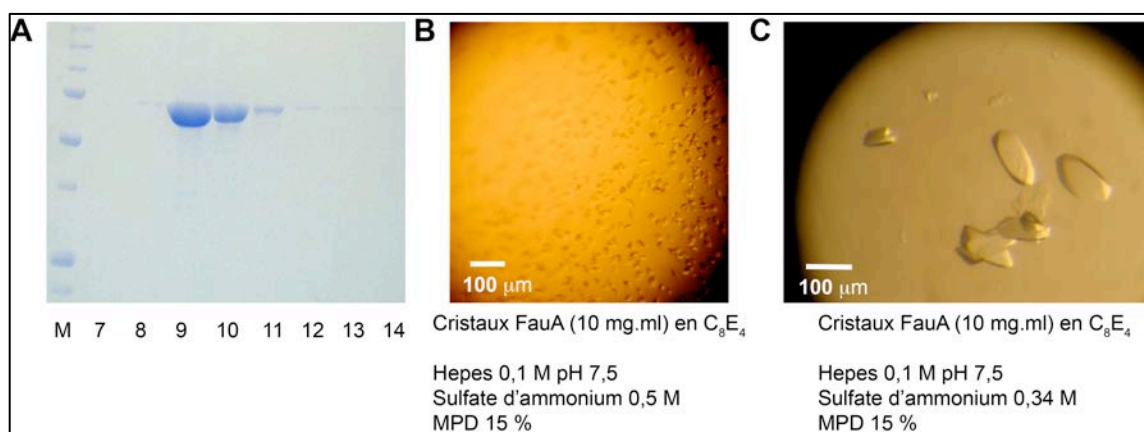


Figure 58 : Purification et cristallisation du transporteur FauA

(A) Analyse des fractions d'élution de la protéine ShuA sur gel SDS-PAGE 12% après séparation sur une colonne de gel filtration Superdex 200 10/300 GL (fractions d'élution 7 à 14). (B) Cristaux de FauA en C_8E_4 obtenus après criblage d'une matrice clairsemée et (C) après une optimisation manuelle pour les expériences de diffraction des rayons X.

FauA est un transporteur de 77,6 kDa de la famille des TBDT. Sa structure a été résolue, par le Dr David COBESSI, par remplacement moléculaire en utilisant les coordonnées atomiques de FpvA (PDB 2O5P) (Brillet *et al.*, 2007). L'analyse de la structure montre que FauA adopte le repliement classique de cette famille de protéines : un tonneau à 22 brins β antiparallèles obstrué par un domaine N-terminal globulaire. De nombreuses boucles extracellulaires ainsi que les résidus de la boîte TonB ne sont pas observés au niveau de la densité électronique, probablement en raison d'une forte flexibilité de ces domaines. Cette flexibilité est très probablement

accrue du fait de l'absence de l'alcaligine au niveau du site de liaison. Afin de remédier à ce problème, nous avons envisagé d'obtenir la structure des complexes FauA-Alcaligine et FauA-Alcaligine-fer, malheureusement, nous n'avons pas trouvé de distributeur capable de nous fournir ce sidérophore.

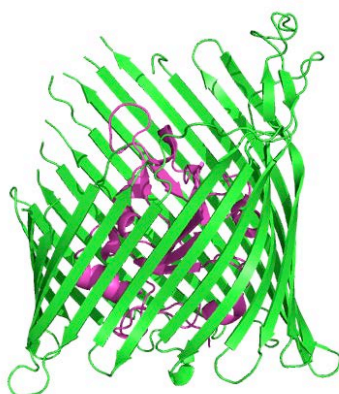
2.4 Conclusion

Lors de ce travail, j'ai mis en place un protocole optimisé pour le clonage, la production et la purification d'une famille de protéines membranaires. Cette méthode reproductible a permis d'obtenir des quantités de protéines purifiées compatibles avec les impératifs des projets d'études structurales et a permis de résoudre la structure du transporteur FauA. La présence de l'étiquette histidine au sein des boucles autorise un adressage correct de la protéine au niveau de la membrane externe. Un choix judicieux des détergents et la mise en place d'un criblage rationnel des conditions de cristallisation ont permis d'obtenir des cristaux diffractant les rayons X à haute résolution pour les quatre transporteurs étudiés (FauA, ShuA, SuxA et FetA). Dans les articles qui suivent nous verrons que la présence de l'étiquette dans les boucles n'empêche pas la fixation du ligand. Ces résultats ont été publiés en 2009, dans le journal ***Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*** (Publication n°7, (Brillet *et al.*, 2009a)) et la structure du transporteur FauA a été déposée dans la PDB sous le code 3EFM.

Aujourd'hui la résolution de la structure de protéines membranaires reste un défi pour les biochimistes structuralistes. Une approche rationalisée nous a permis de résoudre la structure de plusieurs TBDT. De manière générale, il est encore nécessaire de travailler sur les méthodes de production, de purification et de cristallisation des protéines membranaires. En 2012, le prix Nobel de chimie décerné à Brian KOBILKA est venu récompenser 20 années de recherche sur ses projets d'études structurales de RCPGs. Le développement des méthodes de production (fusion avec des fragments d'anticorps ou de lysozyme) et de cristallisation en phase lipidique cubique ont permis de lever les verrous qui entravaient la résolution de la structure de cette famille de protéines.

2.5 Publication : Brillet *et al.*, 2009a, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*

Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimmann, C., Cobessi, D. Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009, Vol 65, n°4, p. 326-331.



ISSN 0907-4449

Volume 65

Part 4

April 2009

Acta Crystallographica Section D

Biological

Crystallography

Editors: E. N. Baker and Z. Dauter

Rat profilin 2a

M. tuberculosis
pantothenate kinase

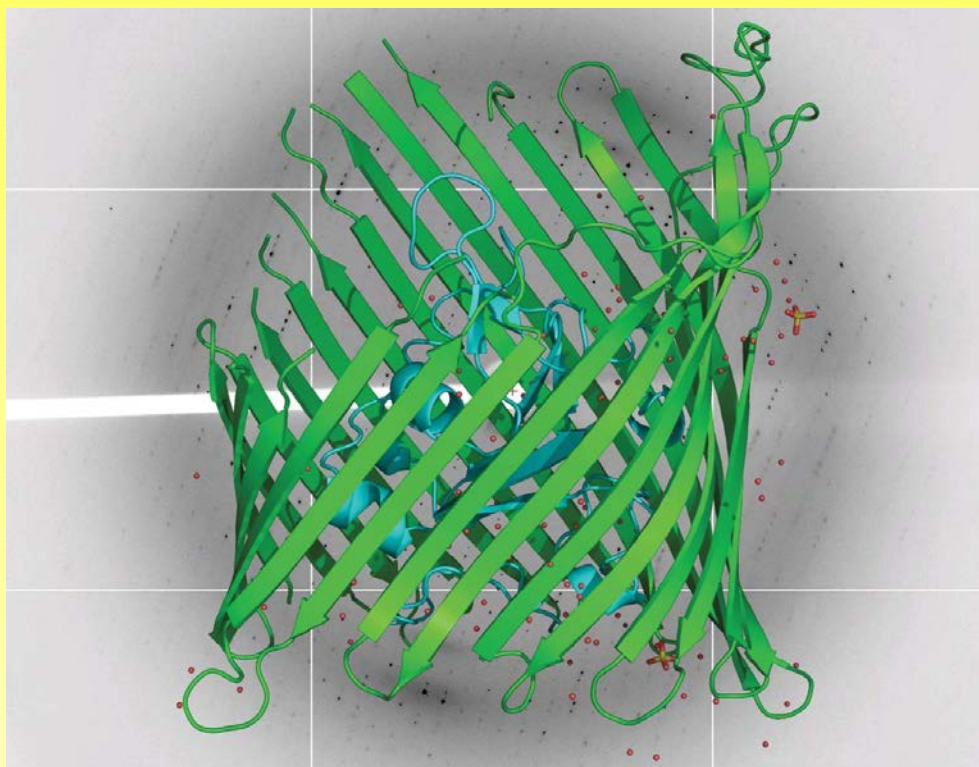
Human trimethylguanosine
synthase TGS1

SIV gp120 using normal-
mode-based refinement

Application of MR to
powder data from
image plates

Rat odorant binding protein
OBP1

T. maritima GntR regulator
TM0439



TonB-dependent alcaligin outer-membrane transporter FauA from
B. pertussis, p. 326



journals.iucr.org

International Union of Crystallography
Wiley-Blackwell

Karl Brillet,^a Ahmed Meksem,^{a,b}
Emmanuelle Lauber,^c Cornelia
Reimann^d and David
Cobessi^{a,b*}

^aInstitut Gilbert-Laustrat, UMR7175 CNRS/
Université Louis Pasteur, Strasbourg I,
Département Récepteurs et Protéines
Membranaires, Ecole Supérieure de
Biotechnologie de Strasbourg, BP 10413,
F-67412 Illkirch, France, ^bInstitut de Biologie
Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA–CNRS–
Université Joseph Fourier, 38027 Grenoble,
France, ^cLaboratoire des Interactions Plantes
Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS–INRA
2594/441, F-31320 Castanet-Tolosan, France,
and ^dDépartement de Microbiologie
Fondamentale, Université de Lausanne,
Bâtiment Biophore, Quartier UNIL-Sorge,
CH-1015 Lausanne, Switzerland

Correspondence e-mail: david.cobessi@ibs.fr

Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis is the bacterial agent of whooping cough in humans. Under iron-limiting conditions, it produces the siderophore alcaligin. Released to the extracellular environment, alcaligin chelates iron, which is then taken up as a ferric alcaligin complex *via* the FauA outer membrane transporter. FauA belongs to a family of TonB-dependent outer membrane transporters that function using energy derived from the proton motive force. Using an in-house protocol for membrane-protein expression, purification and crystallization, FauA was crystallized in its apo form together with three other TonB-dependent transporters from different organisms. Here, the protocol used to study FauA is described and its three-dimensional structure determined at 2.3 Å resolution is discussed.

Received 14 October 2008

Accepted 16 January 2009

PDB Reference: FauA, 3efm,
r3efmsf.

1. Introduction

The first crystal structure of a membrane protein, the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis*, was solved at 3 Å resolution more than 20 years ago (Deisenhofer *et al.*, 1985). Since then, no more than 400 crystal structures of membrane proteins have been determined (see http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html), while the Protein Data Bank contains more than 50 000 structures of macromolecules (soluble proteins, DNA, RNA, large macromolecular complexes *etc.*). This large difference mainly results from difficulties in obtaining large quantities of pure membrane proteins suitable for crystallization (Loll, 2003). Moreover, crystals of membrane proteins often diffract X-rays poorly.

Gram-negative bacteria are surrounded by two lipid bilayers that reinforce cell impermeability. While small molecules such as ions or sucrose can cross the outer membrane (OM) by passive diffusion through porins, the transport of molecules larger than 600 Da or molecules that are present at low concentrations such as iron, haem, maltose, sucrose, vitamin B₁₂ or nickel (Schauer *et al.*, 2008) takes place *via* TonB-dependent transporters (TBDTs) using energy derived from the proton motive force of the inner membrane. This is achieved through an interaction between the TonB periplasmic part of the inner membrane energy-transducing complex TonB–ExbB–ExbD and the so-called TonB box of the TBDT, a conserved sequence located at its N-terminus (Wiener, 2005). The molecular mechanisms of transport and the signal transduction necessary for energy transfer are still unknown. A genome survey revealed that more than 70% of all Gram-negative bacteria have genes for TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007) and many species can express several TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007). In order to better understand the molecular mechanisms of these transporters, we undertook

crystallographic studies of FpvA and FptA, which are required for siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa* (Cobessi, Celia, Folschweiller *et al.*, 2004, 2005; Cobessi, Celia & Pattus, 2004, 2005). Their structure consists of a C-terminal domain that folds into a 22-stranded transmembrane β -barrel which is filled by a so-called plug domain. The structures of the *P. aeruginosa* TBBDs thus resemble those of all other crystallized TBBDs involved in siderophore uptake (Ferguson, Hofmann *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999, 2007) and vitamin B₁₂ uptake (Chimento *et al.*, 2003).

As part of our efforts towards understanding the crystallization of membrane proteins and membrane transport across the outer membrane of Gram-negative bacteria, we developed a strategy from cloning to crystallization in order to facilitate the production, purification and crystallization of TBBDs. This easy handling protocol developed for TBBDs could probably be applied to other membrane proteins from Gram-negative and Gram-positive bacteria. Our strategy overcomes the bottlenecks of structural studies on membrane proteins, allowing us to collect X-ray data for all the selected targets: the alcaligin TBBD from *Bordetella pertussis*, the sucrose TBBD from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the enantio-pyochelin TBBD from *P. fluorescens* and the haem TBBD from *Shigella dysenteriae*. These four TBBDs share between 14.4% (SuxA/ShuA) and 24.9% (FauA/FetA) sequence identity. Here, we mainly detail the protocol used to study the alcaligin outer membrane transporter FauA from *B. pertussis*, for which we solved the three-dimensional structure at 2.3 Å resolution. *B. pertussis* is a Gram-negative human pathogen that inhabits the respiratory mucosa and produces the macrocyclic dihydroxamate siderophore alcaligin to acquire iron (Brickman & Armstrong, 1999). After binding to iron(III), the ferric alcaligin is translocated across the outer membrane by FauA.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

DNA manipulations were carried out in *Escherichia coli* Top10 [*F*[−] *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*] and FauA was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) [*F*[−] *ompT* *hsdS_B*(*r_B[−]m_B[−]*) *gal* *dcm* (DE3)].

2.2. Expression vector

The DNA encoding FauA from *B. pertussis* (without the 35-residue signal sequence) was amplified by PCR. The forward primer of the first fragment F1 (5′-GTCAGATATCCAGG-AAGCGCGAACG-3′) contained the complementary part for an *EcoRV* site (underlined) and codons for residues 36–40 of the mature FauA protein (bold). The reverse primer (5′-GCTAGGATCCGGCGCGCGCCAGTC-3′) for F1 contained a *Bam*HI site (underlined) and anticodons for residues 423–427 of mature FauA (bold). The forward primer of the second fragment F2 (5′-GATCGGATCCCATCACCATCATCACC-

ATCACATCCAAGAGCCCAGC-3′) contained a *Bam*HI site (underlined) that introduces two residues GS, a DNA sequence encoding a His₆ tag (italicized) and codons for residues 428–433 of the mature FauA protein. The reverse primer F2 (5′-GTCAAAGCTTTCAATACTGCGCCCCGCA-A-3′) contained a *Hind*III site (underlined), a stop anticodon (italicized) and anticodons for residues 730–734 of the mature FauA. The PCR products were cloned in pET20b (Novagen). *E. coli* Top10 cells were transformed with the resulting expression plasmids pET20b-FauAF1 and pET20b-FauAF2. All cloning steps were verified by DNA sequencing at the IGBMC facility, Illkirch, France.

The FauAF2 fragment was removed from plasmid pET20b-FauAF2 and introduced into pET20b-FauAF1 using *Bam*HI and *Hind*III restriction sites. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the resulting construct. Thus, this construct encodes a protein in which the native *B. pertussis* signal peptide is replaced by the native N-terminal *pelB* signal sequence of *E. coli* to target FauA into the outer membrane. The His₆ tag in loop L5 allowed rapid purification of the FauAH6L5 protein.

2.3. Expression and purification

E. coli BL21 (DE3) expressing FauAH6L5 was isolated on Luria Bertani–ampicillin (LB–ampicillin; 100 µg ml^{−1} ampicillin) plates and a 35 ml LB–ampicillin preculture was grown overnight at 310 K and 220 rev min^{−1}. The subculture was then used to inoculate a 1 l LB–ampicillin culture, which was incubated for another 2 h until the optical density (OD₆₀₀) reached 0.6. Expression of the recombinant protein was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 310 K. After 3 h, the cells were harvested by centrifugation for 20 min at 10 000g.

The bacterial pellets were resuspended in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and disrupted by two sonication steps. The membrane pellet was deposited on a four-step sucrose gradient and centrifuged overnight at 188 000g (Beckman SW41 rotor) to observe the location of the TBBDs in the membranes. The different parts of the gradient were deposited on an SDS gel to separate the proteins before Western blotting. FauAH6L5 was purified after incubation of the membranes with 1% (w/v) sodium *N*-lauroylsarcosine, which led to solubilization of the cytoplasmic membranes. Intact outer membranes containing FauAH6L5 were pelleted by centrifugation at 125 000g for 40 min in a Beckman Ti45 rotor. To extract FauAH6L5, the pellet of outer membranes was solubilized at room temperature with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 7% (v/v) octylpolyoxyethylene (octyl-POE; Bachem) and subsequently centrifuged at 117 000g for 20 min in a Beckman Ti70 rotor. The supernatant was applied onto a HisTrap column (Amersham) equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole and 1% octyl-POE. The protein was eluted with a linear gradient of 20–500 mM imidazole in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 1% octyl-POE. The fractions containing FauAH6L5, as determined by SDS–PAGE, were pooled, concentrated and dialyzed against 50 mM Tris–HCl

pH 8.0 and 1% octyl-POE by ultrafiltration and loaded onto a HiTrapQ column (Amersham) equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE. FauAH6L5 was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE.

2.4. Crystallization experiments

The pure fractions containing FauAH6L5 were pooled and dialyzed against 10 mM Tris–HCl pH 8.0 and either 0.75% C₈E₄, 0.75% C₈E₅ (Bachem) or 1.4% β -octylglucoside (Anatrace). The initial crystallization experiments were performed using a Cartesian Honeybee system at SBGP (Illkirch, France) by mixing 100 nl protein solution at a protein concentration of 10 mg ml^{−1} with 100 nl crystallization solution. The MbClass Suite, MbClass II Suite, Classics Suite and Classics Lite Suite from Qiagen were tested with the three detergents. Optimizations of the crystallization conditions were performed in Linbro plates using the sitting-drop vapour-diffusion method at 293 K.

2.5. Data collection

Diffraction data were initially collected using synchrotron radiation on BM30A at the ESRF (Roth *et al.*, 2002) at 3 Å resolution using an ADSC Q315r CCD detector ($\lambda = 0.9797$ Å). The resolution was extended to 2.3 Å on PROXIMA-1 at SOLEIL using a MAR flat panel ($\lambda = 0.9789$ Å). In both cases the data were collected using one crystal at 100 K and were integrated and scaled using *XDS* (Kabsch, 1993).

2.6. Structure resolution

The phase problem was solved by molecular replacement using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997) from the CCP4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) with FpvA (Brillet *et al.*, 2007) as a molecular model after replacing the nonconserved residues by alanine residues and after removing non-aligned parts of the sequences. The first model was refined using the data collected on BM30A at 3 Å resolution and the model was then rebuilt at 2.3 Å resolution using *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004) and refined by energy minimization and molecular dynamics using *CNS_SOLVE* 1.2 (Brünger *et al.*, 1998) and by restrained maximum-likelihood

least-squares techniques in *REFMAC* 5.2 (Murshudov *et al.*, 1997) from the CCP4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). At the end of the refinement, water molecules and sulfate ions were added and a simulated-annealed composite $3F_o - 2F_c$ electron-density map was calculated using *CNS_SOLVE* to check the model. The model was also checked using *PROCHECK* and *WHATCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993; Hooft *et al.*, 1996).

3. Results and discussion

3.1. Construction and analysis of the expression plasmid

To overexpress FauA in *E. coli*, we used pET20b, which codes for the *E. coli* signal peptide PelB required for targeting heterologous proteins to the outer membrane. As we were working on several TBDTs, we first inserted the His₆ tag into the N-terminal part of one particular TBDT. However, Western blot analysis of inner and outer membrane fractions obtained by ultracentrifugation on a sucrose gradient revealed that the overexpressed TBDT had accumulated in the inner membrane (data not shown). This accumulation probably resulted from nonrecognition of the signal peptide by the inner membrane secretion system owing to the presence of the His₆ tag inserted immediately downstream. We thus decided to insert the His₆ tag into one of the extracellular loops, *i.e.* loop L5, following the cloning protocol described for the FauA receptor in §2. FhuA was also cloned with a His tag inserted in an extracellular loop (Ferguson, Breed *et al.*, 1998). After 3 h of overexpression at 310 K, most of the protein was found in the *E. coli* outer membrane (Fig. 1). The other TBDT expression plasmids, which will be described elsewhere, were therefore constructed in a similar way, *e.g.* by inserting the His₆ tag into one of the extracellular loops.

3.2. Obtaining large quantities of membrane proteins

In order to limit the number of purification steps, we purified the TBDTs by a two-step procedure only, *i.e.* affinity and anion-exchange chromatography; an additional gel-filtration step did not improve the crystallization conditions. Using this two-step approach, we obtained pure TBDTs with a yield of 0.2–3.6 mg per litre of bacterial culture. Although the yield of FauA was only 0.2 mg per litre of culture, this amount was sufficient to test hundreds of crystallization conditions by mixing small volumes of the protein with identical volumes of crystallization solutions.

3.3. Crystallization and data collection

A survey of crystallization conditions for membrane proteins (<http://site.voila.fr/d.cobessi/MPR.html>) showed that most of the membrane proteins that fold in β -barrels crystallize using C₈E₄, C₈E₅ or β -octylglucoside as detergents, whereas most of the membrane proteins with a transmembrane domain that folds in α -helices crystallize using sugar-based detergents. Therefore, by predicting the fold of the transmembrane domain, we can probably select the most suitable detergent for crystallization. We used three different

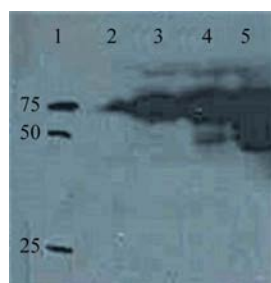


Figure 1

Induced expression of one selected TBDT in *E. coli*. Membrane fractions from induced cells were prepared as described in §2 and identified by Western blot analysis using a monoclonal antipolyhistidine antibody (Sigma): lane 1, ladder (kDa); lane 2, supernatant; lane 3, inner membrane; lane 4, intermediate fraction; lane 5, outer membrane.

Table 1

Number of crystallization conditions of FauA obtained using three detergents and four sparse matrices.

	Classes Suite	Classes Lite Suite	MbClass Suite	MbClass II Suite
0.75% C ₈ E ₄	1	5	6	8
0.75% C ₈ E ₅	1	5	5	5
1.4% β -OG	0	0	0	0

detergents with different critical micelle concentrations. By combining two to four sparse matrices with three detergents, we tested 576–1152 crystallization conditions using only 30–60 μ l purified protein at a concentration of 10 mg ml⁻¹. The best results for FauA were obtained using the MbClass Suite and MbClass II Suite sparse matrices (Table 1) and 0.75% C₈E₄ or C₈E₅. No crystals were obtained with β -octylglucoside, whereas more than ten successful crystallization conditions were obtained using the MbClass Suite or MbClass II Suite sparse matrices with C₈E₄ or C₈E₅. After optimizing the crystallization conditions for FauA, we obtained crystals that were suitable for X-ray studies using 10 mg ml⁻¹ FauA in 0.75% C₈E₄ mixed with an equal volume of 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.3–0.5 M ammonium sulfate and 13–17% MPD. The crystals grew slowly, reaching their maximal size in one week. The FauA crystals were frozen in a solution containing a higher MPD concentration or in the same solution with 20% glycerol. Data were first collected on BM30A at the ESRF and subsequently on PROXIMA-I at SOLEIL at 2.3 Å resolution. The high brightness of this beamline allowed us to collect data to a higher resolution than on BM30A using small crystals of membrane protein, typically 0.1 $\times$ 0.05 $\times$ 0.05 mm in size (Fig. 2 and Table 2). Systematic absences (2*n* + 1) were observed for the 00*l* reflections, resulting from the presence of a 2₁ axis. The crystals belonged to space group C222₁, with unit-cell parameters *a* = 165.89, *b* = 188.85, *c* = 62.44 Å.

3.4. The FauA structure and structure quality

FauA is a 77.6 kDa TBDT (699 residues in the mature protein) and 572 residues were rebuilt in the 3*F*₀ – 2*F*_c electron-density map. Several extracellular loops (loops L2, L3, L4, L5, L10 and L11) as well as residues of the TonB box and the N-terminal part were not observed in the electron-density map (see below). Similar to the structure of other TBDTs (Krewulak & Vogel, 2008), FauA can be divided into two domains: a 22-stranded antiparallel transmembrane β -barrel (Phe161–Tyr652) which is filled by an N-terminal plug domain (Glu21–Glu160) (Fig. 3). The r.m.s. deviations calculated using *MSDFold* (Krissinel & Henrick, 2004) range from 1.40 Å (FauA/FptA) to 2.47 Å (FauA/FepA). The main differences are in the length and orientation of the extracellular loops and in the N-terminal part of the plug domain containing the TonB box. 136 water molecules and two sulfate ions from the crystallization conditions were unambiguously identified in the electron-density map. A strong positive peak of electron density was observed close to His288 and Asp290 just up to the girdle of aromatic residues delineating the outer

Table 2

X-ray data statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

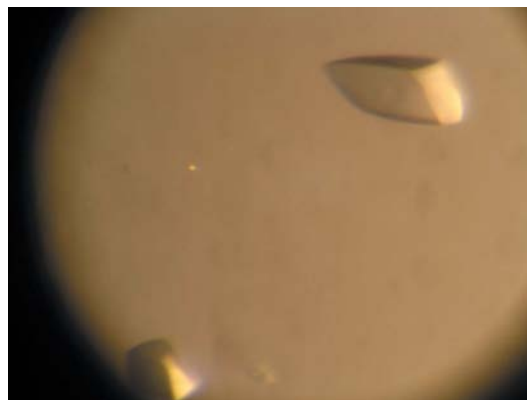
	BM30A	PROXIMA-1
Wavelength (Å)	0.9797	0.9789
Resolution (Å)	43.9–3.00 (3.05–3.00)	29.42–2.33 (2.40–2.33)
Space group	C222 ₁	C222 ₁
Unit-cell parameters (Å)	<i>a</i> = 163.195, <i>b</i> = 190.051, <i>c</i> = 62.254	<i>a</i> = 165.893, <i>b</i> = 188.847, <i>c</i> = 62.437
Total reflections	103798 (2995)	308340 (25960)
Unique reflections	19495 (871)	42320 (3521)
Completeness (%)	98.0 (93.5)	99.8 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.71 (2.11)	19.88 (2.92)
<i>R</i> _{merge} [†] (%)	12.0 (62.5)	6.6 (72.4)

[†] $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of the measured reflection and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of this reflection.

leaflet of the outer membrane. Its position suggests that it could be a phosphate group from a lipid. One molecule is present in the asymmetric unit and symmetry-related FauA molecules interact *via* their hydrophilic parts. The crystals are type II membrane-protein crystals (Michel, 1983) and contain 60.5% solvent. A high solvent content is one of the characteristics of type II membrane-protein crystals. At the end of the refinement, the *R* and *R*_{free} values (Brünger, 1992) were 21.9% and 25.8%, respectively. The *B*-factor average was 45.4 Å² for the main chain and 45.9 Å² for the overall structure (Table 3).

3.5. Flexibility in FauA and other TBDTs

Only five extracellular loops were observed in the 3*F*₀ – 2*F*_c electron-density map. The β -strands of the barrel are connected by long extracellular loops in TBDTs. The length of these loops and their amino-acid content could probably result in flexibility of the loops, as observed in CirA (Buchanan *et al.*, 2007), FepA (Buchanan *et al.*, 1999) and apo BtuB (Chimento *et al.*, 2003). Moreover, the absence of ferric alcaligin or apo alcaligin bound in the binding pocket at the extracellular face of FauA could increase the flexibility of the binding site and extracellular loops, whereas in apo FhuA, FecA or FpvA the loops are observed in the electron density (Locher *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 2003; Cobessi, Celia, Folschweiller *et al.*, 2005). In

**Figure 2**

FauA crystals. Their size is 0.1 $\times$ 0.05 $\times$ 0.05 mm.

apo FauA, no electron density corresponding to the TonB box is observed. In the crystal structures of apo TBDTs (BtuB, FecA, FpvA, FhuA and CirA) or those bound to their cognate empty siderophore (FecA and FpvA), residues of the TonB box are observed in the electron density. In all the TBDT structures, iron–siderophore binding leads to a conformational change in the N-terminus and flexibility of the TonB box. This flexibility is probably important for interactions with the inner membrane protein TonB. Indeed, the number of TBDTs in the outer membrane is higher than the number of TonB proteins in the inner membrane. The flexibility of the TonB box could thus increase the probability of interactions between the two proteins. The flexibility of the TonB box is an inherent characteristic of TBDTs, including FauA, and does not depend on the ligand-binding status of the transporter. If interactions were to occur between TonB and empty TBDTs, they could lead to energy loss since no membrane transport would occur. Therefore, combined with the increase in flexibility of the

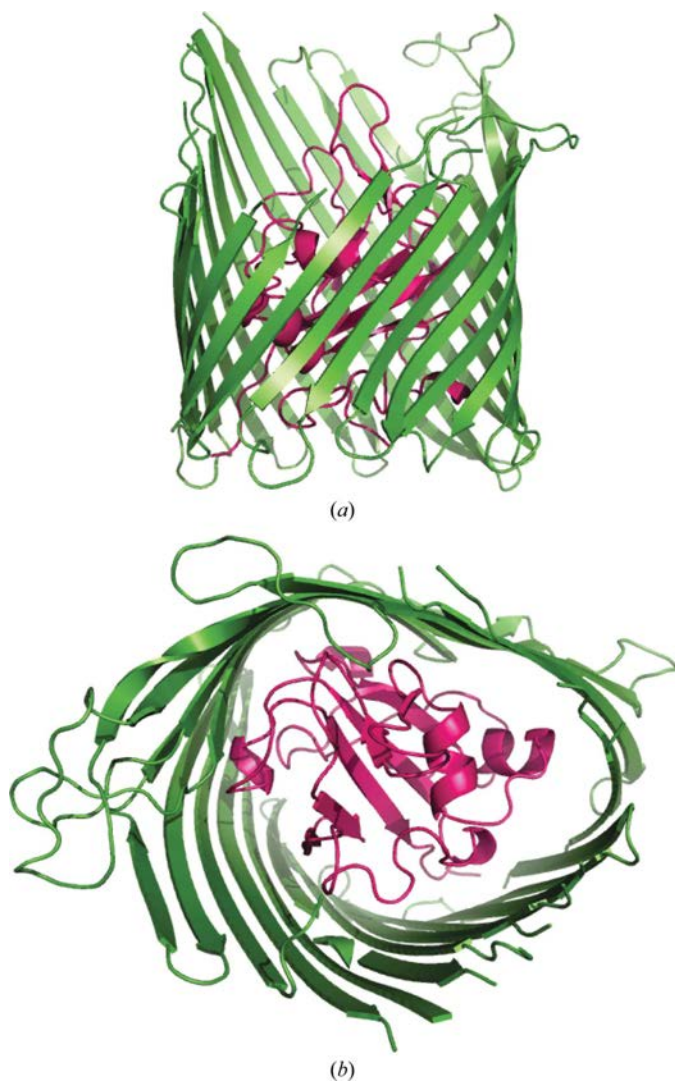
Table 3

Refinement and model statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Resolution range (Å)	29.35–2.33 (2.39–2.33)
No. of reflections used for R_{cryst} calculation	40176 (2897)
No. of reflections used for R_{free} calculation	2141 (144)
Data cutoff $F/\sigma(F)$	0.0
$R_{\text{cryst}}^{\dagger}$ (%)	21.89 (26.90)
$R_{\text{free}}^{\dagger}$ (%)	25.84 (36.30)
No. of non-H protein atoms	4384
No. of sulfate ions	2
Mean B factor, protein main-chain atoms (Å ²)	45.28
Mean B factor, protein side-chain atoms (Å ²)	46.42
Ramachandran plot	
Residues in most favoured regions (%)	90.4
Residues in additionally allowed regions (%)	8.2
Residues in generously allowed regions (%)	0.4
Residues in disallowed regions (%)	1.0
R.m.s. deviations from ideal geometry	
Bond lengths (Å)	0.015
Bond angles (°)	1.565

$^{\dagger} R_{\text{cryst}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} (Brünger, 1992) is the same as R_{cryst} but calculated for $n\%$ of data omitted from the refinement; n was 5.1% for FauA.

**Figure 3**

Overall structure of FauA. The plug and the barrel are coloured pink and green, respectively. (a) FauA viewed as in the outer membrane, with the extracellular loops at the top and the region exposed to the periplasm at the bottom of the figure. (b) View along the β -barrel.

TonB box after ligand binding at the extracellular face, other parts of the TBDTs are probably important for the signal transduction necessary to obtain the energy required for transport. These could include the extracellular loops and the apex of the plug, which undergo conformational changes upon iron–siderophore binding as observed in FpvA, FhuA or FecA. Together, these conformational changes could favour the energy transfer for transport across the outer membrane. Energy transfer may result in partial or total dislocation of the plug to create sufficient space in the lumen of the β -barrel for the passage of large molecules such as the iron–alcaligin complex.

Our customized cloning-to-crystallization protocol for TonB-dependent outer membrane transporters was used to successfully crystallize FauA, the ferric alcaligin receptor of *B. pertussis*, and to solve its three-dimensional structure at high resolution. This approach could be applied to other membrane proteins since the insertion of the His₆ tag in an extracellular hydrophilic loop should not interfere with the secretion process required for protein insertion into the membrane lipid bilayer. A rational design of crystallization experiments using small amounts of membrane proteins purified by a simplified two-step procedure allowed us to find conditions under which crystals suitable for X-ray diffraction could be obtained. Following this expression, purification and crystallization protocol, we also obtained crystals and X-ray diffraction data for three other selected TBDTs (ShuA, SuxA and FetA). Phasing and optimization of the crystallization conditions to reach the highest resolution limits are in progress. Together, these studies will lead to a better understanding of transport and signal transduction across the outer membrane by TBDTs and improve the crystallization methodology of membrane proteins in general.

We thank Sandra Armstrong from the Department of Microbiology, University of Minnesota, Minnesota, USA for

providing *fauA* DNA and for her assistance with the manuscript. We thank the staffs of the PROXIMA-1 beamline at SOLEIL and BM30A at the ESRF for their kind assistance during data collection and the 'European Community-Research Infrastructure Action' under FP6 'Structuring the European Research Area Programme' contract RII3/CT/2004/5060008. This work was supported by the ACI Interface Physique, Chimie, Biologie and the Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques program of the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie and the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E. & Arlat, M. (2007). *PLoS ONE*, **2**, 1–21.
- Brickman, T. J. & Armstrong, S. K. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 5958–5966.
- Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F. & Cobessi, D. (2007). *Structure*, **15**, 1383–1391.
- Brünger, A. T. (1992). *Nature (London)*, **355**, 472–475.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst. D* **54**, 905–921.
- Buchanan, S. K., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, M. M., Barnard, T. J., Jakes, K. S., Kienker, P. K. & Esser, L. (2007). *EMBO J.* **26**, 2594–2604.
- Buchanan, S. K., Smith, B. S., Vankatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palniktar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999). *Nature Struct. Biol.* **6**, 56–63.
- Chimento, D. P., Mohanty, A. K., Kadner, R. J. & Wiener, M. C. (2003). *Nature Struct. Biol.* **10**, 394–401.
- Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Heymann, M., Schalk, I., Abdallah, M. & Pattus, F. (2004). *Acta Cryst. D* **60**, 1467–1469.
- Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A. & Pattus, F. (2005). *J. Mol. Biol.* **347**, 121–134.
- Cobessi, D., Célia, H. & Pattus, F. (2004). *Acta Cryst. D* **60**, 1919–1921.
- Cobessi, D., Célia, H. & Pattus, F. (2005). *J. Mol. Biol.* **352**, 893–904.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst. D* **50**, 760–763.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985). *Nature (London)*, **318**, 618–624.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst. D* **60**, 2126–2132.
- Ferguson, A. D., Breed, J., Diederichs, K., Welte, W. & Coulton, J. W. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1636–1638.
- Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (2002). *Science*, **295**, 1715–1719.
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (1998). *Science*, **282**, 2215–2220.
- Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. (1996). *Nature (London)*, **381**, 272.
- Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800.
- Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. (2008). *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1781–1804.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004). *Acta Cryst. D* **60**, 2256–2268.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291.
- Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P. & Moras, D. (1998). *Cell*, **95**, 771–778.
- Loll, P. J. (2003). *J. Struct. Biol.* **142**, 144–153.
- Michel, H. (1983). *Trends Biochem. Sci.* **8**, 56–59.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Cryst. D* **53**, 240–255.
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charraut, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P. & Ferrer, J.-L. (2002). *Acta Cryst. D* **58**, 805–814.
- Schauer, K., Rodionov, D. A. & de Reuse, H. (2008). *Trends Biochem. Sci.* **22**, 330–338.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
- Wiener, M. C. (2005). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 394–400.
- Yue, W. W., Grizot, S. & Buchanan, S. K. (2003). *J. Mol. Biol.* **332**, 353–368.

3 Etudes structurales du transporteur de l'hème ShuA, chez *Shigella dysenteriae*

3.1 Introduction

Les bactéries du genre *Shigella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont des bacilles pathogènes Gram-négatifs. Leur température optimale de croissance en milieu aérobie est de 37°C. Ce pathogène, que l'on rencontre uniquement chez l'homme, est responsable de la dysenterie bacillaire appelée également shigellose (Sansonetti, 2006). Cette bactérie colonise l'intestin et est responsable de diarrhée aigue sanguinolente. L'infection par *Shigella* est responsable de 5 à 15 % des cas de diarrhée et peut engendrer un décès chez des enfants en bas âge (Schroeder & Hilbi, 2008). Cette pathologie est présente dans le monde entier, cependant elle est particulièrement fréquente dans les régions où l'hygiène est précaire. Ainsi, ces bactéries peuvent se propager par des eaux souillées, particulièrement lorsque celles-ci sont utilisées pour le lavage des aliments. Parmi les *Shigella*, on retrouve plusieurs espèces : *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. dysenteriae*.

S. dysenteriae produit une exotoxine nommée Shiga, qui endommage la muqueuse intestinale et provoque des saignements. Ces saignements permettent alors à la bactérie d'acquérir le fer à partir de l'hème contenu dans l'hémoglobine. Grâce au système d'acquisition *shu*, *S. dysenteriae* peut se développer et maintenir l'infection chez l'hôte (Mills & Payne, 1995). Ce système est composé de plusieurs protéines :

- ShuA, TBDT qui lie l'hème ou l'hémoglobine de l'hôte (Mills & Payne, 1997),
- ShuT, protéine de liaison périplasmique (Wyckoff *et al.*, 1998),
- ShuUV, transporteur ABC capable de transporter l'hème du périplasme vers le cytoplasme (Wyckoff *et al.*, 1998),
- ShuS, hème oxygénase responsable de la dégradation de l'hème au niveau du cytoplasme de la bactérie (Wilks, 2001).

Le mécanisme de reconnaissance de l'hème par le récepteur ShuA était inconnu jusqu'ici. L'objectif était donc de résoudre la structure tridimensionnelle du transporteur ShuA.

3.2 Approches expérimentales

La protéine ShuA sous sa forme native a été purifiée en suivant la méthode citée dans l'article précédent (Brillet *et al.*, 2009a). Après expression chez *E. coli*, j'ai obtenu des rendements de purification de : 3 mg de protéine par litre de culture après 3h et 3,6 mg/L après une induction sur la nuit en présence d'IPTG à 1 mM. En parallèle, j'ai transformé une souche d'*E. coli* B834, auxotrophe pour la méthionine. Cultivée en milieu succinique complémenté en L-sélénométhionine, cette souche m'a permis de produire la protéine ShuA sélénée (14 résidus substitués). Les expériences de purification et de cristallisation de la forme sélénée du transporteur ont été confiées à un étudiant en thèse, Mr Ahmed MEKSEM, pour l'utilisation de la technique de phasage par méthode MAD (*Multi-wavelength Anomalous Diffraction*). Il a également mené des expériences de spectroscopie afin de tester la liaison d'une molécule d'hème sur la protéine ShuA purifiée.

Le criblage initial des conditions de cristallisation a été réalisé sur la plateforme du CEBGS – Illkirch, sur quatre matrices clairsemées avec trois détergents : C₈E₄, C₈E₅, OG (soit 1 152 conditions). Après avoir identifié différentes conditions de cristallisation, j'ai effectué de nombreux tests de co-cristallisation en présence d'atomes lourds comme l'iode (I₂), le plomb (Pb(NO₃)₂), l'euprécium (EuCl₃), le terbium (TbCl₃) ou le brome (KBr), pouvant faciliter la détermination de la phase cristallographique par la méthode SAD (*Single-wavelength Anomalous Diffraction*). Pour cela, j'ai préparé différentes solutions d'atomes lourds à 10 ou 20 équivalents dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 en présence de détergent. En parallèle, j'ai concentré l'échantillon protéique jusqu'à 20 mg.mL⁻¹. Au final, l'échantillon a été obtenu en mélangeant les deux préparations volume à volume. Avec ce protocole, j'ai co-cristallisé la protéine à une concentration finale de protéine à 10 mg.mL⁻¹ en présence de 5 à 10 équivalents d'atomes lourds, mais sans modifier la concentration du détergent. Les cristaux obtenus ont été congelés dans l'azote liquide après trempage dans une solution équivalente à la condition de cristallisation contenant 15% de glycérol (v/v). Le Dr David COBESSI a collecté plusieurs jeux de données à haute résolution sur les lignes BM30A et ID29 à l'ESRF et sur la ligne PROXIMA-1 au synchrotron SOLEIL.

Les premiers cristaux de la protéine ShuA native ont diffractés les rayons X à une résolution de 3,4 Å. Des données de diffraction ont été collectées sur des

cristaux de ShuA co-cristallisé avec du terbium et également avec de l'euporium. Dans un premier temps, le problème de la phase a été résolu par la méthode SAD en utilisant les données collectées, au seuil du plomb, à une résolution de 2,3 Å sur un cristal ShuA-Pb. Le modèle construit étant incomplet, un jeu de données a été collecté à une résolution de 3,2 Å à l'ESRF, sur la ligne ID-29, à partir d'un cristal de ShuA substitué avec des sélénométhionines. La méthode MAD a alors permis de déterminer la phase. Un nouveau modèle a été construit avec ce jeu puis il a été affiné avec les données collectées sur le cristal ShuA-Pb. La combinaison des jeux de données obtenus par différentes méthodes a permis de résoudre la structure du transporteur ShuA à une résolution de 2,6 Å.

3.3 Résultats

Le protocole allant du clonage à la purification mis au point pour les protéines de la famille des TBDT, m'a permis de purifier ShuA avec de bons rendements en seulement deux étapes (3,6 mg par litre de culture). L'analyse de l'échantillon en gel filtration montre que la protéine est sous sa forme monomérique (**Figure 59**) et monodisperse après analyse en DLS.

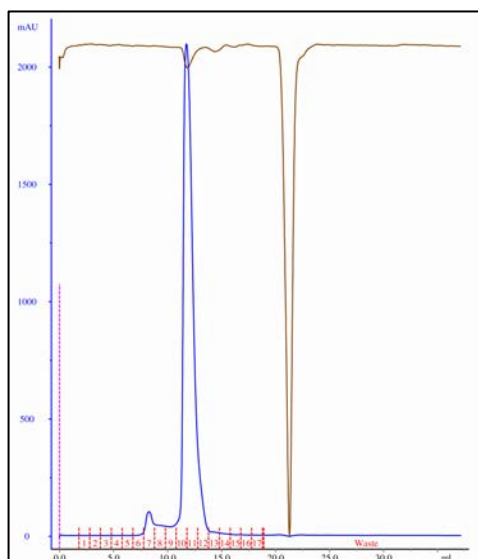


Figure 59 : Profil d'élution de la protéine ShuA sur une colonne de gel filtration

Profil d'élution de la protéine ShuA sur colonne de gel filtration de type Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, OPOE 1% (v/v).

Le complexe ShuA-hème observé par spectroscopie montre que la protéine purifiée en présence de détergent est toujours capable de lier son ligand (Figure 2, publication n°6). Malheureusement, les expériences de cristallisation du complexe

ShuA-hème n'ont pas permis d'obtenir de cristaux. En revanche, j'ai très rapidement obtenu des cristaux du transporteur ShuA sous sa forme vide diffractant les rayons X à 3,4 Å. De nombreuses conditions de cristallisation ont été identifiées et optimisées manuellement (**Figure 60**). Les expériences de co-cristallisation m'ont permis d'améliorer nettement la taille (jusqu'à 500 x 200 x 200 µm) et la qualité des cristaux (**Figure 60**). La présence d'atomes lourds a également amplifié le pouvoir de diffraction des cristaux (jusqu'à 2,3 Å), probablement en augmentant les contacts cristallins et en diminuant la mosaïcité.

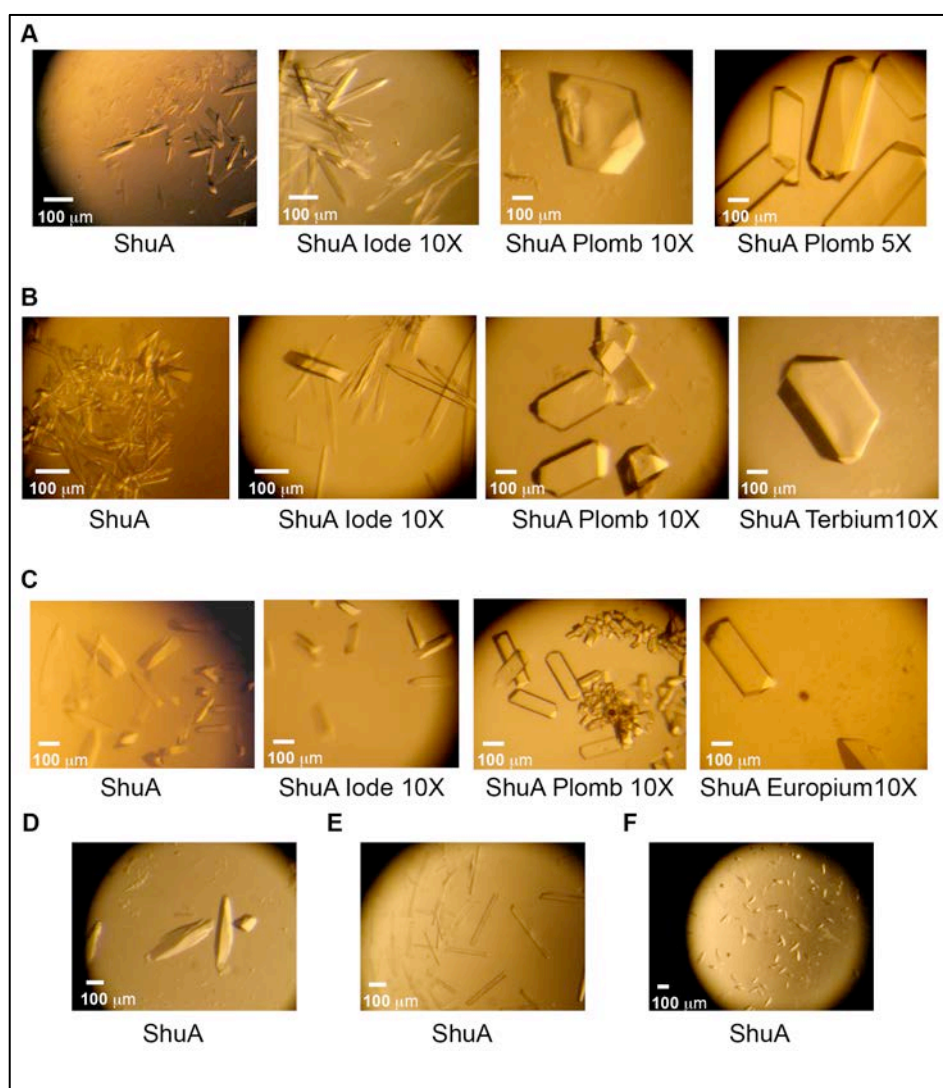


Figure 60 : Cristallisation du transporteur ShuA

Cristaux du transporteur ShuA cristallisé sous sa forme native, ou co-cristallisé avec des atomes lourds à 5 ou 10 équivalents (5X, 10X), obtenus par diffusion de vapeur en gouttes assises. Cristaux de la protéine ShuA 10 mg.mL⁻¹ préparé dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, OG 1,4% (m/v) en présence de (A) MES 0,1 M pH 6,5, PEG 1500 13-15% (m/v), NaCl 0,1 M ; (B) MES 0,1 M pH 6,5, PEG 1500 11-14%, NaCl 0,1 M ; (C) MES 0,1 M pH 6,5, PEG 3350 8-12%, NaCl 0,1 M ; (D) CH₃CO₂Na 0,1 M pH 4,6, PEG 2000 MME 11%, glycérol 6% (v/v) ; (E) CH₃CO₂Na 0,1 M pH 4,6, PEG 2000 11%, éthylène glycol 6% (v/v) ; (F) MES 0,1 M pH 6,5, PEG 400 30%, NaCl 0,1 M.

Grâce aux différents jeux de données, la structure de la forme vide du transporteur ShuA a été déterminée à une résolution de 2,6 Å. L'analyse de la structure montre que ShuA adopte le repliement classique des protéines de la famille des TBDT, on retrouve un tonneau à 22 brins β antiparallèles (résidus Ser-136 à Trp-632) obstrué par un domaine bouchon en position N-terminale (résidus Thr-1 à Gln-135). Les brins β sont connectés par onze longues boucles extracellulaires et dix coudes périplasmiques. La région conservée nommée « *lock region* » implique les résidus Arg-64, Arg-104 du domaine bouchon et les Glu-446 et Asp-503 des brins β 14 et β 16 du tonneau. La boîte TonB, MTVTATG (résidus 4 à 10), est bien définie dans la densité électronique (**Figure 61**) et est enfouie à l'intérieur du tonneau, suggérant qu'elle n'est pas en mesure d'interagir avec la protéine TonB en absence de ligand.

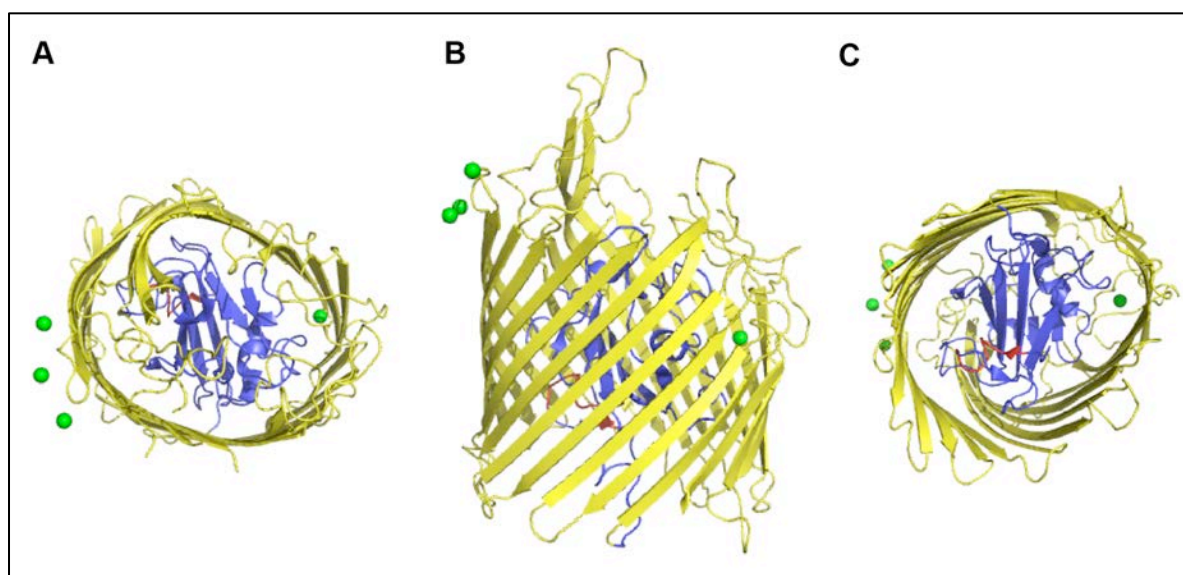


Figure 61 : Représentation de la structure du transporteur ShuA

Représentation de la structure de la protéine ShuA résolue à partir de cristaux ShuA-Pb. Ce transporteur se compose d'un tonneau β (jaune) obstrué par le domaine bouchon (bleu), vue de dessus (A) et vue de face (B). La boîte TonB observée dans la densité électronique est représentée en rouge, sur la vue de dessous (C). Les atomes de plomb utilisés lors de la co-cristallisation sont représentés en sphères de van der Waals (vert).

La liaison de l'hème à partir de l'hémoglobine au niveau de la face extracellulaire de ShuA implique les résidus conservés His-86 et His-420 (Burkhard & Wilks, 2007). La boucle extracellulaire L7 contient les motifs consensus caractéristiques des transporteurs d'hème : le motif FRAP et le motif NPNL. Sur cette même boucle, on trouve l'His-420 ainsi que trois résidus hydrophobes Phe-421,

Ile-423 et Phe-426 (Figure 2, publication n°5). L'His-420 est le premier résidu impliqué dans la liaison de la molécule d'hème, suivi de l'interaction avec l'His-86 présente sur une boucle apicale du bouchon. La boucle L7 est exposée au solvant et contient des résidus majoritairement hydrophobes. Elle est très probablement impliquée dans la reconnaissance de la molécule d'hème dont l'anneau porphyrique est particulièrement hydrophobe. L'alignement des structures des transporteurs ShuA et HasR (Krieg *et al.*, 2009) (figure5, publication n°5) montre que les boucles L2, L6 et L9 sont nettement plus longues pour HasR. Au niveau de ce transporteur, ces boucles sont impliquées dans la liaison de l'hémophore HasA ou du complexe HasA-hème. Les deux histidines, His-189 et His-603, impliquées dans la liaison de l'hème chez HasR ne se superposent pas avec les histidines His-86 et His-420 de ShuA. Cependant, la comparaison des structures de ShuA et HasR montre que la liaison de l'hème sur le transporteur ShuA implique l'His-86 du domaine bouchon et un changement de conformation des boucles extracellulaire L3 et L7.

Pour le transport de l'hème, un réarrangement structural est nécessaire et semble impliquer deux réseaux de liaisons hydrogène. Le premier réseau implique l'His86, la Gln-228 de la boucle L3, ainsi qu'une boucle du domaine bouchon contenant les résidus Arg-43, His-44, Val-45, Pro-46 et Gly-47 qui vient fermer la face périsplasmique du transporteur (**Figure 62A**). Le deuxième réseau de liaisons hydrogène implique l'His-86, la Gln-615 de la boucle L11 qui vient fermer une large cavité sur la face extracellulaire du tonneau. Ce réseau mobilise également les résidus Leu-50 et Asp-51 du domaine bouchon et la Gln-228 de la boucle L3 (**Figure 62B**). La présence d'une molécule d'hème pourrait engendrer un mouvement des boucles extracellulaires et venir déstabiliser les deux réseaux de liaisons hydrogène libérant ainsi la boîte TonB et autorisant la formation d'un canal pour la translocation de la molécule d'hème.

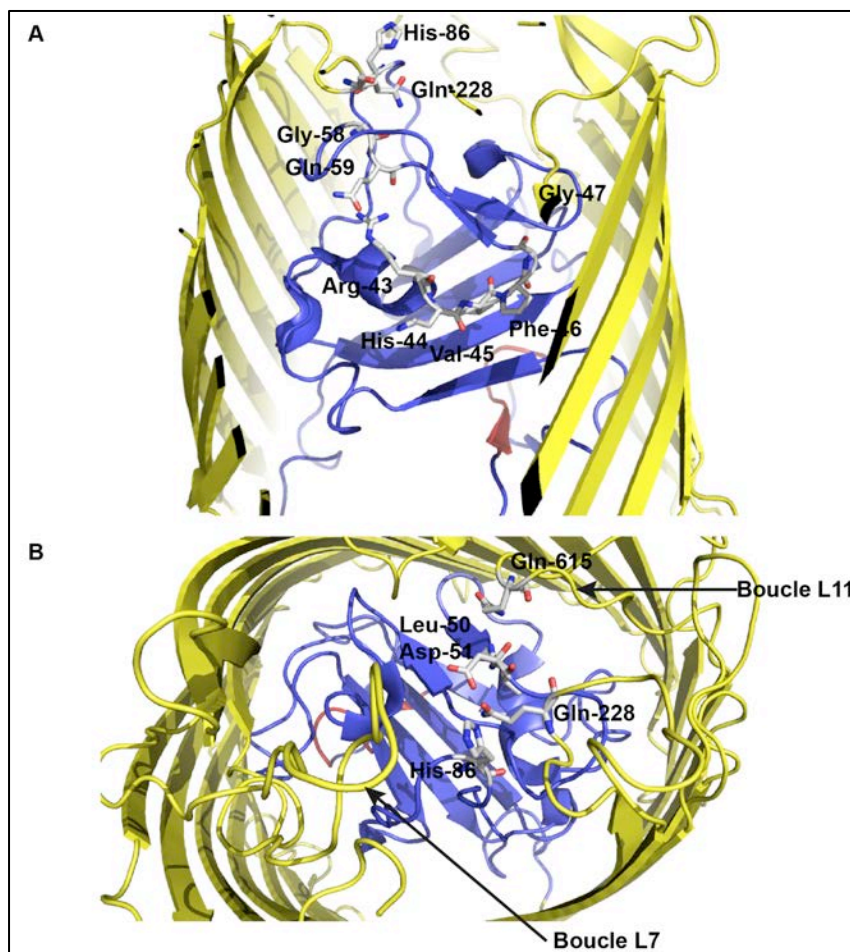


Figure 62 : Représentation des réseaux de liaisons hydrogène de ShuA

Représentation des réseaux de liaisons hydrogène au sein de la structure du transporteur ShuA. Le tonneau est représenté en jaune et le domaine bouchon en bleu. Le premier réseau (A) implique l'His-86, la Gln-228 de la boucle L3 et les résidus Arg-43, His-44, Val-45, Phe-46, Gly-47, Gly-58, Gln-59 du domaine bouchon qui viennent fermer la cavité périplasmique du tonneau. (B) Au niveau de la face extracellulaire, un deuxième réseau de liaisons hydrogène vient fermer la cavité principalement grâce à la Gln-615 de la boucle L11. Ce deuxième réseau de liaisons hydrogène implique également les résidus Gln-228 de la boucle L3, Leu-50 et Asp-51 du domaine bouchon.

3.4 Conclusion

La bactérie pathogène *S. dysenteriae* est capable d'utiliser l'hème et l'hémoglobine de l'hôte comme source de fer. Ce travail a permis de résoudre la structure du transporteur ShuA à une résolution de 2,6 Å. En comparant cette structure à celle du transporteur HasR, nous avons montré l'implication de deux histidines pour la reconnaissance de l'hème et un mécanisme de liaison induit entraînant un mouvement de la boucle L7 qui vient piéger la molécule d'hème.

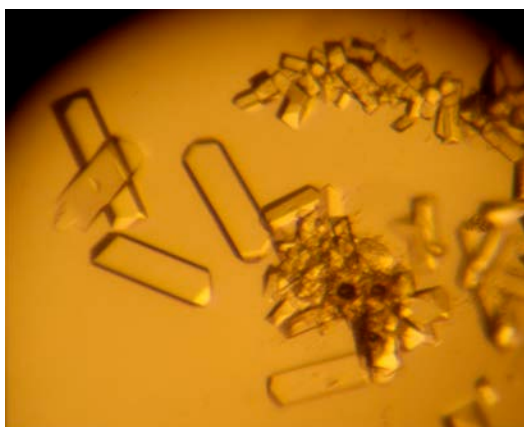
Chez les TBDT, le mécanisme moléculaire permettant la translocation du ligand au travers du transporteur est encore inconnu. Cette structure a permis de

mettre en évidence deux réseaux de liaisons hydrogène impliquant des résidus du tonneau et du domaine bouchon. Ces réseaux permettraient le passage de l'hème d'une part et la libération de la boîte TonB d'autre part. Suite à ces travaux, il serait intéressant de poursuivre ces études pour obtenir la structure du complexe ShuA-hème afin d'identifier les changements conformationnels de ce transporteur. Il est probable que l'énergisation par la machinerie TonB permette la formation d'un canal nécessaire au passage de l'hème vers le périplasme. L'hème est ensuite pris en charge par la protéine de liaison ShuT, qui peut alors délivrer l'hème au transporteur ABC ShuUV pour son passage vers le cytoplasme.

L'ensemble de ces données ont été publiées dans les journaux : ***Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Comm***, en 2009 (Publication n°6 (Brillet *et al.*, 2009b)) et ***Proteins***, en 2010 (Publication n°5 (Cobessi *et al.*, 2010)). La structure du transporteur ShuA de *S. dysenteriae* a été déposée dans la base de données PDB sous le code 3FHH.

3.5 Publication : Brillet *et al.*, 2009b, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Comm*

Brillet, K., Meksem, A., Thompson, A., Cobessi, D. Expression, purification and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Comm*, 2009, Vol 65, n° 4, p. 402-405.



**Karl Brillet,^a Ahmed Meksem,^b
Andrew Thompson^c and David
Cobessi^{b*}**^aInstitut de Recherche de l'Ecole de
Biotechnologie de Strasbourg, FRE 3211,
CNRS–Université de Strasbourg, Ecole
Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg,
BP 10413, F-67412 Illkirch, France, ^bInstitut de
Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel,
CEA–CNRS–Université Joseph Fourier,
38027 Grenoble, France, and ^cSynchrotron
SOLEIL, L'Orme de Merisiers, Saint Aubin
BP 48, 91192 Gif sur Yvette, France

Correspondence e-mail: david.cobessi@ibs.fr

Received 3 February 2009
Accepted 5 March 2009

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*

As part of efforts towards understanding the crystallization of membrane proteins and membrane transport across the outer membrane of Gram-negative bacteria, the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA of *Shigella dysenteriae* bound to heavy atoms was crystallized in several crystallization conditions using detergents. The insertion of a His₆ tag into an extracellular loop of ShuA, instead of downstream of the *Escherichia coli* peptide signal, allowed efficient targeting to the outer membrane and the rapid preparation of crystallizable protein. Crystals diffracting X-rays beyond 3.5 Å resolution were obtained by co-crystallizing ShuA with useful heavy atoms for phasing (Eu, Tb, Pb) by the MAD method at the synchrotron, and the SAD or SIRAS method at the Cu wavelength. The authors collected X-ray diffraction data at 2.3 Å resolution using one crystal of ShuA-Pb, and at 3.2 Å resolution at an energy remote from the Pb *M* absorption edges for phasing on PROXIMA-1 at SOLEIL.

1. Introduction

The capability to scavenge essential nutrients, including iron, is essential for the multiplication and virulence of pathogenic Gram-negative bacteria. Although iron is a major component of the Earth's crust, its bioavailability is very low (Neilands, 1995); under aerobic conditions or at physiological pH it precipitates to form insoluble ferric oxyhydroxide complexes. Its free concentration in biological fluids is very low (10^{-18} M) and is less than that required for bacterial growth (10^{-7} – 10^{-8} M; Stintzi *et al.*, 2000). In humans, iron is bound to proteins such as lactoferrin, ferritin or haemoglobin. In these environments, most pathogenic Gram-negative bacteria are able to use iron after the synthesis and release into the external medium of iron chelators called siderophores. These bind iron(III) with high affinity and are specifically transported across the outer membrane by TonB-dependent transporters (TBDTs; Krewulak & Vogel, 2008). Many bacterial species such as *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, pathogenic *Escherichia coli* (for example, strain O157:H7) and *Shigella dysenteriae* express haem TBDTs and are therefore able to use free haem or haem from haemoglobin as an iron source (Paulley *et al.*, 2007). Other organisms such as *Serratia marcescens* secrete proteins called haemophores which bind to haem and are recognized by their respective TBDT for haem transport (Cescau *et al.*, 2007).

Shigella dysenteriae is a human pathogenic bacterium belonging to the Enterobacteriaceae and is mainly responsible for dysentery. As with other human pathogenic bacteria, it is able to acquire the iron necessary for growth from haem by using its TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA, which binds to human haemoglobin to transfer haem across the outer membrane (Mills & Payne, 1997; Burkhard & Wilks, 2007). ShuA can either bind to haem or to haemoglobin for haem import. The energy required for the transport is derived from the proton motive force and is transferred to the TBDT by the energy-transducing complex TonB–ExbB–ExbD of the inner membrane. Energy is delivered after interactions between the TonB protein and a conserved N-terminal sequence called the TonB-box of the TBDT (Ferguson & Deisenhofer, 2002).

© 2009 International Union of Crystallography
All rights reserved

His₆-tagged ShuA was overexpressed in *E. coli* and purified using a two-step purification. Crystals were obtained in several crystallization conditions. The insertion of the His₆ tag in an extracellular loop (Ferguson *et al.*, 1998; Brillet *et al.*, 2009), instead of after the signal peptide, is a valuable strategy for overexpression and purification and does not prevent crystallization. Our spectroscopic studies showed that ShuA was able to bind haem in detergent micelles, even with the insertion of the His₆ tag in an extracellular loop. By cocrystallizing ShuA with positively charged heavy ions such as Pb²⁺, Eu³⁺ and Tb³⁺, which have a strong anomalous signal at the Cu wavelength for SAD phasing, the size and quality of the ShuA crystals were improved. Crystals of ShuA-Pb that diffracted X-rays to 2.3 Å resolution were obtained and a complete data set was collected at 2.6 Å resolution. X-ray data were also collected to 3.2 Å resolution at an energy remote from the Pb *M* absorption edges for phasing.

2. Material and methods

2.1. Cloning

The DNA encoding ShuA (without the 28-residue signal sequence) was amplified by PCR. The forward primer of the first fragment F1 (5'-GTCAGATATCACTGAAACCATG-3') contained an *EcoRV* site (underlined) and codons for residues 29–32 (bold). The reverse primer (5'-GCTAGGATCCTTGTTCCTGACGATAA-3') for F1 contained a *Bam*HI site (underlined) and anticodons for residues 348–352 (bold). The forward primer of the second fragment F2 (5'-GATCGGATCCCATCACCATCATCACCATCATCCGGGCGGC-3') contained a *Bam*HI site (underlined) that introduces two residues GS, a DNA sequence encoding a His₆ tag (italicized) and codons for residues 353–356. The reverse primer of F2 (5'-GATCAAGCTT-TTACCATGATAACTCAC-3') contained a *Hind*III site (underlined), a stop anticodon (italicized) and anticodons for residues 656–660. The PCR products were cloned in pET20b (Novagen). *E. coli* Top10 cells were transformed with vectors pET20b-ShuAF1 and pET20b-ShuAF2. The ShuAF2 fragment was removed from the plasmid and introduced into pET20b-ShuAF1 using the *Bam*HI and *Hind*III restriction sites. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the resulting construct, which encodes a protein in which the native *S. dysenteriae* signal peptide is replaced by the native N-terminal pelB signal sequence of *E. coli* in order to target the outer membrane. The His₆ tag in loop L5 allowed the rapid purification of ShuA.

2.2. Expression and purification

Expression was induced with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 310 K for 3 h. The yield of purified protein was increased by overnight induction. The cells were harvested by centrifugation for 20 min at 10 000g. ShuA was purified

after incubation of the membranes with 1% (w/v) sodium *N*-lauroyl-sarcosine, leading to solubilization of the cytoplasmic membranes. Intact outer membranes containing ShuA were pelleted by centrifugation at 125 000g for 40 min. The outer membranes were solubilized with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl and 7% (v/v) octyl-polyoxyethylene (octyl-POE; critical micelle concentration 0.23%; Bachem) and subsequently centrifuged at 117 000g for 20 min. The supernatant was applied onto a HisTrap column (Amersham) equilibrated with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole and 1% octyl-POE. The protein was eluted with a linear gradient of 20–500 mM imidazole in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl and 1% octyl-POE. The fractions containing ShuA were pooled, dialyzed with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE and loaded on a HiTrap Q column (Amersham) equilibrated with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE. ShuA was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE.

2.3. Haem-binding measurements

The ability of ShuA to bind haem was tested by difference spectroscopy absorbance using a Cary UV–visible spectrophotometer (Varian). Reactions were carried out in 450 µl reaction volumes containing 20 µM ShuA in 10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1.4% octyl β-D-glucopyranoside and 20 µM haemin dissolved in 1 mM NaOH. UV–visible absorbance spectra were collected between 300 and 700 nm at room temperature. The step size was 15 nm and the averaging time was 1 s per point.

2.4. Crystallization experiments

The pure fractions containing ShuA were pooled and dialyzed with 10 mM Tris–HCl pH 8.0 and 0.75% octyl-tetraethylene glycol ether (C₈E₄), 0.75% octyl-pentaethylene glycol ether (C₈E₅) or 1.4% octyl-β-D-glucopyranoside (β-OG). Initial crystallization experiments were performed using a Cartesian Honeybee system at SBGP (Illkirch, France) and the sitting-drop vapour-diffusion method by mixing 100 nl protein solution at a concentration of 10 mg ml^{−1} with 100 nl crystallization solution. The MbClass Suite, MbClassII Suite, The Classics Suite and The Classics Lite matrices from Qiagen were tested with the three detergents at 293 K. The reservoir volume was 80 µl. Improvements of the conditions were performed in Linbro plates using the sitting-drop vapour-diffusion method at 293 K by mixing 0.5 µl protein solution (10 mg ml^{−1}) with 0.5 µl crystallization solution. The reservoir volume was 500 µl.

2.5. Cocrystallization with heavy atoms

Solutions of heavy atoms [I₂, Pb(NO₃)₂, EuCl₃, TbCl₃ and KBr] at 2.8 mM were prepared in 10 mM Tris–HCl pH 8.0 with 1.4% octyl-β-D-glucopyranoside. Pure fractions of ShuA at 10 mg ml^{−1} were incubated with five or ten molar equivalents of heavy atom at room temperature for 1 h before crystallization.

2.6. Data collection and processing

Diffraction data for ShuA-Pb were collected to 2.3 Å resolution on PROXIMA-1 at SOLEIL using X-rays of wavelength 0.9788 Å and to 3.2 Å resolution (λ = 1.9997 Å) at a high remote energy compared with the *M* absorption edges of Pb using one crystal at 100 K. Diffraction data for ShuA cocrystallized with TbCl₃ and EuCl₃ were collected on BM30A (Roth *et al.*, 2002) at ESRF (λ = 0.9798 Å) and on PROXIMA-1 (λ = 1.7657 Å) at SOLEIL, respectively. All data were processed and scaled using *XDS* (Kabsch, 1993).

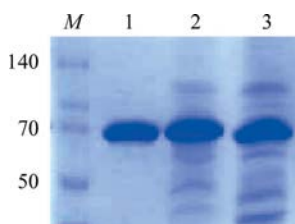


Figure 1
SDS–PAGE of ShuA. Lane *M*, molecular-weight markers (kDa); lane 1, purified ShuA after anion-exchange chromatography; lane 2, pool after affinity chromatography; lane 3, pool from solubilization of outer membranes.

3. Results and discussion

3.1. High yields of pure and monodisperse apo ShuA

By using an in-house approach from cloning to crystallization of membrane proteins belonging to the TBDT family (Brillet *et al.*, 2009), we successfully overexpressed and crystallized the haem outer

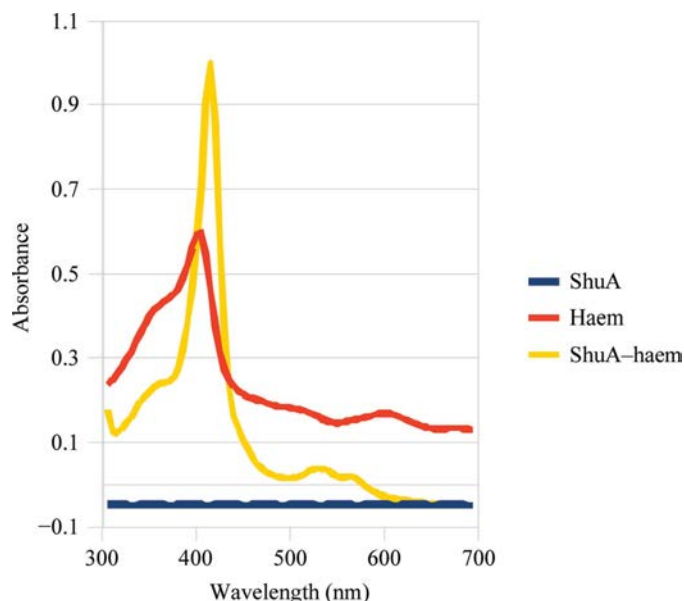


Figure 2

Spectroscopy experiments with ShuA and ShuA-haem after purification. Experiments were carried out with ShuA before purification and similar results were obtained (data not shown).

membrane transporter ShuA from *S. dysenteriae*. As previously observed with other TBDTs (Ferguson *et al.*, 1998; Brillet *et al.*, 2009), the insertion of a His₆ tag in an extracellular loop of the transporter instead of downstream of the *E. coli* peptide signal in the pET20b plasmid allowed efficient targeting to the outer membrane. An increase of the overexpression time from 3 to 16 h with 0.5 mM IPTG induction provided the highest yield of ShuA using only a two-step purification (3.6 *versus* 3 mg l⁻¹). After purification, only one band at approximately 70 kDa (ShuA molecular weight 69.5 kDa) was observed on SDS-PAGE (Fig. 1). By using gel chromatography, only one peak corresponding to monomeric ShuA was observed. The His₆-tagged ShuA was therefore in a monodisperse state before crystallization.

The ShuA-haem complex was characterized by adding haemin to ShuA. The spectral characteristics of haemoproteins were observed, including a Soret peak (maximum at 409 nm) and well resolved α and β bands at approximately 565 and 529 nm (Fig. 2). These peaks were not observed with ShuA. Similar results were obtained before purification. Contrary to published results (Burkhard & Wilks, 2007), ShuA does not bind residual haem in *E. coli*. This difference could result from the expression of ShuA in *E. coli* as well as membrane isolation and protein purification. Indeed, we quickly solubilized the inner membranes by adding 1% lauroylsarcosine after cell lysis and the solution was centrifuged at 119 000g to pellet the outer membranes. The outer membranes were then subjected to solubilization with 7% octyl-POE. These results showed that ShuA is in its apo form in detergent micelles after purification and binds to haem.

3.2. Crystallization and cocrystallization with heavy atoms

By combining three detergents and four sparse matrices for crystallization, 1152 conditions were tested using only 60 μ l protein

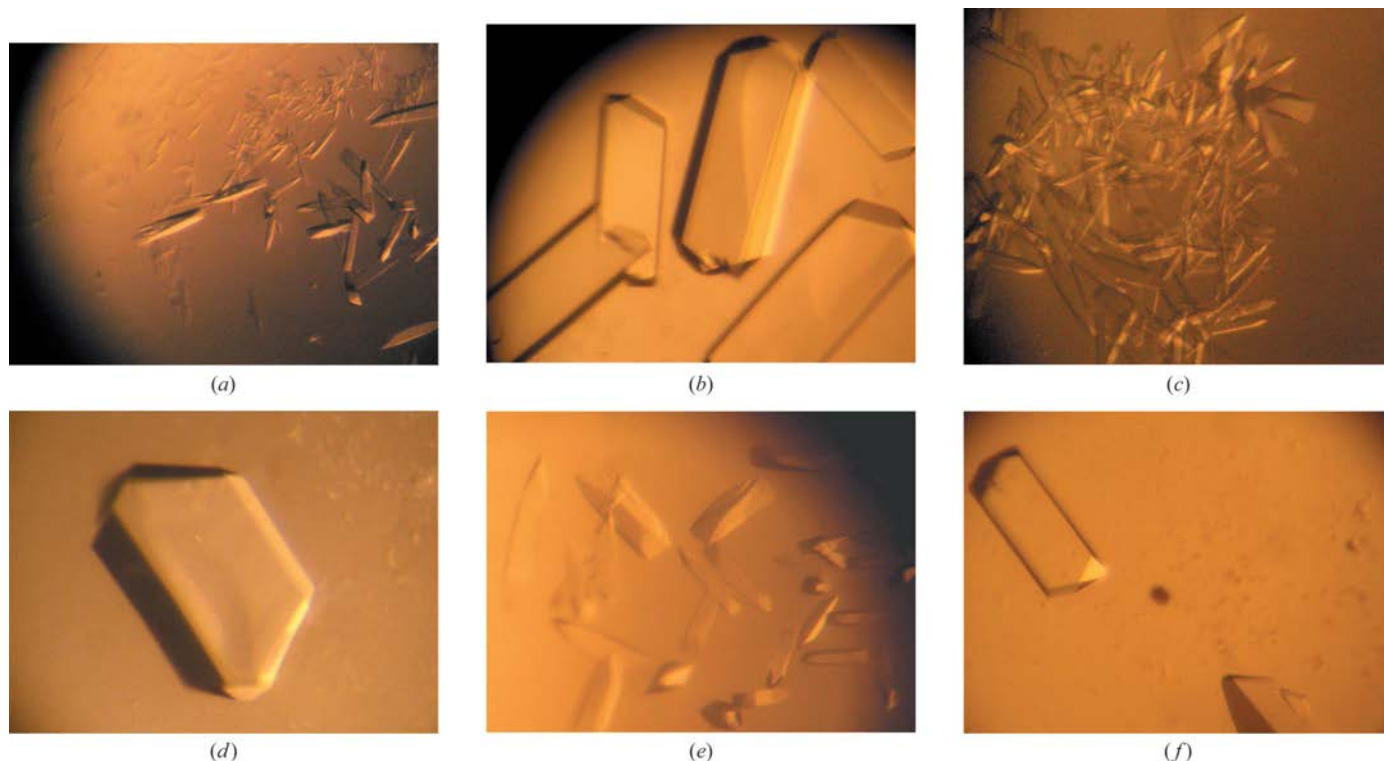


Figure 3

Crystals of ShuA (*a, c, e*), ShuA-Pb (*b*), ShuA-Tb (*d*) and ShuA-Eu (*f*). All crystals were obtained using either 13–15% PEG 1K (*a, b*), 11–14% PEG 1.5K (*c, d*) or 8–12% PEG 3350 (*e, f*) with 0.1 M MES pH 6.5 and 0.1 M NaCl. The protein concentration was 10 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 1.4% octyl- β -D-glucopyranoside. The heavy-atom concentration in the protein solution was 1.4 mM.

Table 1

X-ray data statistics for ShuA-Pb.

The unit-cell parameters are $a = 78.10$, $b = 114.21$, $c = 117.09$ Å and the space group is $P2_12_12_1$. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Wavelength (Å)	0.9788	1.9997
Resolution limits (Å)	19.8–2.6 (2.7–2.6)	33.2–3.2 (3.3–3.2)
Total reflections	232991 (25051)	135194
Unique reflections	32798 (3433)	32661
Completeness (%)	99.7 (99.9)	99.5 (98.5)
R_{merge} (%)†	9.0 (44.8)	6.1 (27.3)
$I/\sigma(I)$	16.27 (4.68)	16.65 (5.18)

† $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of the measured reflection and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of this reflection.

solution (10 mg ml^{−1}) and several crystallization conditions allowed the production of crystals that diffracted X-rays, but only to low resolution (not beyond 3.5 Å). The conditions mainly used PEG (400, 1K, 2K, 2K MME, 3350 or 4K), salts (NaCl or LiCl) and either HEPES, MES or MOPS buffer in the pH range 6.5–7.5. No crystals obtained with PEG 400 diffracted X-rays. Improvement of the crystallization conditions was achieved using heavy atoms, as had previously been observed with ribosome (Yonath, 1992). CocrySTALLIZATION experiments with Pb(NO₃)₂, EuCl₃, TbCl₃, KBr or I₂ were undertaken because their anomalous signals (Pb, I, Tb and Eu) can be detected using a copper rotating-anode generator. A SAD data set could be then collected. These ions are therefore of interest for testing at the laboratory before a three-wavelength MAD experiment. CocrySTALLIZATION with positively charged heavy atoms strongly affected the shape and size of the ShuA crystals (Fig. 3). The number of crystals per drop also decreased and the crystals often diffracted to beyond 3.5 Å resolution. The crystallization conditions are given in Fig. 3.

3.3. Data collection and processing

Prior to data collection, the ShuA, ShuA-Pb, ShuA-Eu or ShuA-Tb crystals were frozen in liquid nitrogen after a brief soak in the initial crystallization solution with 15% (v/v) glycerol. A data set was collected to 2.3 Å resolution on PROXIMA-1 at SOLEIL using one crystal of ShuA-Pb and data were processed at 2.6 Å resolution. Systematic absences ($2n + 1$) were observed for the $h00$, $0k0$ and $00l$ reflections resulting from the presence of 2₁ axes. The crystals belonged to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 78.10$, $b = 114.21$, $c = 117.09$ Å. The addition of Pb²⁺ or other positively charged ions (Eu³⁺ or Tb³⁺) to the protein solution before crystallization improved the resolution limits. A second data set was collected at 3.2 Å resolution using X-rays with wavelength 1.9997 Å on PROXIMA-1 (12 < Pb f'' < 13 electrons) and the same crystal of ShuA-Pb. The data statistics are summarized in Table 1. The crystal contained approximately 65% solvent and one molecule was present

in the asymmetric unit. It belonged to the type II crystals of membrane proteins (Michel, 1983). ShuA and ShuA derivatives (Pb²⁺, Eu³⁺ and Tb³⁺) crystallized in the same space group with similar unit-cell parameters. Analyses of the electron-density maps calculated for ShuA-Pb, ShuA-Tb and ShuA-Eu should provide further details about the binding sites and the effects of the heavy atoms on crystallization.

By using an in-house approach for membrane protein crystallization (Brillet *et al.*, 2009), we overexpressed, crystallized and collected diffraction data for ShuA, the haem TBDT from *S. dysenteriae*. Improvement of the crystal quality by adding heavy atoms with strong anomalous signals at the Cu wavelength showed that these ions and/or other lanthanides (for example) could be used as additives for crystallization. If the SeMet-substituted protein cannot be overexpressed or if the protein does not contain methionine residues, SAD phasing in the laboratory and a MAD experiment at the synchrotron can be performed with such anomalous scatters if they are bound to the protein.

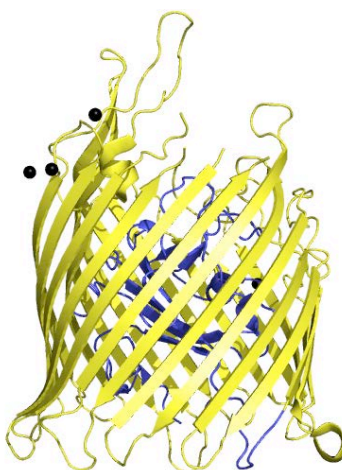
We thank Dr Shelley M. Payne of the Section for Molecular Genetics and Microbiology, University of Texas at Austin for providing us with the DNA encoding ShuA. We thank the BL14 staff at BESSY and the people of the MX group and the BM30A beamline at ESRF for their kind assistance during data collection. This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimann, C. & Cobessi, D. (2009). *Acta Cryst.* **D65**, 326–331.
- Burkhard, K. A. & Wilks, A. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 15126–15136.
- Cescau, S., Cwerman, H., Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. & Biville, F. (2007). *Biometals*, **20**, 603–613.
- Ferguson, A. D., Breed, J., Diederichs, K., Welte, W. & Coulton, J. W. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1636–1638.
- Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 318–332.
- Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800.
- Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. (2008). *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1781–1804.
- Michel, H. (1983). *Trends Biochem. Sci.* **8**, 56–59.
- Mills, M. & Payne, S. M. (1997). *Infect. Immun.* **65**, 5358–5363.
- Neilands, J. B. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726.
- Paulley, J. T., Anderson, E. S. & Roop, R. M. (2007). *Infect. Immun.* **75**, 5248–5254.
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charraut, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P. & Ferrer, J.-L. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 805–814.
- Stintzi, A., Barnes, C., Xu, J. & Raymond, K. N. (2000). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 10691–10696.
- Yonath, A. (1992). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 77–93.

3.6 Publication : Cobessi *et al.*, 2010, *Proteins*

Cobessi, D., Meksem, A., **Brillet, K.** Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism. ***Proteins***, 2010, vol 78, n° 2, p. 286-294.



Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: Heme binding by an induced fit mechanism

David Cobessi,^{1*} Ahmed Meksem,² and Karl Brillet²

¹Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France

²Institut de recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, CNRS-Université de Strasbourg, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch F-67412, France

ABSTRACT

Shigella dysenteriae and other Gram-negative human pathogens are able to use iron from heme bound to hemoglobin for growing. We solved at 2.6 Å resolution the 3D structure of the TonB-dependent heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *S. dysenteriae*. ShuA binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane. The structure consists of a C-terminal domain that folds into a 22-stranded transmembrane β -barrel, which is filled by the N-terminal plug domain. One distal histidine ligand of heme is located at the apex of the plug, exposed to the solvent. His86 is situated 9.86 Å apart from His420, the second histidine involved in the heme binding. His420 is in the extracellular loop L7. The heme coordination by His86 and His420 involves conformational changes. The comparisons with the hemophore receptor HasR of *Serratia marcescens* bound to HasA-Heme suggest an extracellular induced fit mechanism for the heme binding. The loop L7 contains hydrophobic residues which could interact with the hydrophobic porphyring ring of heme. The energy required for the transport by ShuA is derived from the proton motive force after interactions between the periplasmic N-terminal TonB-box of ShuA and the inner membrane protein, TonB. In ShuA, the TonB-box is buried and cannot interact with TonB. The structural comparisons with HasR suggest its conformational change upon the heme binding for interacting with TonB. The signaling of the heme binding could involve a hydrogen bond network going from His86 to the TonB-box.

Proteins 2009; 00:000–000.
© 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: membrane protein; membrane transport; signal transduction; TonB-dependent transporter; X-ray crystallography; crystal structure.

INTRODUCTION

Iron is an essential element to most of living organisms¹ and is an important determinant of bacterial virulence. In humans, iron is bound to iron storage proteins such as lactoferrin, ferritin, or transferrin, and its free concentration in biological fluids is very low (10^{-18} M), and less than that required for bacterial growth (10^{-7} to 10^{-8} M).² Under iron-limiting conditions, most of the Gram-negative bacteria are able to scavenge iron by producing iron-chelators called siderophores,³ which have high affinity for iron(III). They chelate iron either from proteins or nonsoluble oxyhydroxyde complexes and the ferric complexes are transported into the periplasm by TonB-dependent transporters (TBDT).⁴ Gram-negative bacteria can also reduce ferric iron into ferrous iron which is transported into the cell.⁵ Moreover, transferrin and lactoferrin TBDTs recognize and bind to transferrin and lactoferrin respectively for iron uptake.⁶

In humans, iron is mainly bound to heme in hemoglobin.⁷ Heme is therefore a valuable source of iron for the bacterial growth. Several Gram-negative human pathogens, such as *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and *Shigella dysenteriae* for example, have a gene encoding an outer membrane hemoglobin/heme TBDT, which allows for the bacteria growth by using heme as iron source.⁸ This TBDT binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane into the periplasm. Heme is transferred into the cytoplasm by an ABC transporter. Other bacteria such as *Serratia marcescens* secrete hemophores, which bind to heme and are recognized by their respective outer membrane TBDT to deliver heme to the cell.⁹ The first crystal structure of an hemophore TBDT, HasR, has been recently solved.¹⁰

Grant sponsor: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Centre National de la Recherche Scientifique.

Ahmed Meksem and Karl Brillet contributed equally to this work for the purification and crystallization of ShuA.

*Correspondence to: David Cobessi, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France. E-mail: david.cobessi@ibs.fr

Received 30 April 2009; Revised 17 June 2009; Accepted 30 June 2009

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/prot.22539

Shigella dysenteriae is a Gram-negative human pathogen that colonizes the intestine and mainly causes bloody diarrhea. The high incidence of dysentery occurs in regions of malnutrition, inadequate drinking supplies, and poor hygiene conditions. In developed countries, incidence of the disease results from food contamination by the well known *E. coli* O157:H7 strain,^{11,12} for example, *S. dysenteriae* and *E. coli* H157:O7 secrete the Shiga or Shiga related-toxin that causes damages to the bowel mucosa leading to bleeding into the bowel.¹³ This toxin action allows for iron supply to bacteria able to use iron from heme.¹⁴

The TonB-dependent outer membrane transporter ShuA from *S. dysenteriae* binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane.^{14,15} In contrast to the well characterized siderophore TBDTs, little is known about the heme and hemoglobin TBDTs. The energy-transducing complex TonB-ExbB-ExbD of the inner membrane interacts with the TonB-box of ShuA to deliver energy for the membrane transport.¹⁵ No 3D structure of an hemoglobin TBDT has been solved, and the heme transport has never been investigated: the residues involved in the heme binding during transport, the uptake mechanism and pathway for transport are unknown. Two histidine residues (His86 and His420) participate to the heme binding and transfer from hemoglobin whereas the heme recognition probably involves hydrophobicity of the extracellular loops.¹⁴

Due to the absence of structural data about the heme transport by the TBDTs, we determined the ShuA crystal structure at 2.6 Å resolution. The heme binding by His86 and His420 involves extracellular conformational changes and probably an induced fit mechanism. The TonB-box involved in interactions with TonB for the energy transfer is buried in ShuA and no transmembrane pore was observed to allow for a passive transfer of heme through ShuA. Structural comparisons with HasR bound to HasA-Heme highlighted also the conformational changes required for the heme binding and energy transfer.

MATERIALS AND METHODS

Purification and crystallization

ShuA was cloned, expressed, and purified following the same procedure described for FauA, the alcaligin TBDT from *Bordetella pertussis*.¹⁶ The crystallization experiments were carried out using three detergents and four sparse matrices from QIAGEN.¹⁷ Improvement of the crystallization conditions were achieved by adding heavy atoms ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, TbCl_3 , or EuCl_3) to the protein before crystallization.¹⁷

[SeMet]-ShuA was overexpressed in *E. coli* B834 and purified following the procedure used for FauA¹⁶ and for ShuA,¹⁷ by affinity chromatography and anion exchange. Trials to crystallize [SeMet]-ShuA in the same

Table I

X-Ray Data Statistics for ShuA-Pb. The Cell Parameters Are $a = 78.10$, $b = 114.21$, $c = 117.09$ Å and the Space Group Is $\text{P}2_12_12_1$

Wavelength (Å)	0.9788	1.9997
Resolution limits (Å)	19.8–2.6 (2.7–2.6)	33.2–3.2 (3.3–3.2)
Total reflections	232,991 (25,051)	135,194
Unique reflections	32,798 (3433)	32,661
Completeness (%)	99.7 (99.9)	99.5 (98.5)
Rsym (%)	9.0 (44.8)	6.1 (27.3)
I/σ_I	16.27 (4.68)	16.65 (5.18)

$R_{\text{sym}} = \sum \sum |I_i - \text{Im}| / \sum \sum I_i$, where I_i is the intensity of the measured reflection and Im is the mean intensity of this reflection. Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell.

conditions than ShuA failed and [SeMet]-ShuA was only crystallized using EDTA (5–20 mM) and reducing agents: DTT (2.5 mM), ascorbic acid, and citric acid (7.5 mM). Finally, X-ray diffracting crystals of [SeMet]-ShuA (10 mg/mL) were obtained with 10–14% PEG 2K MME, 18–20% glycerol, 0.1 M HEPES pH 6.5, 0.1 M NaCl or LiCl, 5 mM EDTA, and 7.5 mM ascorbic acid.

Data collection and phasing

A complete dataset was collected at 3.2 Å resolution using one crystal of ShuA-Pb at an energy remote from the Pb M absorption edges on PROXIMA-1 at SOLEIL (Table I). The phase problem was solved by the SAD method but only a partial model was rebuilt, due to the poor quality of the electron density map. Another dataset for ShuA-Pb was collected at 2.3 Å resolution using X-ray with a wavelength of 0.9788 Å, and the data were processed at 2.6 Å resolution¹⁷ (Table I) using XDS.¹⁸ Diffraction data for ShuA cocrystallized with TbCl_3 and EuCl_3 were collected on BM30A at ESRF ($\lambda = 0.9798$ Å) and on PROXIMA-1 ($\lambda = 1.7657$ Å) at SOLEIL, respectively.¹⁷

A three wavelength MAD dataset was collected on ID29 at ESRF at 100 K using 1 crystal of [SeMet]-ShuA at the absorption, inflection peak and high remote energy of the Se absorption edge (Table II), and the data were processed using XDS.¹⁸ Analyses of the statistics (increase of the Rsym and decrease of I/σ_I) during the data collection clearly showed that radiation damages occurred. The cell parameters were $a = 78.83$, $b = 114.63$, $c = 120.11$ Å, and the space group was $\text{P}2_12_12_1$. A total of 17 selenium atoms were found using SHELX¹⁹ and the graphical interface HKL2MAP.²⁰ They were input to the SHARP program²¹ to refine the phases (Table III). The resulting phases were further improved by SOLOMON²² allowing for the chain tracing.

Model building and refinement

A polyaniline model was constructed at 3.2 Å resolution, and several side chains were added using COOT.²³ The model was further rebuilt and refined at 2.6 Å reso-

Table II

X-Ray Data Statistics of [SeMet]-ShuA. The Cell Parameters Are $a = 78.83$, $b = 114.63$, $c = 120.11$ Å and the Space Group Is $P2_12_12_1$

	Absorption peak	Inflection point	High energy remote
Wavelength (Å)	0.9791	0.9793	0.9752
Resolution limits (Å)	47.8–3.3 (3.51–3.31)	37.9–3.3 (3.51–3.31)	37.8–3.3 (3.5–3.3)
Total reflections	130,187	131,720	131,237
Unique reflections	30,964	31,303	31,207
Completeness (%)	98.5 (96.5)	98.6 (97.2)	98.5 (96.8)
Rsym (%)	9.3 (66.4)	11.4 (114.3)	10.0 (91.0)
I/σ_I	12.02 (1.87)	10.44 (0.87)	11.64 (1.37)

$R_{sym} = \sum \sum |I_i - I_m| / \sum \sum I_i$, where I_i is the intensity of the measured reflection and I_m is the mean intensity of this reflection. Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell.

lution by energy minimization and molecular dynamic using CNS_SOLVE 1.2²⁴ and by restrained maximum-likelihood least-square techniques in REFMAC5 5.2²⁵ from CCP4²⁶ with the data collected using ShuA-Pb.¹⁷ The refinement statistics are given in Table III. At the end of the refinement, water and one detergent molecules were added. Simulated-annealing 3Fo2Fc and 2FoFc omit electron density maps were calculated using CNS_SOLVE²⁴ to check the model. The model was also checked using PROCHECK.²⁷ All the figures were prepared using Pymol.²⁸ The ShuA atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with the accession code number 3FHH.

RESULTS

Heavy atom binding sites—quality of the structure

Only the crystals obtained with heavy atoms diffracted X-rays beyond 3.5 Å resolution. In the ShuA-Pb structure, 3 Pb^{2+} ions are bound at the protein surface: 2 Pb^{2+} ions are involved in intermolecular contacts (Fig. 1). One cation (occupancy: 1) interacts with two water molecules and the Asp376, Asp454, and Asp455 carboxylate groups. The other (occupancy: 0.31) interacts with the Glu2, Glu17, and Asp372 carboxylate groups and with the Arg452 guanidinium group. The third Pb^{2+} ion (occupancy: 0.26) is bound to the Asp378 carboxylate group and Asp376 carbonyl group. Only the position corresponding to the first site is occupied by Eu^{3+} and

Table III

Sharp Phasing Statistics of [SeMet]-ShuA

	[SeMet]-ShuA		
	Peak	Inflection	Remote
Resolution (Å)		37.8–3.3	
Phasing power	0.66	0.52	0.59
R _{cullis}	0.89	0.94	0.94
FOM overall	0.30		

**Figure 1**

View of the Pb^{2+} binding sites found at the surface of ShuA. The residues involved in the Pb^{2+} stabilization are colored in yellow and green according to the symmetry related molecules. The water molecules interacting with Pb^{2+} and ions are represented with spheres colored in red and gray, respectively. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Tb^{3+} in the crystals of ShuA-Eu and ShuA-Tb. A fourth Pb^{2+} ion (occupancy: 0.37) is observed at the interface of the plug and barrel domain.

The 3D structure of ShuA-Pb was solved at 2.6 Å resolution with R and R_{free}²⁹ factors of 23.7 and 28.6%, respectively (Table IV). The ShuA construct encoded a 70 kDa mature protein (632 residues) and 602 side chains were assigned. Electron density was observed for 621 residues. Electron density for residues of three extracellular loops (loop L4, L5, and L10) was missing due to their

Table IV

Refinement and Model Statistics

Resolution range ^a (Å)	19.94–2.60 (2.67–2.60)
Number of reflections used for R _{cryst} calculation ^a	29,458 (2218)
Number of reflections used for R _{free} calculation ^a	1647 (119)
Data cutoff F/σ_F	0.0
R _{cryst} value ^a (%)	23.74 (33.60)
R _{free} value ^a (%)	28.58 (37.20)
Number of nonhydrogen protein atoms	4757
Mean B factors, protein main chain atoms (Å ²)	58.7
Mean B factors, protein side chain atoms (Å ²)	60.0
Ramachandran Plot	
Residues in most favored regions (%)	85.7
Residues in additionally allowed regions (%)	13.2
Residues in generously allowed regions (%)	1.1
Residues in disallowed regions (%)	0.0
Rms differences from ideal geometry	
Bond length (Å)	0.012
Bond angle (°)	1.489

^aValues indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell. $R_{cryst} = \sum ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$. R_{free} ²⁹ is the same as R_{cryst} but calculated for n % data omitted from the refinement where n is 5.0% for ShuA.

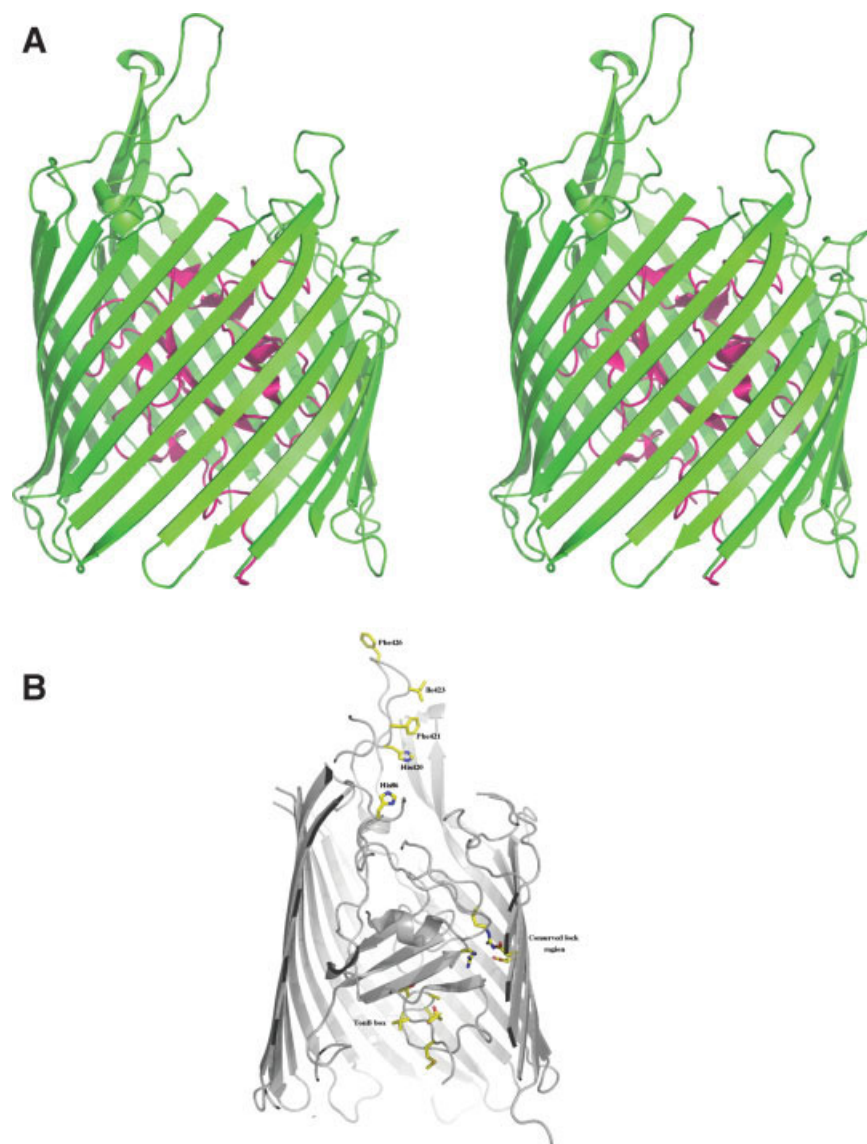


Figure 2

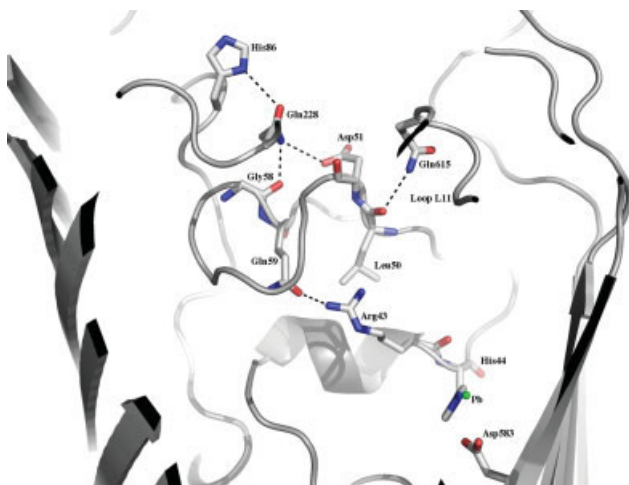
Overall structure of ShuA. (A) Stereoview of the structure. The plug and the barrel are pink and green colored, respectively. (B) View of the ShuA structure. The side chains of the residues belonging to the TonB-box and lock region as well as the His86, His420, Phe421, Ile423, and Phe426 side chains are represented. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

flexibility. One molecule of detergent used for crystallization (octyl- β -D-glucopyranoside) was observed in the electron density. The overall B-factor average is $59.3 \text{ \AA}^2$. 85.7% residues are in the most favored regions of the Ramachandran plot. No residue is found in disallowed regions.

The overall 3D structure

ShuA displays the classical fold of the TBDTs. The C-terminal domain is folded into a 22-stranded transmembrane β -barrel (Ser136 to Trp632) and the lumen is filled with the N-terminal plug domain (Thr1 to Gln135) (Fig.

2). The transmembrane antiparallel β -strands are connected by long extracellular loops and periplasmic turns. The root-mean-square deviation calculated with MSD-fold³⁰ between ShuA and the siderophore TBDTs goes from $1.87 \text{ \AA}$ (ShuA/FepA, PDB entry: 1FEP³¹) to $2.2 \text{ \AA}$ (ShuA/FpvA, PDB entry: 1XKH³²) and is $1.75 \text{ \AA}$ with BtuB (PDB entry: 1NQE³³). The conserved interactions between acid and basic residues from the barrel and plug respectively,³⁴ called lock region,³⁵ involve Arg64, Arg104 from the plug and Glu446 (β -strand 14), Asp503 (β -strand 16) in the β -barrel. The periplasmic N-terminal TonB-box (Met4-TVTAT-Gly10) is well defined in the electron density and is buried. At the extracellular face,

**Figure 3**

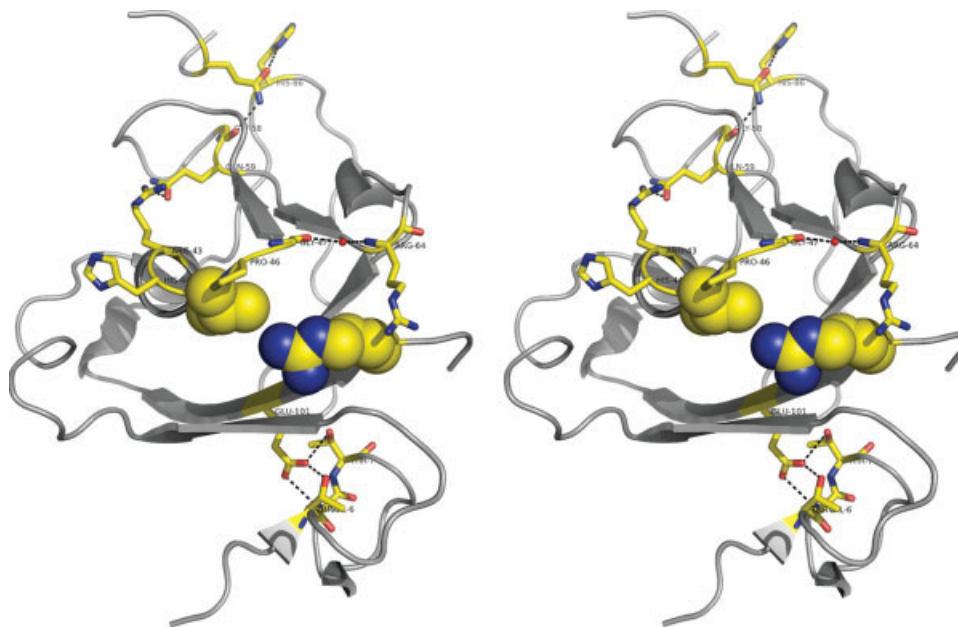
The hydrogen bond networks involving His86. One network includes His86, Gln615, Leu50, Asp51, and Gln228. The second network involves His86, Gln228, Gly58, Gln59, and Arg43. His44, Asp583, and Pb^{2+} are also drawn. The hydrogen bonds are drawn in dashed lines. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

His86 is located at the apex of the plug domain and is exposed to the solvent. The second distal coordinating residue of heme, His420, is located 9.86 Å apart His86. His420 is in one of the largest extracellular loop, the loop L7. The loop L7 contains three hydrophobic resi-

dues exposed to the solvent: Phe421, Ile423, and Phe426 (Fig. 2). The FRAP and NPNL signatures of the heme TBDTs³⁶ begins (Phe406 to Pro409) and ends (Asn434-Leu437) the loop L7, respectively. A Pb^{2+} ion is at the interface of the domains and interacts with the imidazole and carboxylate groups of His44 and Asp583, respectively.

The heme binding and transport

The heme transfer from hemoglobin and its binding at the extracellular face of ShuA involve the conserved His86 and His420.¹⁴ His86 is 9.86 Å apart from His420. Structural rearrangements are required for heme binding. Due to its hydrophobic properties, the porphyring recognition could involve Phe421 or Ile423 in the loop L7. Ile423 is replaced by another hydrophobic residue in the sequence alignments. The His86 side chain interacts with the Gln228 side chain hydrogen bonded to the Gly58 carbonyl group. The Gln59 side chain shares a hydrogen bond with the Arg43 guanidinium group conserved in the sequence alignments (Fig. 3). An interaction network is observed from residues of the loop containing Arg43 to the TonB-box, and involves hydrogen bonds as well as van der Waals contacts (Fig. 4). The conserved lock region which could play an important role for the opening of a channel,³⁵ participates to this network (Fig. 4). Gln228 is also hydrogen bonded to the Asp51 side chain, and the Leu50 carbonyl group interacts by hydrogen

**Figure 4**

Stereoview of the interaction network from His86 to the residues of the TonB-box. For clarity, only the plug and trace of residues surrounding Gln228 were drawn. Arg104 and Val45 are represented in van der Waals spheres. The hydrogen bonds are drawn in dashed black lines.

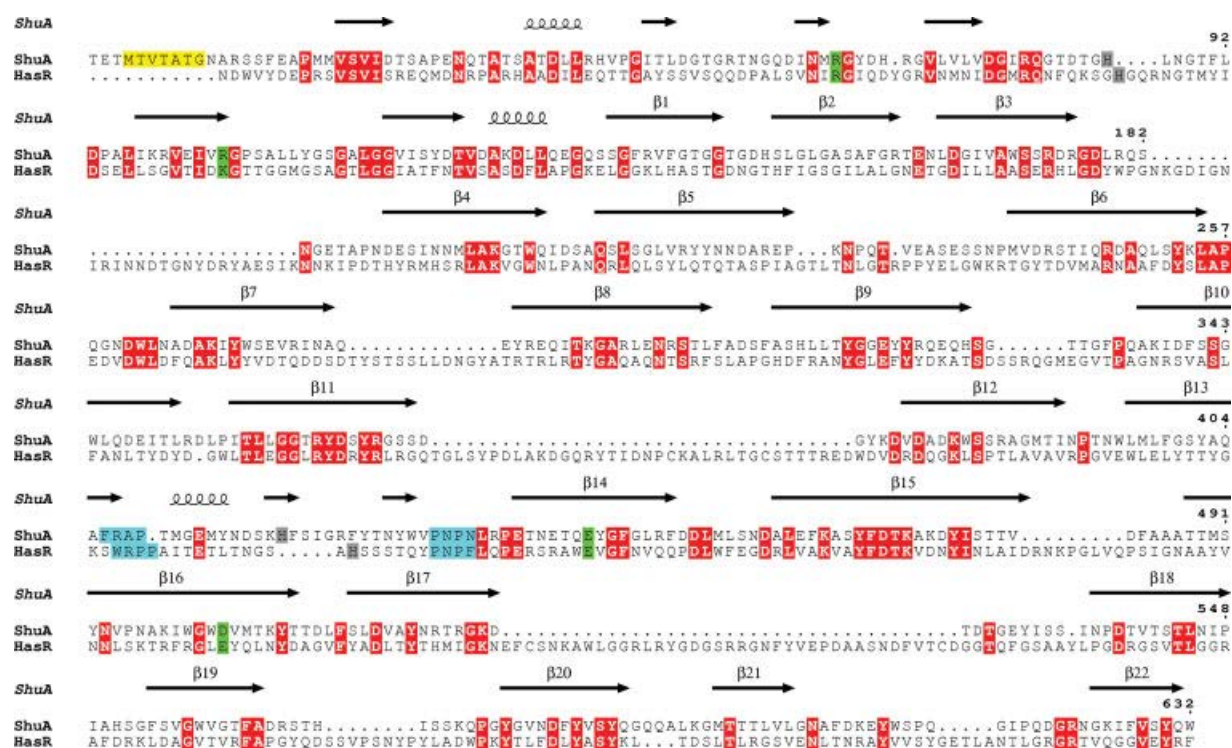


Figure 5

Sequence alignment deduced from the superposition of ShuA/HasR. The TonB-box is highlighted in yellow, the conserved distal histidine ligands of heme are gray shaded. The FRAP and NPNL signatures and the residues involved in the lock region are cyan and green shaded, respectively. The conserved residues are red shaded. The drawing was prepared with ESPript⁴⁹ from the structure superimposition obtained using MSDFold.³⁰ [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

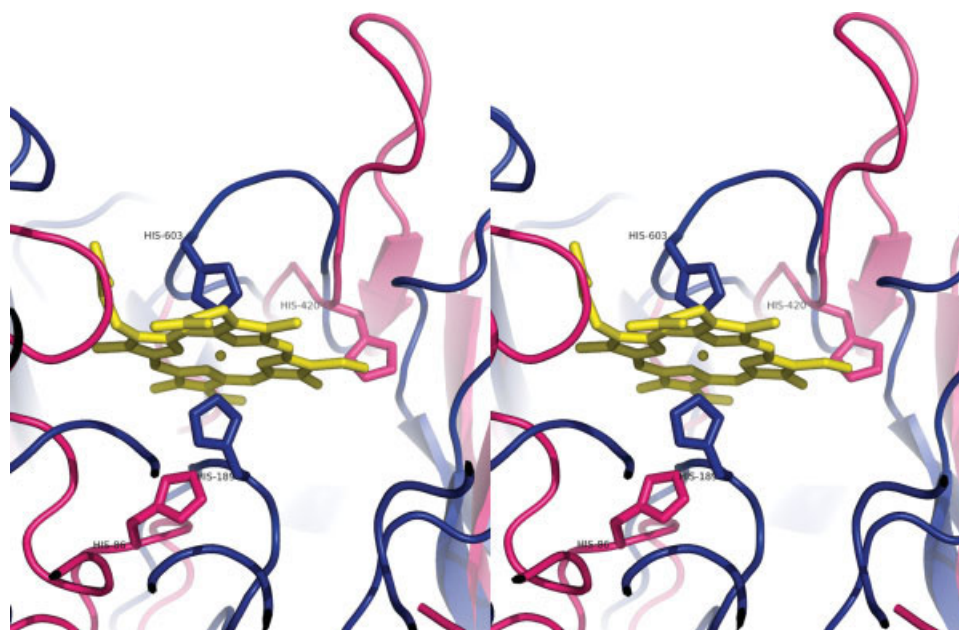


Figure 6

Stereoview of the heme binding site of HasR (blue) superposed onto ShuA (pink). The heme is yellow colored. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

bond with the Gln615 side chain located at the apex of the loop L11 (Fig. 3). The loop L11 closes a large cavity from the extracellular face, whereas the bottom of the cavity is closed from the periplasm by the loop containing Arg43 and His44. One Pb^{2+} ion is in the cavity and interacts with the His44 and Asp583 side chains (Fig. 3). This Pb^{2+} binding site was free of Eu^{3+} or Tb^{3+} in the electron density maps calculated from the diffraction data collected with the ShuA crystals obtained by cocrystallization with EuCl_3 or TbCl_3 . No transmembrane pore is observed inside the barrel domain.

Structural comparisons with HasR

The overall fold of the TBDTs is well conserved, and the structures superimpose with a RMS deviation of 1.91 Å. The main structural differences are the length and orientation of the extracellular loops from the plug and β -barrel. Analyses of the resulting sequence alignment (Fig. 5) show three large gaps resulting from three larger extracellular loops (L2, L6, and L9) in HasR. The loops L2, L6, and L9 are involved in the hemophore (HasA) or HasA-Heme binding to HasR. In the sequence alignment, the FRAP and NPNL signatures of heme TBDTs and fingerprints of TBDTs are conserved. The TonB-box is not defined in the electron density of HasR probably due to the binding of HasA or HasA-Heme to HasR. The distal ligands of heme in HasR, His189, and His603, are at the apex of the plug and in the loop L7, respectively. In HasR-HasA-Heme, they are bound to heme and therefore do not superimpose onto His86 and His420 of ShuA. The extracellular loop L3 of ShuA contacts with heme from HasR-HasA-Heme (Fig. 6). The conformational changes of the plug, loop L3 and L7 in ShuA are necessary for the heme binding as observed in the structure of HasR-HasA-Heme.

DISCUSSION

The crystals of ShuA derivatives always diffracted the X-rays better than the crystals of the native protein (3.5 Å resolution) and allowed for the structure determination of ShuA at 2.6 Å resolution. Similar results were obtained with the ribosome.³⁷ The positive heavy ions used to crystallize ShuA decreased the crystal disorder by bridging the molecules (Fig. 1) and strengthened the intermolecular interactions. The structure of ShuA displays a similar fold to the 3D structures of siderophore and vitamin B12 TBDTs (Fig. 2). The β -strands of the β -barrel are connected by long and flexible extracellular loops. The flexibility was revealed by the lack of electron density in several TBDTs (FepA,³¹ BtuB,³³ FptA,³⁸ CirA,³⁹ and FauA¹⁶). The lengths of the extracellular loops from the plug and barrel domain are the main structural differences between the TBDTs. As shown by several mutagenesis experiments, the extracellular loops are involved in

transport.⁴⁰ Their flexibility allows for the ligand recognition before binding into its binding pocket.

The heme binding pocket is not preformed at the extracellular face of ShuA. After the transfer from hemoglobin or directly by using free heme, the heme is bound to two conserved and solvent exposed histidines, His86 and His420 apart from 9.86 Å (Fig. 2). Therefore, a large conformational change should occur. The ligand binding pocket can be preformed as we observed it when structures of the unliganded TBDTs (FpvA, FhuA, or BtuB for example) and iron-siderophore (or apo-siderophore or vitamin B12) loaded TBDTs were compared. An induced fit mechanism probably occurs in ShuA for the heme binding (Fig. 6). The apex of the plug and loop L7 probably undergo a conformational change to coordinate heme involving His86 and His420. The induced fit mechanism is strongly supported by the structural comparison with HasR-HasA-Heme (Fig. 6). The upper part of the loop L7 is hydrophobic and exposed to the solvent (Fig. 2). It could be involved to recognize heme whose porphyrin ring is hydrophobic.

The plug domain separates the periplasmic space from the extracellular medium and prevents the passive diffusion of molecules through the TBDTs. Conformational changes and energy are required for the transport. Energy is provided by the energy-transducing complex TonB-ExbB-ExbD of the inner membrane through an interaction between the periplasmic part of TonB and the N-terminal TonB-box of the TBDTs.⁴ In ShuA, the TonB-box is buried (Fig. 2) and cannot interact with TonB. This observation is not consistent with the biochemical results obtained in binding assays between TonB and the apo form of ShuA.¹⁴ The crystal structures of the loaded FhuA and BtuB complexed to periplasmic part from TonB were solved.^{41,42} Therefore, either the fold of the TonB-box observed in our crystal structure was constrained by the crystallization conditions as it was also shown for BtuB using EPR⁴³ or the complex studied in solution resulted from nonspecific interactions between TonB and ShuA. In FhuA,^{44,45} FecA,^{34,46} and FpvA⁴⁷ a large conformational change of the N-terminal part containing the TonB-box occurs to interact with TonB upon the ferri-siderophore binding. In HasR-HasA-Heme,¹⁰ the N-terminal part containing the TonB-box was not observed in the electron density due to its flexibility. Upon the heme binding, the conformational change of the TonB-box probably occurs in ShuA for interacting with the periplasmic part of TonB.

The structural comparison with HasR suggested a conformational change of His86 and surrounding residues upon the heme binding. His86 is involved in two hydrogen bond networks. One hydrogen bond network goes from His86 to the conserved Arg43 located in a loop containing His44, Val45, Pro46, and Gly47. The second hydrogen bond network goes from His86 to the conserved Gln615 in loop L11 (Fig. 3). The loop L11 closes

a large cavity from the extracellular face and the bottom of the cavity is closed from the periplasm by the loop containing Arg43 and His44. The movement of both loop could be triggered upon the hydrogen bond perturbation due to the heme binding and transmitted to residues in their vicinity such as the conserved Arg64. Arg64 is involved in the lock region together with Arg104, Glu446, and Asp503. The lock region could be involved for the opening of a channel.³⁵ Arg64 interacts with a water molecule ($B = 26.61 \text{ \AA}^2$, overall B-factor average: $59.3 \text{ \AA}^2$) hydrogen bonded to the Gly47 carbonyl group. The movement of Arg64 could disturb the lock region and surrounding interactions such as those of Glu101 with Thr5, Val6, and Thr7 from the TonB-box (Fig. 6). This pathway for the signal transduction could lead to the conformational change of the TonB-box for interacting with TonB. Since, no transmembrane pore is observed in ShuA for the heme transfer, energy would allow for conformational changes of the plug to deliver heme to the periplasmic heme binding protein ShuT, which binds and transports heme to the ABC transporter ShuU/ShuV of the inner membrane.⁴⁸

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr Shelley M. Payne from the Section for Molecular Genetics and Microbiology University of Texas at Austin for providing us the DNA encoding for ShuA. The authors thank the BL14 staff at BESSY and people of the MX group and BM30A beamline at ESRF for their kind assistance during the data collections.

REFERENCES

- Posey JE, Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 2000;288:1651–1653.
- Stintzi A, Barnes C, Xu J, Raymond KN. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10691–10696.
- Braun V, Killmann H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* 1999;24:104–109.
- Ferguson AD, Deisenhofer J. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565:318–332.
- Velayudhan J, Hughes NJ, Mccolm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol* 2000;37:274–286.
- Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:154–171.
- Chen CJ, Sparling PF, Lewis LA, Dyer DW, Elkins C. Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1996;64:5008–5014.
- Murphy ER, Sacco RE, Dickenson A, Metzger DJ, Hu Y, Orndorff PE, Connell TD. BhuR, a virulence-associated outer membrane protein of *Bordetella avium*, is required for the acquisition of iron from heme and hemoproteins. *Infect Immun* 2002;70:5390–5403.
- Cescau S, Cwerman H, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F. Heme acquisition by hemophores. *Biometals* 2007;20:603–613.
- Krieg S, Huché F, Diederichs K, Izadi-Pruneyre N, Lecroisey A, Wandersman C, Delepelaire P, Welte W. Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1045–1050.
- Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003;228:159–166.
- Sansonetti PJ. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:3–14.
- Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 2000;88:729–745.
- Burkhard KA, Wilks A. Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. Substrate specificity and identification of the heme protein ligands. *J Biol Chem* 2007;282:15126–15136.
- Mills M, Payne SM. Identification of ShuA, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a ShuA mutant. *Infect Immun* 1997;65:5358–5363.
- Brillet K, Meksem A, Lauber E, Reimann C, Cobessi D. Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallogr D* 2009;65:326–331.
- Brillet K, Meksem A, Thompson A, Cobessi D. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*. *Acta Crystallogr F* 2009;65:402–405.
- Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* 1993;26:795–800.
- Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* 2008;64:112–122.
- Pape T, Schneider TR. HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J Appl Crystallogr* 2004;37:843–844.
- De La Fortelle E, Bricogne G. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol* 1997;276:472–494.
- Abrahams JP, Leslie AGW. Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F_1 ATPase. *Acta Crystallogr D* 1996;52:30–42.
- Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* 2004;60:2126–2132.
- Brunger AT. Version 1.2 of the crystallography and NMR system. *Nat Protoc* 2002;2:2728–2733.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D* 1997;53:240–255.
- CCP4. Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallogr D* 1994;50:760–763.
- Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–291.
- Delano WL. The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific; 2002.
- Brunger AT. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 1992;355:472–475.
- Krisinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D* 2004;60:2256–2268.
- Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, Van Der Helm D, Deisenhofer J. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 1999;6:56–63.

32. Cobessi D, Celia H, Folschweiller N, Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *J Mol Biol* 2005;347:121–134.
33. Chimento DP, Mohanty AK, Kadner RJ, Wiener MC. Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nat Struct Biol* 2003;10:394–401.
34. Yue WW, Grizot S, Buchanan SK. Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol Biol* 2003;332:353–368.
35. Chakraborty R, Storey E, Van Der Helm D. Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biomaterials* 2007;20:263–274.
36. Bracken CS, Baer MT, Abdur Rashid A, Helms W, Stojiljkovic I. Use of the heme-protein complexes by the *Yersina enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol* 1999;181:6063–6072.
37. Yonath A. Approaching atomic resolution in crystallography of ribosomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:77–93.
38. Cobessi D, Celia H, Pattus F. Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* 2005;352:893–904.
39. Buchanan SK, Lukacik P, Grizot S, Ghirlando R, Ali MM, Barnard TJ, Jakes KS, Kienker PK, Esser L. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J* 2007;26:2594–2604.
40. Annamalai R, Jin B, Cao Z, Newton SM, Klebba PE. Recognition of ferric catecholates by FepA. *J Bacteriol* 2004;186:3578–3589.
41. Pawelek PD, Croteau N, Ng-Thow-Hing C, Khursigara CM, Moiseeva N, Allaire M, Coulton JW. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* 2006;312:1399–1402.
42. Shultis DD, Purdy MD, Banchs CN, Wiener MC. Outer membrane active transport: structure of the BtuB/TonB complex. *Science* 2006;312:1396–1399.
43. Fanucci GE, Coggshall KA, Cadieux N, Kim M, Kadner RJ, Cafiso DS. Substrate-induced conformational changes of the periplasmic N-terminus of an outer-membrane transporter by site-directed spin labeling. *Biochemistry* 2003;42:1391–1400.
44. Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 1998;282:2215–2220.
45. Locher KP, Rees B, Koebnik R, Mitschler A, Moulinier L, Rosenbusch JP, Moras D. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferri-chrome-bound states reveal allosteric changes. *Science* 1998;95:771–778.
46. Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, Van Der Helm D, Deisenhofer J. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* 2002;295:1715–1719.
47. Wirth C, Meyer-Klaucke W, Pattus F, Cobessi D. From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J Mol Biol* 2007;368:398–406.
48. Wyckoff EE, Duncan D, Torres AG, Mills M, Maase K, Payne SM. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* 1998;28:1139–1152.
49. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F. ESPript: multiple sequence alignments in postscript. *Bioinformatics* 1999;15:305–308.

4 Etudes fonctionnelles et structurales du transporteur de l'énantiopyochéline, FetA, chez *Pseudomonas fluorescens*

4.1 Introduction

P. fluorescens infecte généralement les produits laitiers, en raison de sa présence dans les sols dédiés à l'élevage bovin. Un fromage italien a défrayé la chronique il y a quelques années, lorsqu'un consommateur a déballé un produit ayant viré au bleu, couleur attribuée à une contamination par *P. fluorescens*.

P. aeruginosa et *P. fluorescens* produisent et sécrètent la pyochéline (Pch). Ce sidérophore a la particularité de posséder trois centres asymétriques (**Figure 63**) et chacune des souches produit un énantiomère spécifique. *P. aeruginosa* produit la pyochéline alors que *P. fluorescens* produit l'énantiopyochéline (EPch) (**Figure 63**) (Tseng *et al.*, 2006 ; Youard *et al.*, 2007). Chacun de ces énantiomères est reconnu et transporté par un TBDT spécifique, FptA chez *P. aeruginosa* et FetA chez *P. fluorescens*.

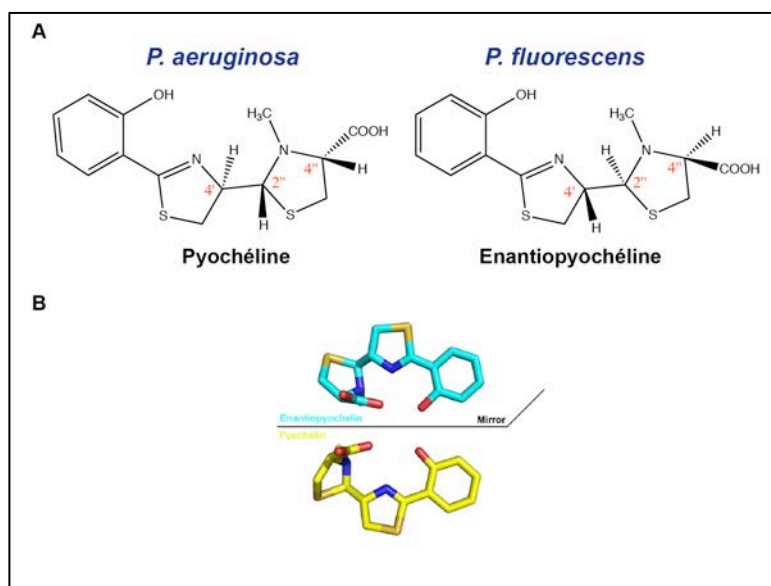


Figure 63 : Structure de la pyochéline et de l'énantiopyochéline

La pyochéline est un sidérophore ayant trois centres asymétriques (rouge). *P. aeruginosa* produit et sécrète la pyochéline, *P. fluorescens* produit l'énantiopyochéline (A). Ces sidérophores sont deux énantiomères, image l'un de l'autre dans un miroir (B).

Au laboratoire des études de liaison de ligand à l'équilibre ont montré qu'il existait une reconnaissance spécifique de ces sidérophores par leurs transporteurs (Hoegy *et al.*, 2009). Ces transporteurs seraient donc capables de discriminer deux sidérophores énantiomères. La structure du transporteur FptA a été résolue au laboratoire à une résolution de 2 Å, en 2005. Cette protéine adopte la structure classique des TBDT, elle est composée de deux domaines : un tonneau β et un domaine bouchon (Cobessi *et al.*, 2005a). La poche de fixation du complexe Pch-Fe est localisée sur la face extracellulaire du transporteur. Elle se compose de résidus hydrophobes ou aromatiques, compatibles avec le caractère hydrophobe de ce sidérophore (Cobessi *et al.*, 2005a). Dans cette étude, l'objectif était d'obtenir la structure tridimensionnelle du transporteur FetA en complexe avec l'EPch-Fe afin d'élucider la base de cette énantiosélectivité.

4.2 Approches expérimentales

Pour l'étude structurale et fonctionnelle de ce transporteur, la méthode mise au point précédemment a été utilisée (Brillet *et al.*, 2009a). Dans le cadre de ce projet, la construction de la souche permettant la surexpression de la protéine FetA a été effectuée dans le laboratoire du Dr Cornelia REIMMANN, à l'Université de Lausanne – Suisse. Des résidus clés pouvant interagir avec l'EPch ont été identifiés grâce à l'analyse de la structure. L'insertion de l'étiquette histidine dans la boucle L5 du transporteur FetA, ainsi que les mutants FetA_{R91A} et FetA_{Y370A}, ont été réalisés par mutagenèse dirigée. Une fois construits, les plasmides ont été transformés dans une souche de *P. fluorescens*, délétée au niveau du gène *fetA*.

Grâce à ces souches, j'ai produit et purifié la protéine FetA-His₆, puis réalisé un échange de détergent par ultrafiltration. Le criblage des conditions initiales de cristallisation a été effectué sur quatre matrices clairsemées en présence de différents détergents : C₈E₄ 0,75% (m/v), C₈E₅ 0,75%, OG 1,4%, LDAO 0,06%, CHESO 1,2% et CHESO 1,8% soit 2 304 conditions, avant de passer à l'optimisation manuelle en plaques 24 puits. A partir d'un cristal obtenu avec le détergent C₈E₅, un jeu de données a été collecté sur la ligne BM30A à l'ESRF à une résolution de 3,2 Å. La structure a été résolue par remplacement moléculaire en utilisant les coordonnées atomiques de FhuA (PDB 1BY3), par le Dr David COBESSI. Sur les mutants ponctuels du transporteur FetA_{R91A} et FetA_{Y370A}, j'ai réalisé des expériences de

liaison de ligand à l'équilibre afin d'évaluer l'implication de ces différents résidus dans l'interaction avec le complexe EPch-Fe. Pour cela, j'ai préparé un complexe EPch- ^{55}Fe (2:1). La mesure de la quantité de radioligand fixé a été réalisée sur chacun des mutants et sur la souche sauvage exprimant le transporteur natif. La régression linéaire, selon la méthode de Scatchard, m'a ensuite permis de calculer et de comparer les affinités respectives. En complément, des expériences de « Docking » de la pyochéline et de l'énantiopyochéline ont été effectuées sur les transporteurs FptA et FetA, par le Dr Didier ROGNAN à la Faculté de Pharmacie – Illkirch, afin d'analyser l'énantiosélectivité de ces transporteurs.

4.3 Résultats

La production et les expériences de purification m'ont permis d'obtenir la protéine FetA avec un très bon niveau de pureté après l'étape de gel filtration et un rendement final de $1,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de culture.

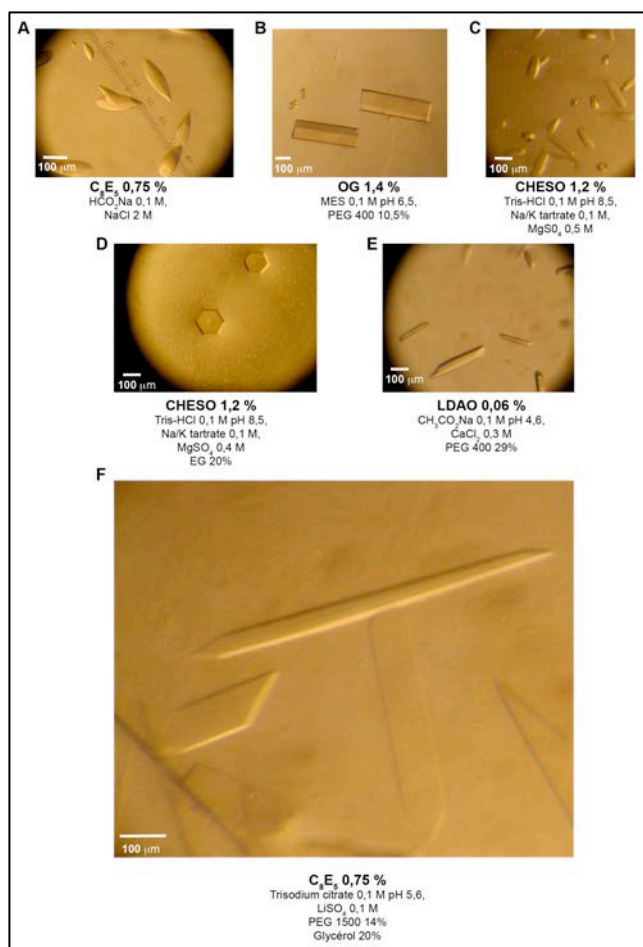


Figure 64 : Cristallisation du complexe FetA-EPch-Fe, quelques exemples de cristaux obtenus

Après avoir échangé le détergent, j'ai concentré et chargé la protéine avec le complexe EPch-Fe pour obtenir une concentration finale à 10 mg.mL^{-1} , dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, C_8E_5 0,75% (m/v). De nombreux cristaux ont été obtenus avec les différents détergents (**Figure 64**), malheureusement la plupart ne diffractaient pas ou peu les rayons X. La structure du complexe FetA-EPch-Fe a finalement été résolue avec la forme cristalline obtenue en présence de trisodium citrate 0,1 M pH 5,6 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), LiSO_4 0,1 M, PEG 1500 14% (m/v) et de glycérol 20% (v/v) (**Figure 64F**).

L'analyse de la structure de FetA-EPch-Fe montre que ce transporteur adopte le repliement classique des protéines de la famille des TBDT : un tonneau β (résidus Lys-160 à Trp-698) et un domaine bouchon en position N-terminale (résidus Pro-23 à Asp-159) (**Figure 65**). Le domaine bouchon se compose d'un feuillet à quatre brins β et de deux hélices α . Comme les autres TBDT, les brins β du tonneau sont connectés par dix coudes courts périplasmiques et onze longues boucles extracellulaires qui participent probablement à la liaison et au transport du complexe EPch-Fe (**Figure 65**). Les premiers résidus contenant la boîte TonB ne sont pas définis dans la densité électronique.

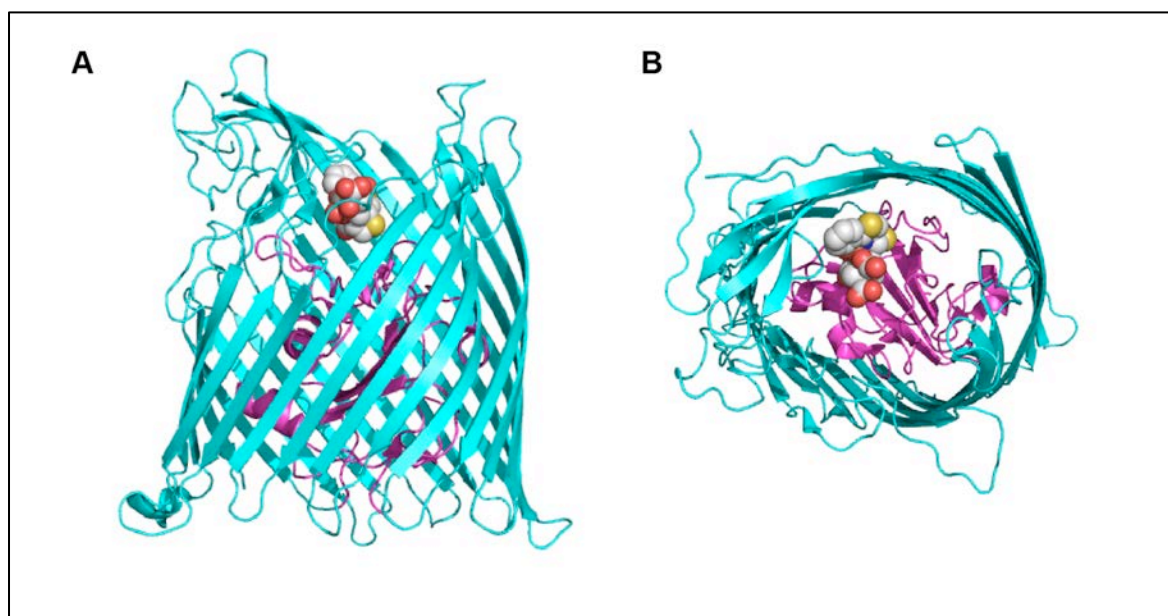


Figure 65 : Représentation de la structure du transporteur FetA en complexe avec l'EPch-Fe

Représentation de la structure de FetA-EPch-Fe, vue de face (A) et vue de dessus (B). Le tonneau β est représenté en cyan, le domaine bouchon en magenta et l'énantiopyochéline ferrique en sphères de van der Waals.

La stoechiométrie du complexe EPch-Fe ou Pch-Fe est de 2:1. Au niveau de la face extracellulaire de FetA, le complexe EPch-Fe a été placé dans la densité électronique mais seulement une molécule d'EPch peut être attribuée, le reste de la densité est conféré à un autre chélateur provenant de la condition de cristallisation : le citrate (Figure 3, publication n°3). La poche de fixation du ligand ferrique est composée majoritairement de résidus hydrophobes du tonneau β et du domaine bouchon (Figure 4, publication n°3). Deux résidus principaux semblent interagir avec la molécule d'EPch : Tyr-370 et Arg-91. Afin de vérifier, leur implication dans la reconnaissance du sidérophore, ces deux résidus ont été mutés et j'ai effectué des études de liaison de ligand à l'équilibre qui ont permis de montrer que la mutation de la Tyr-370 affecte la liaison d'un facteur 3, alors que la mutation de l'Arg-91 abolit totalement la liaison de l'EPch- ^{55}Fe (**Figure 66**). Ces résultats montrent que l'Arg-91 a un rôle clé dans la reconnaissance spécifique de l'énantiopyochéline. Les autres interactions avec le ferri-sidérophore mettent en jeu des contacts par interactions de van der Waals, notamment la Tyr-370.

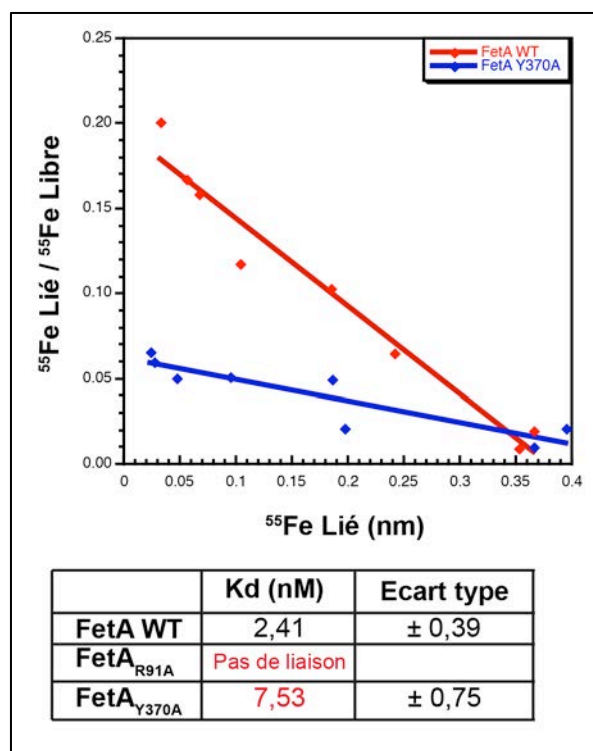


Figure 66 : Expérience de liaison de ligand à l'équilibre sur les mutants FetA

L'analyse de liaison de ligand à l'équilibre par la méthode de Scatchard a été réalisée sur le récepteur FetA sauvage (« WT », rouge) et sur deux mutants ponctuels $R_{91}A$ et $Y_{370}A$ (bleu). La régression linéaire montre que la mutation de la Tyr-370 affecte la liaison d'un facteur 3, alors que la mutation $R_{91}A$ abolit totalement la liaison du complexe EPch- ^{55}Fe .

Les transporteurs FptA et FetA partagent 25% d'identité de séquence et la superposition des structures donne une déviation standard moyenne de 1,77 Å. Au niveau des poches de liaison, EPch-Fe et Pch-Fe se superposent partiellement

(**Figure 67A**). Les deux poches de liaison sont plutôt hydrophobes. Elles impliquent des résidus du tonneau β et du domaine bouchon mais aucun résidu n'est conservé. Globalement, le complexe Pch-Fe est stabilisé dans la poche de fixation du transporteur FptA grâce à trois résidus principaux appartenant à une boucle apicale du domaine bouchon : Phe-114, Leu-116 et Leu-117 (**Figure 67B**). En revanche, l'EPch-Fe est principalement immobilisé par l'Arg-91, de la première boucle du domaine bouchon de FetA (**Figure 67C**).

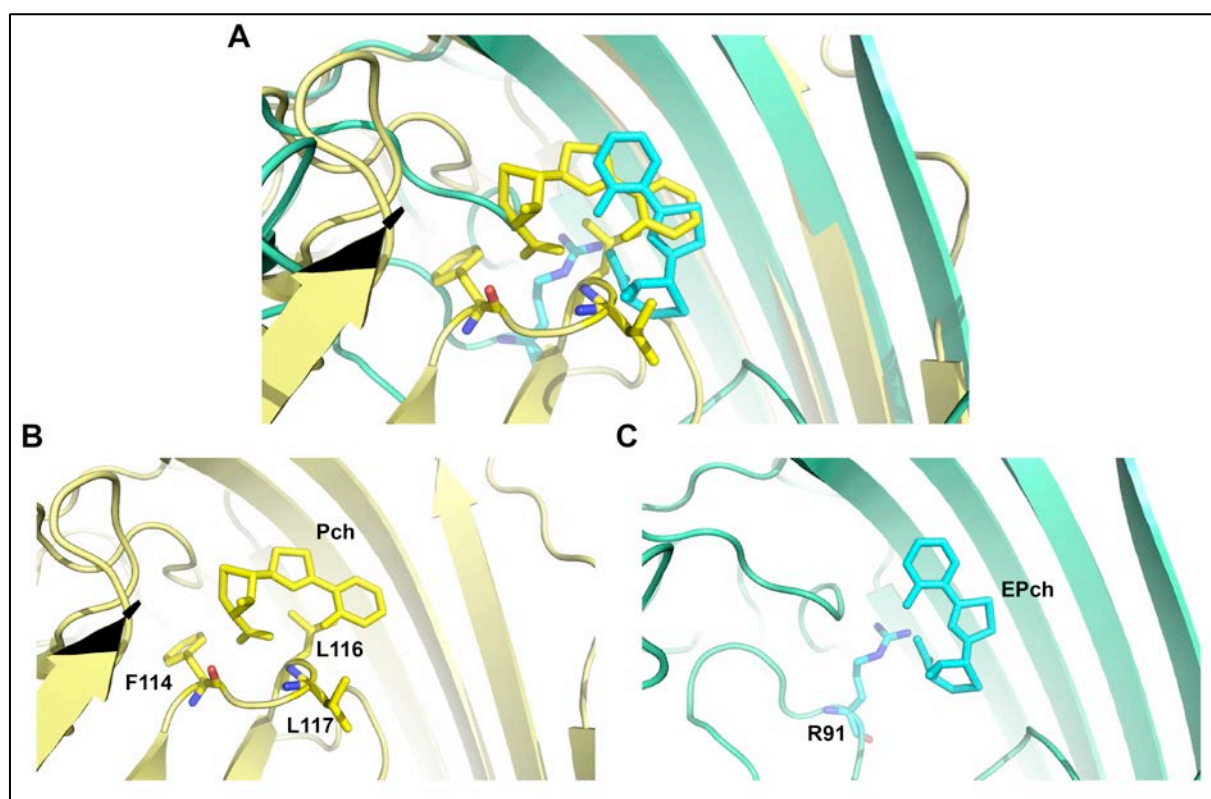


Figure 67 : Superposition des structures FetA-EPch-Fe et FptA-Pch-Fe au niveau de leur poche de liaison

Superposition des structures de FetA-EPch-Fe et FptA-Pch-Fe (PDB 1XKW), au niveau de la poche de liaison du ferri-sidérophore (A). Le complexe Pch-Fe est stabilisé par trois résidus principaux du domaine bouchon : Phe-114, Leu-116 et Leu-117 (B). En revanche, le complexe EPch-Fe est immobilisé par un résidu principal, l'Arg-91 du domaine bouchon (C).

Dans la poche de fixation, le second chélateur de l'atome de fer est exposé au solvant. Dans les deux structures, il est remplacé soit par l'éthylène glycol (FptA-Pch-Fe-EG) soit par le citrate (FetA-EPch-Fe-citrate) qui sont présents dans la condition de cristallisation, à forte concentration. La superposition des complexes chélateurs-fer montrent que le citrate et l'éthylène glycol sont dans des positions opposées, dues à la configuration des centres asymétriques C2'' et C4'' (**Figure 68**).

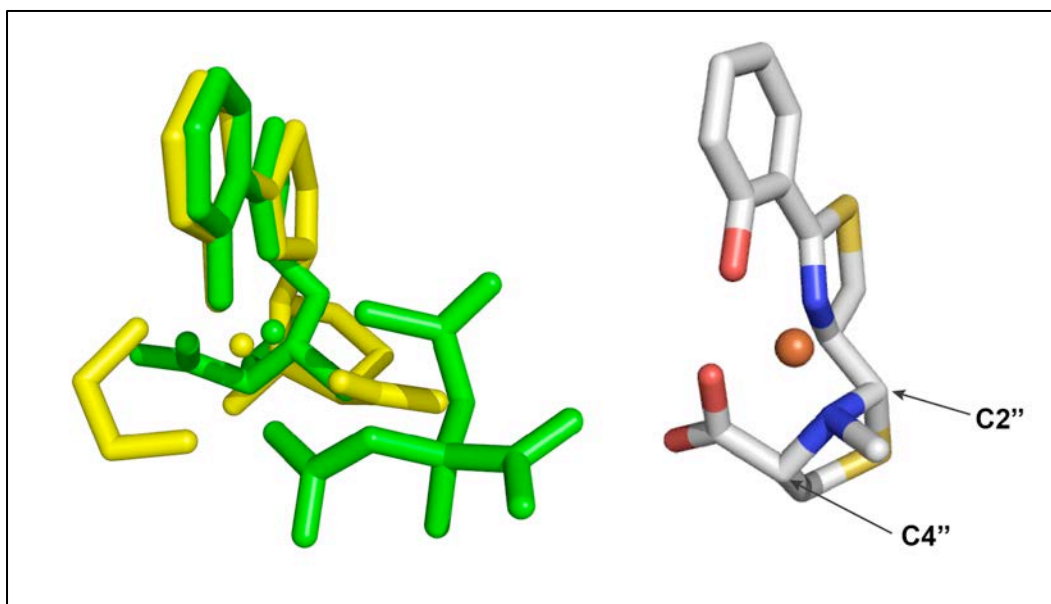


Figure 68 : Superposition des complexes EPch-Fe-citrate et Pch-Fe-EG

Superposition des complexes EPch-Fe-citrate (vert) et Pch-Fe-éthylène glycol (jaune) issus des structures holo de FetA et FptA. Les positions opposées des seconds chélateurs, provenant de la condition de cristallisation, sont imposées par les configurations des deux carbones asymétriques en position C2'' et C4''.

Les expériences de « docking » montrent que les liaisons hydrogène cruciales avec les résidus Leu-116 et Leu-117 de FptA et l'Arg-91 de FetA ne sont plus observées lorsque l'on place le mauvais énantiomère dans la structure du transporteur. Ces résultats sont le reflet d'une haute énantiosélectivité.

4.4 Conclusion

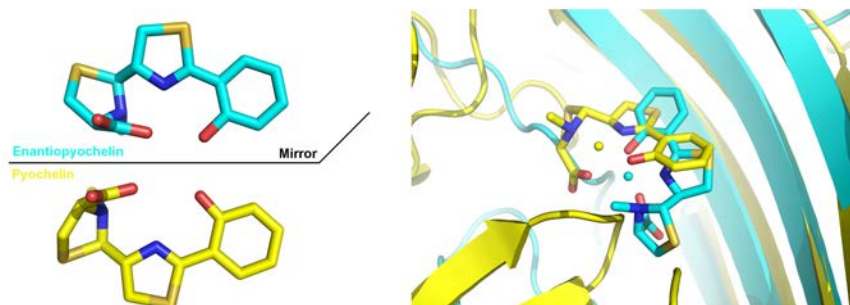
La chiralité des molécules est essentielle dans la chimie du vivant. Plusieurs exemples de stéréospécificité dans le transport du fer par les sidérophores ont déjà été décrits, cependant aucune donnée structurale n'était disponible jusqu'ici pour expliquer cette sélectivité. Ce travail a permis d'étudier la spécificité de reconnaissance de deux énantiomères de la pyochéline par leur TBDT spécifique. Les transporteurs FetA et FptA partagent 25% d'identité de séquence, les poches de fixation des ligands se superposent partiellement et les résidus impliqués présentent les mêmes caractéristiques physico-chimiques. L'analyse des structures de FetA-EPch-Fe et FptA-Pch-Fe montre qu'un seul sidérophore est nécessaire pour la reconnaissance spécifique. Au niveau du sidérophore, la géométrie *cis* des hydrogènes H2'' et H4'' permet d'obtenir une chélation optimale du fer (Hoegy *et al.*, 2009). Les expériences de docking réalisées sur FptA et FetA montrent que la

configuration des centres C2'' et C4'', qui imposent la géométrie de la molécule, permettent une reconnaissance spécifique du ligand, alors que la configuration du centre C4' a peu d'influence. Les expériences de mutagénèse et surtout de « docking » montrent le rôle clé des liaisons hydrogène entre le sidérophore et des résidus spécifiques de chacun des TBDT. Finalement, l'analyse des structures, les expériences de liaison de ligands à l'équilibre et de docking montrent que la spécificité de liaison est basée essentiellement sur le centre C4'' qui porte un groupe carboxyle impliqué dans la formation de liaisons hydrogène avec les résidus clés du domaine bouchon de chacun des TBDT. L'évolution a permis de générer deux systèmes bien distincts probablement pour pallier à la compétition qui existe entre les bactéries pour l'utilisation de sidérophores exogènes. Ces résultats ont été les premiers à mettre en évidence deux transporteurs dont l'énantiosélectivité a été caractérisée au niveau structural.

L'ensemble de ces données a été publié dans le journal ***J. Am. Chem. Soc.*** en 2011 (Publication n°3 (Brillet *et al.*, 2011)), et la structure a été déposée dans la PDB sous le code 3QLB.

4.5 Publication : Brillet *et al.*, 2011, *J Am Chem Soc*

Brillet, K., Reimann, C., Mislin, G. L., Noel, S., Rognan, D., Schalk, I. J., Cobessi, D. Pyochelin enantiomers and their outer membrane siderophore transporters in fluorescent pseudomonads: structural bases for unique enantiospecific recognition. *J Am Chem Soc*, 2011, Vol 133, n° 41, p. 16503-16509.



Pyochelin Enantiomers and Their Outer-Membrane Siderophore Transporters in Fluorescent Pseudomonads: Structural Bases for Unique Enantiospecific Recognition

Karl Brillet,[†] Cornelia Reimann,[‡] Gaëtan L. A. Mislin,[†] Sabrina Noël,[†] Didier Rognan,[§] Isabelle J. Schalk,^{*,†} and David Cobessi^{*,||}

[†]UMR 7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg-CNRS, Irebs—ESBS, Boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France

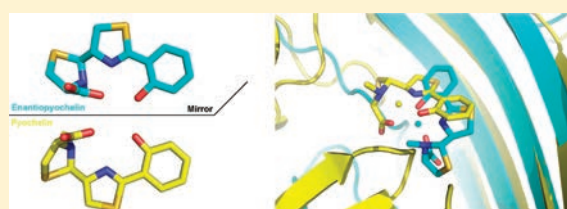
[‡]Département de Microbiologie Fondamentale, Université de Lausanne, Bâtiment Biophore, Quartier UNIL-Sorge, CH-1015 Lausanne, Switzerland

[§]Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR 7200, Université de Strasbourg-CNRS, Faculté de Pharmacie 74, route du Rhin, 67401 Illkirch-Graffenstaden Cédex, France

^{||}Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, Groupe Synchrotron, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Pyochelin (Pch) and enantiopyochelin (EPch) are enantiomeric siderophores, with three chiral centers, produced under iron limitation conditions by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, respectively. After iron chelation in the extracellular medium, Pch–Fe and EPch–Fe are recognized and transported by their specific outer-membrane transporters: FptA in *P. aeruginosa* and FetA in *P. fluorescens*. Structural analysis of FetA–EPch–Fe and FptA–Pch–Fe, combined with mutagenesis and docking studies revealed the structural basis of the stereospecific recognition of these enantiomers by their respective transporters. Whereas FetA and FptA have a low sequence identity but high structural homology, the Pch and EPch binding pockets do not share any structural homology, but display similar physicochemical properties. The stereospecific recognition of both enantiomers by their corresponding transporters is imposed by the configuration of the siderophore's C4'' and C2'' chiral centers. This recognition involves specific hydrogen bonds between the Arg91 guanidinium group and EPch–Fe for FetA and between the Leu117–Leu116 main chain and Pch–Fe for FptA. FetA and FptA are the first membrane receptors to be structurally described with opposite binding enantioselectivities for their ligands, giving insights into the structural basis of their enantiospecificity.



INTRODUCTION

Under conditions of iron limitation, pseudomonads produce and secrete iron-chelating compounds called siderophores into their environment.¹ These compounds bind ferric iron with high affinity and transport it back into the bacterial cells, via specific TonB-dependent transporters (TBDTs).² This uptake process is an energy-consuming mechanism involving interactions between a small periplasmic region of the TBDT called the TonB-box and the TonB–ExbB–ExbD complex located in the inner membrane.³

Pyochelin (Pch) is a siderophore isolated from iron-deficient cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (strain PAO1), and its structure was established as 2'-(2-hydroxyphenyl)-3''-methyl-4'',5'',2'',3'',4'',5''-hexahydro-[4',2'']bithiazolyl-4''-carboxylic acid.^{4,5} Pch presents three chiral centers at the C4', C2'', and C4'' positions and is extracted as a mixture of two interconvertible diastereoisomers whose absolute configuration are 4'R,2''R,4''R (Pch I) and 4'R,2''S,4''R (Pch II).⁶ Iron(III) and zinc(II) were shown to induce a shift from Pch II to Pch I by

converting the S configuration of the C2'' chiral center into the R configuration.^{7,8} Pch chelates Fe³⁺ with a 2:1 (Pch/Fe(III)) stoichiometry,^{6,9} with one molecule of Pch tetradentately coordinated to Fe³⁺ and the second molecule bound bidentately to complete the hexacoordinate octahedral geometry.⁹ Enantiopyochelin (EPch), the enantiomer of Pch, was isolated from *Pseudomonas fluorescens* as a mixture of the two diastereoisomers with absolute configurations established as 4'S,2''S,4''S (EPch I) and 4'S,2''R,4''S (EPch II) (Figure 1).¹⁰ It is likely that the metal-induced epimerization of the C2'' chiral center, observed for the natural Pch diastereoisomers pair, exists also for the two EPch diastereoisomers. For the sake of clarity, in the present article, the terms Pch and EPch thus refer, respectively, to the enantiomers Pch I and EPch I who are predominant in the presence of iron(III).

Received: June 14, 2011

Published: September 08, 2011

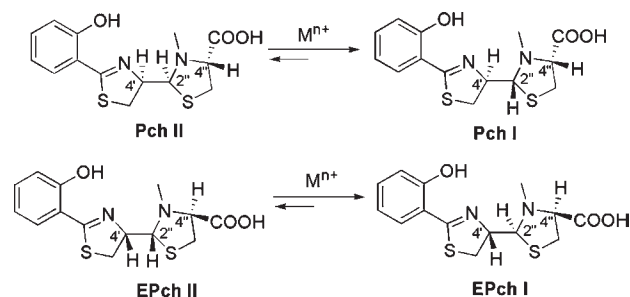


Figure 1. Structures, and absolute configurations, of naturally occurring diastereoisomers of pyochelin (Pch I/Pch II) and enantiopyochelin (EPch I/EPch II) siderophores of, respectively, *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*. The metal-induced epimerization (M^{n+}) on the C2'' position has only been shown for Pch.

Pch–Fe and EPch–Fe are specifically recognized and transported by the outer-membrane transporters FptA expressed by *P. aeruginosa* and FetA expressed by *P. fluorescens*.¹¹ Binding and iron uptake assays showed that FptA recognized ($K_d = 2.5 \pm 1.1$ nM) and transported Pch–Fe but failed to do so with EPch–Fe. Correspondingly, FetA was specific for EPch–Fe ($K_d = 3.7 \pm 2.1$ nM) but did not interact with Pch–Fe. Growth promotion experiments performed under conditions of iron limitation confirmed that FptA and FetA were highly specific for Pch and EPch, respectively, and were able to discriminate the two enantiomers.¹²

The crystal structure of FptA loaded with Pch–Fe (Figure 2A) was solved at 2 Å resolution.¹³ FptA, as all TBDTs, can be divided into two domains: a 22 β -stranded transmembrane barrel which is occluded by the N-terminal domain, also called the plug domain. The Pch–Fe binding pocket is on the extracellular face and is mainly composed of hydrophobic and aromatic residues from the plug and the barrel, consistent with the hydrophobicity of Pch. In the crystal structure, Pch provided a tetradentate coordination of iron and the remaining bidentate coordination was provided by ethylene glycol used in the crystallization condition. This suggested that only one Pch molecule is necessary for recognition by FptA.¹³ In addition, binding assays and docking experiments using synthetic Pch analogues showed that the specific recognition of Pch–Fe by FptA was probably due to the configuration of the C4'' and C2'' chiral centers, and was weakly dependent on the configuration of the C4' carbon atom.¹⁴

In the present study, we solved the three-dimensional (3D) structure of FetA bound to EPch–Fe at 3.2 Å resolution. The structural comparison of FetA and FptA binding pockets combined with molecular biology and docking experiments identified the molecular basis of the enantiospecific recognition in the Pch/FptA and EPch/FetA ligand/receptor pairs. Although stereospecific recognition between chiral siderophores and their outer-membrane receptor has already been described,^{15–22} the enantiospecific discrimination of Pch and EPch by the FptA and FetA receptors is unique in bacterial iron uptake systems.

RESULTS

Construction and in Vivo Activity of Histidine-Tagged FetA. Using our cloning-to-crystallization protocol for TBDTs,²³ we constructed a FetA derivative with a histidine tag in extracellular loop 5 to facilitate subsequent protein purification by

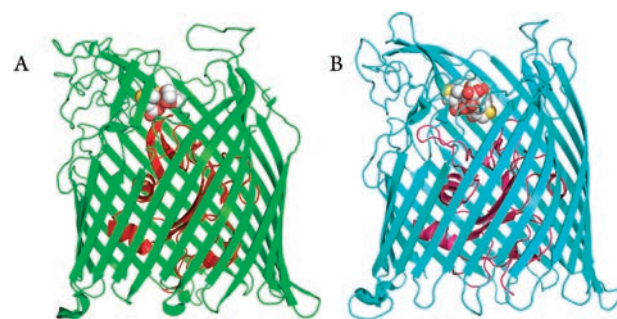


Figure 2. (A) FptA overall structure.¹³ The plug and the β -barrel are shown in red and green color. Pch–Fe–ethylene glycol is displayed in van der Waals spheres. (B) FetA overall structure. The plug and the β -barrel are shown in purple and cyan color. EPch–Fe–citrate is displayed in van der Waals spheres.

affinity. To verify the biological activity of histidine-tagged FetA, we tested whether pME7583, which expresses the tagged *fetA* gene regulated by the *tac* promoter, would be able to complement a *fetA* mutation in *P. fluorescens* for growth promotion by EPch. Supporting Information Figure S1 shows that unmodified M9–glycerol medium contained sufficient iron to support growth of the siderophore-negative *P. fluorescens* strain CHA1085 and its *fetA*-deletion derivative CHA1169. However, no strain could grow when the iron chelator 2,2'-dipyridyl was added to the medium. Addition of EPch restored growth in CHA1085 and in the strain expressing the His-tagged FetA (CHA1169 carrying pME7583), whereas the siderophore did not promote growth in the plasmid-free CHA1169 strain. FetA is thus essential for EPch-mediated iron uptake in *P. fluorescens* as reported previously,^{10,12} and the histidine-tagged FetA protein is active in vivo.

FetA Overall Structure. The asymmetric unit contained two monomers of FetA. Apart from the Ser577–Lys585 loop, they superimposed with a 0.56 Å rmsd value and interacted by the membrane part. FetA is folded into two domains: a C-terminal 22-stranded β -barrel (residues Lys160–Trp698) whose lumen is occluded by an N-terminal plug domain (residues Pro23–Asp159) (Figure 2B). The plug domain is composed by a mixed four-stranded β -sheet and contained two α -helices. It is stabilized into the lumen of the β -barrel by numerous hydrogen bonds and van der Waals contacts. The β -strands of the transmembrane β -barrel are connected by periplasmic turns and long extracellular loops that probably participate to binding and transport of the ligand. The first 22 residues containing the TonB-box and histidines originating from the tag inserted into extracellular loop L5 were not observed in the electron density. One sulfate ion was bound to FetA and stabilized by Arg330, Arg332, and Tyr371. The rmsd values calculated using SSM²⁴ range from 1.40 Å (FetA/FhuA, PDB entry 1BYS²⁵) up to 2.67 Å (FetA/FepA, PDB entry 1FEP²⁶), from comparison with the other TBDTs of known structure.

EPch–Fe Binding Pocket in FetA. A large peak of positive electron density corresponding to the ligand was observed at the FetA extracellular face. Iron was first placed, and using the phases calculated from FetA–Fe, two sulfur atoms were added into the Fo–Fc electron density map after contouring the map beyond 9σ . EPch–Fe was positioned into the electron density based on the sulfur atoms and iron positions, resulting in positive electron density corresponding to a second chelating molecule

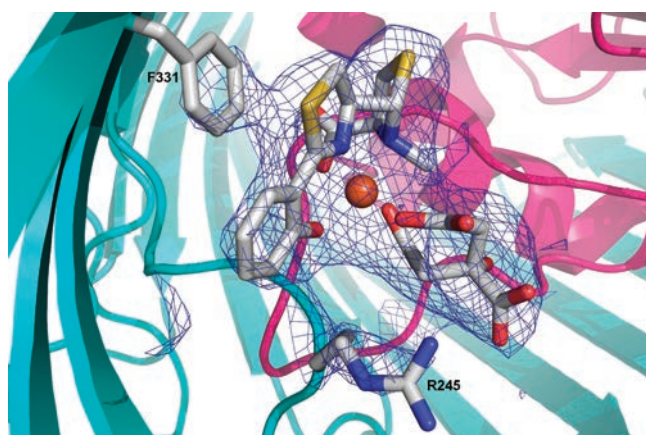


Figure 3. Resulting electron density map of the ligand binding site. FetA is shown as a ribbon. EPch–Fe–citrate is superposed onto the 2FoFc electron density map contoured at 1.2 σ .

(Supporting Information Figure S2). However, this density could not be attributed to another EPch molecule. Citrate, an iron chelating agent, used in the crystallization conditions was added to the model (Figure 3). After refinement, the B-factors average for citrate was higher than that for EPch–Fe (79.90 vs 65.97 Å²; B-factor average EPch–Fe–citrate, 71.15 Å²). This suggests disorder resulting from its solvent exposure and the absence of interaction with FetA, apart from Arg245 (B-factor average, 78.24 Å²; B-factor overall, 70.50 Å²) also exposed to solvent. The electron density of Arg245 was different between both molecules in the asymmetric unit suggesting flexibility.

The binding pocket is located at the extracellular face and is composed mainly of hydrophobic residues from the plug and barrel domain. EPch–Fe is stabilized by several van der Waals interactions (distances less than 4 Å calculated with PDBeMotif²⁷) with Phe92, Gln117, Trp119, Pro244, Arg245, Ser313, Tyr329, Phe331, and Tyr370 whose hydroxyl group is 3.2 Å apart from the sulfur atom of the thiazolin ring (Figure 4 and Supporting Information Table S1).

A hydrogen bond is also observed between the carboxylate group of thiazolidin ring and the Arg91 side chain (Figure 4). Although the Tyr370 hydroxyl group is 3.2 Å apart from the sulfur atom of the thiazolin ring of EPchFe, both entities appear to be not well-oriented to be involved in a hydrogen bond. Arg91 and Tyr370 were mutated to Ala to evaluate their importance in the binding of EPch–Fe. In the case of FetA_{R91A}, this mutation resulted in a loss of binding of EPch–⁵⁵Fe, indicating that Arg91 has a key role in the positioning of the ferrisiderophore into the binding pocket. However, with FetA_{Y370A}, this mutation resulted in only a 3-fold increase in dissociation constant ($K_d = 2.4 \pm 0.4$ nM for FetA and $K_d = 7.5 \pm 0.7$ nM for FetA_{Y370A}), suggesting a less important role for Tyr370. Therefore, there is no other hydrogen bond than that between Arg91/EPch–Fe which may contribute strongly to the overall binding affinity. The other stabilizing contacts are van der Waals interactions between EPch–Fe and several residues of the binding site like Tyr370 (Supporting Information Table S1). The topology of the binding pocket was compared with the structures from PDB using RAS-MOT3D²⁸ and PDBeMotif²⁷ at EBI, and no identical binding site was found in any of the proteins of known structure.

Comparison of FetA with FptA. The structure-based sequence alignment between FetA and FptA showed a sequence

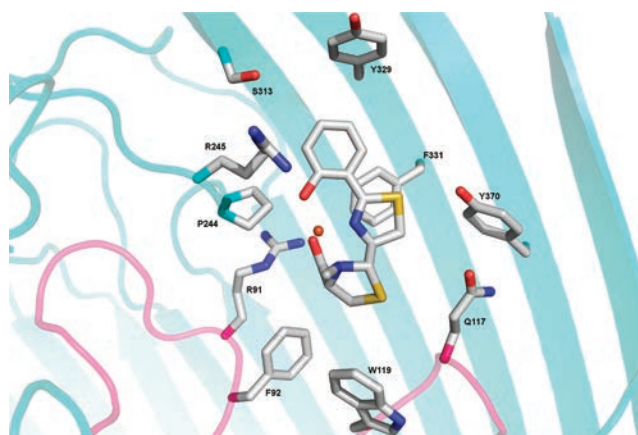


Figure 4. View of the EPch–Fe binding pocket of FetA. EPch–Fe, Arg91, Phe92, Gln117, Trp119, Pro244, Arg245, Ser313, Tyr329, Phe331, and Tyr370 are displayed as sticks. The hydrogen bond between Arg91 and EPch is represented by a dashed line. For clarity, citrate was removed.

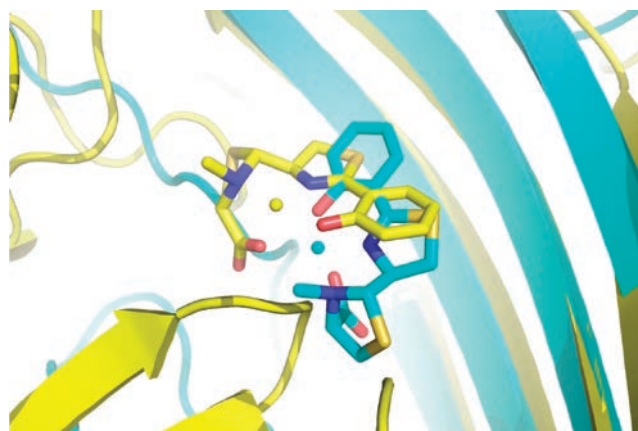


Figure 5. Superimposition of FetA–EPch–Fe and FptA–Pch–Fe showing the location of the ligands. FptA and FetA are colored yellow and cyan, respectively. The Pch and EPch carbon atoms are colored yellow and cyan, respectively.

identity of 25.1% (Supporting Information Figure S3A). FptA (Figure 2A) and FetA (Figure 2B) superimposed with an rmsd value of 1.77 Å (Supporting Information Figure S3, parts B and C), and their PchFe and EPchFe ligands partly overlapped (Figure 5). In both structures, the binding pocket is hydrophobic and delineated by residues from the plug and β -barrel domains, but none of these residues are conserved (Supporting Information Figure S3, parts A and D). Pch–Fe bound to FptA is stabilized by Phe114, Leu116, and Leu117, which belong to an apical loop of the plug domain. In FetA, Arg91 from the first apical loop and Gln117 as well as Trp119 from the second apical loop are part of the binding pocket (Figure 4). Phe331 of FetA superimposes onto Tyr356 of FptA, and Tyr370 located in the β -strand β_9 of FetA superimposed onto Glu395 of FptA, which is involved in the stabilization of PchFe. In both cases, only one Pch–Fe or EPch–Fe molecule is inside the binding pocket and the second iron-chelating molecule originating from the crystallization solutions is always exposed toward the solvent. Ethylene glycol and citrate are bound to Fe instead of Pch and EPch

Table 1. Docking Statistics of Pch–Fe and EPch–Fe to the X-ray Structures of FptA and FetA

ligand	outer-membrane transporter					
	FptA			FetA		
	GOLD score ^a	Tc–IFP ^b	rmsd, Å ^c	GOLD score	Tc–IFP ^d	rmsd, Å ^c
Pch–Fe	53.16	0.81	0.40	46.96	0.55	
EPch–Fe	52.11	0.72		58.96	0.87	1.59

^a Docking score using standard GOLD v5.0⁵⁸ docking settings. ^b Similarity of the protein–ligand interaction fingerprint (expressed by the Tc Tanimoto coefficient) to that of the FptA–Pch–Fe X-ray structure, as measured by the IFP⁶⁰ program. ^c Root-mean-square deviation (heavy atoms) to the X-ray pose of FptA-bound Pch–Fe. ^d Similarity of the protein–ligand interaction fingerprint (expressed by the Tc Tanimoto coefficient) to that of the FetA–EPch–Fe X-ray structure, as measured by the IFP program. ^e Root-mean-square deviation (heavy atoms) to the X-ray pose of FetA-bound EPch–Fe.

because they are in crystallization solutions at concentrations higher than those of EPch or Pch. Since they are also metal chelators, they compete with Pch and EPch for iron binding. Superimposition of EPch–Fe–citrate and Pch–Fe–ethylene glycol showed that citrate and ethylene glycol are in opposite positions to each other, which is due to the configuration of the C2'' and C4'' chiral centers in Pch and EPch (Supporting Information Figure S4). Despite the different amino acid contents of the siderophore binding sites in FetA and FptA, and the different ways of binding the corresponding ferrisiderophore, the 3D physicochemical properties like volume, buriedness, curvature, and balance between hydrophilic and hydrophobic properties of both binding pockets are very similar according to SiteAlign²⁹ (d1 score = 0.58; d2 score = 0.17) and FuzCav³⁰ (similarity = 0.218). This is probably related to the common form and hydrophobicity of the two ligands.

Ligand Docking. Pch–Fe and EPch–Fe could be redocked into the X-ray structures of FptA and FetA with low rms deviations to protein-bound ligand X-ray coordinates and high interaction fingerprint similarity (Table 1). Cross-docking of Pch–Fe in FetA (Figure 6A) and of EPch–Fe in FptA (Figure 6B) led to slightly lower docking scores and much lower interaction fingerprint similarities. In both cases, crucial hydrogen bonds to Leu116 and Leu117 main chain nitrogen atoms (in FptA) or Arg91 side chain (in FetA) could not be found when docking the wrong enantiomer.

DISCUSSION

Although the origin of chirality in biomolecules remains unclear, this structural property is essential to the chemistry of life.³¹ Stereospecific interactions between ligands and receptors are involved in many crucial biological processes. Understanding the structural basis of interactions between proteins and chiral ligands is therefore not only a fascinating topic in the field of protein chemistry but also has tremendous implications in pharmacology and drug design.³²

In this context, we investigated the stereospecific interaction of an enantiomeric ligand pair (Pch and EPch) with their cognate receptors (FptA and FetA). Although FptA and FetA share only 25.1% identical amino acids (Supporting Information Figure S3A), both transporters adopt the classical fold of TBDTs

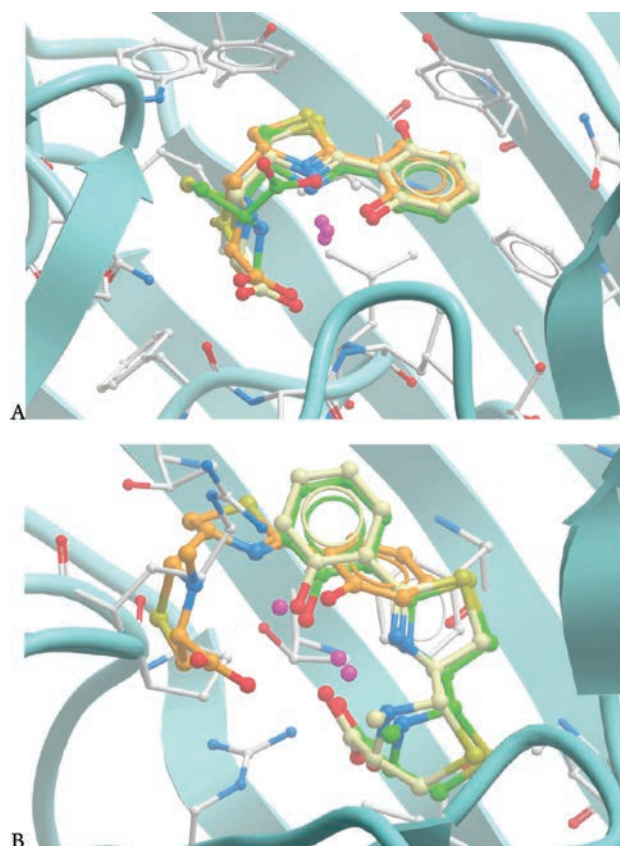


Figure 6. Docking of Pch–Fe and EPch–Fe on FetA (A) and FptA (B) binding sites, respectively. (A) Predicted binding mode of Pch–Fe (orange carbon atoms) and EPch–Fe (green carbon atoms) to the X-ray structure of FptA (cyan ribbons). The X-ray pose of FptA-bound Pch–Fe (yellow carbon atoms) is shown for comparison. FptA residues lining the Pch binding site are displayed as white carbon atoms. Iron atoms are indicated by magenta balls. Nitrogen, oxygen, and sulfur atoms are colored in blue, red, and yellow, respectively. (B) Predicted binding mode of Pch–Fe (orange carbon atoms) and EPch–Fe (green carbon atoms) to the X-ray structure of FetA (cyan ribbons). The X-ray pose of FetA-bound EPch–Fe (yellow carbon atoms) is shown for comparison. FetA residues lining the EPch binding site are displayed as white carbon atoms. Iron atoms are indicated by magenta balls. Nitrogen, oxygen, and sulfur atoms are colored in blue, red, and yellow, respectively.

(Figure 2). In both cases, only one siderophore molecule was observed in the electron density map at the extracellular face of the receptor. EPch and Pch thus provide the tetradentate coordination to iron and the remaining two coordination bonds are ensured by another ligand. In the crystal structures of FptA¹³ and FetA (the present study), this ligand originated from the crystallization conditions as the binding pockets of both receptors occupied by their cognate ferrisiderophore are accessible to the solvent. In vivo, this ligand may be a second siderophore or another chelator present in the environment. Indeed, we previously showed that a mixed complex of Pch, iron, and cepa-bactin³³ (a siderophore produced by *Burkholderia cepacia*) can bind to FptA.¹⁴ Therefore, only one Pch or EPch molecule is likely to be necessary for recognition by FptA or FetA, respectively.

The main differences between FetA and FptA are the amino acid composition of the ferrisiderophore binding pocket and their interactions with Pch–Fe or EPch–Fe. Despite these

differences, both binding sites were seen to partly overlap, when FetA was superimposed onto FptA, and they have similar 3D physicochemical properties and a common form. Due to the opposite configuration of the two chiral centers C2'' and C4'', EPch-Fe and Pch-Fe are observed in different orientations within the binding pockets (Figure 4). However, in both cases, the carboxylate group of the siderophores interacted via hydrogen bonds with residues of the plug domain: the Arg91 guanidinium group in FetA and the Leu116 and Leu117 nitrogen in FptA.¹³ Mutagenesis experiments and docking assays confirmed that these hydrogen bonds are essential for the specific interactions between the two siderophores and their receptor. Despite the similar physicochemical properties of the binding pocket, two different interaction networks therefore allow FetA and FptA to discriminate the enantiomeric ferrisiderophores where configuration of the C2'' and C4'' chiral centers is crucial for receptor specificity. Indeed, the C4'' chiral center bears the carboxylate group involved in the hydrogen bond for the siderophore binding to its specific receptor, and a cis geometry for the two hydrogen atoms on the C4'' and C2'' position is necessary for an optimal iron(III) chelation.

During the course of evolution, two transporters have probably been selected with low sequence identity but a similar structure to specifically recognize enantiomers through different interactions in similar binding pockets. Enantiospecificity is also observed in other proteins involved in the regulation of the Pch/EPch-dependent iron uptake systems.³⁴ EPch-Fe and Pch-Fe induce the expression of their biosynthesis genes through interactions with PchR, an AraC-type transcriptional regulator. Recent studies showed that the recognition of EPch and Pch by their respective PchR regulator is highly enantiospecific.³⁴

Stereospecificity of siderophore-dependent iron uptake has been previously reported for parabactin, rhodotorulic acid, rhizoferrin, ferrichrome, and enterobactin.^{15–22} In this context, the polycarboxylate siderophore, rhizoferrin, is of particular interest as it naturally exists as two biologically relevant enantiomers. (S,S)-rhizoferrin is synthesized by several strains of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) *picketii*, whereas (R,R)-rhizoferrin is produced by *Zygomycetes* fungi. In *Ralstonia*, rhizoferrin-dependent iron uptake transports both iron-loaded enantiomers with the same efficiency. In contrast, rhizoferrin-mediated iron uptake appears to be partially enantioselective in the fungus *Rhizopus* where iron uptake with (R,R)-rhizoferrin is twice as efficient as with (S,S)-rhizoferrin.²² A similar comparative study on ferrichrome-dependent iron uptake in *Escherichia coli* and certain fungi (*Neurospora*, *Penicillium*) showed that fungi preferably used only one siderophore enantiomer, whereas the bacterium could use both optical antipodes of ferrichrome.²⁰ Prokaryotic siderophore-dependent iron uptake systems therefore appear poorly stereo- or enantiospecific, whereas the corresponding eukaryotic iron transport pathways have a higher stereospecificity.²¹

To date, no crystallographic data of these bacterial and fungal receptors are available which could help to understand the structural basis of the differences in specificity. A survey of prokaryotic and eukaryotic protein–ligand complexes in the Protein Data Bank did not reveal a single pair of enantiomeric ligands cocrystallized with two different membrane receptors. Although there are drugs (e.g., butaclamol) with inverted eudismic ratio (ratio of the affinity values of both stereoisomers) to different G protein-coupled receptors,³⁵ their binding sites are very similar.³⁶ Likewise, some terpenes (e.g., limonene, carvone) exhibit stereospecific

odors by binding to different olfactory receptors.³⁷ However, no structural data are available to describe the structural basis of stereospecificity in these systems. Thus, FetA from *P. fluorescens* and FptA from *P. aeruginosa* are, to our knowledge, unique examples of two membrane transporters structurally characterized with a strictly opposite binding enantioselectivity due to non-identical binding pockets.

EXPERIMENTAL METHODS

Construction of Plasmids and Gene Replacement Mutants. DNA cloning and plasmid preparations were carried out according to standard procedures.³⁸ Strains, plasmids, and oligonucleotides used in this work are listed in Supporting Information Table S2. Constructs generated by polymerase chain reaction (PCR) were verified by sequence analysis with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit and an ABI-PRISM 373 automatic sequencer from Applied Biosystems. A modified *fetA* gene specifying a receptor protein with an internal histidine tag was constructed by overlap extension PCR and cloned under the IPTG-inducible *tac* promoter of plasmid pME6032 as follows. Two PCR fragments of 0.95 kb and 1.35 kb carrying the 3' and 5' parts of *fetA*, respectively, were generated from chromosomal DNA of *P. fluorescens* CHA0 using the primer pairs *fetA*His-1/*fetA*His-2 and *fetA*His-3/*fetA*His-4. The two PCR fragments were then combined by a second PCR cycle using the primers *fetA*His-2 together with *fetA*His-3. This generated a 2.3 kb fragment which was subsequently cleaved with *Eco*RI and *Bgl*II and cloned into the same sites on pME6032 giving pME7583. The insert was verified by sequence analysis which confirmed the presence of five additional histidine residues downstream of the already existing histidine at position 387. Gene replacement mutants of *P. fluorescens* were obtained with suicide plasmids as described previously.^{39,40} The suicide plasmid pME9605, used to generate a 882 bp in-frame deletion in the pyoverdine biosynthesis gene *pvdF*, was constructed as follows. Two PCR fragments were generated from chromosomal DNA of *P. fluorescens* CHA0 using the primer pairs PFL4090-1/PFL4090-2 and PFL4090-3/PFL4090-4. The two fragments were then joined by overlap extension PCR using PFL4090-1 and PFL4090-4. This generated a 1.5 kb fragment which was trimmed with *Bam*HI and *Eco*RI and subsequently cloned into the suicide vector pME3087 giving pME9605. This construct was then mobilized from *E. coli* DH5 α to *P. fluorescens* CHA1084 (Δ *pchDHIEFKCBA*) using the helper plasmid pME497 and chromosomally integrated, with selection for Tc (100 μ g mL⁻¹) and Cm (10 μ g mL⁻¹). Plasmid excision via a second crossing-over was obtained through enrichment for Tc-sensitive cells as described.^{39,40} Among these, mutants with deletions in *pvdF* were identified by PCR and named CHA1239 (Δ *pchDHIEFKCBA* Δ *pvdF*). The two CHA1239 derivatives CHA1343 (Δ *pvdF* Δ *pchDHIEFKCBA* *fetA*_{R91A}) and CHA1344 (Δ *pvdF* Δ *pchDHIEFKCBA* *fetA*_{Y370A}) with single amino acid changes in *fetA* were obtained in a similar way using the suicide plasmids pME9644 and pME9645, respectively. Construction of pME9644 was done with the primer pairs R91-1/R91-2 and R91-3/R91-4. Fragment joining by overlap extension PCR involved the primer pair R91-1/R91-4 and cloning into pME3087 was done with *Bam*HI and *Hind*III. Overlap extension PCR was also used to generate pME9645, the primers involved were Y370-1, Y370-2, Y370-3, and Y370-4. Again, cloning into pME3087 was done with *Bam*HI and *Hind*III. Mutants were generated by gene replacement as described above and identified by sequencing the chromosomal *fetA* gene amplified by PCR.

Culture Conditions. Bacteria were routinely grown on nutrient agar and in nutrient yeast broth or LB^{38,41} at 37 °C (*E. coli*) or 30 °C (*P. fluorescens*). Siderophore-mediated growth promotion assays were carried out in minimal medium M9³⁸ with 0.5% glycerol as a carbon source as described.¹² Iron limitation was achieved in this medium with 500 μ M 2,2'-dipyridyl. For expression and purification

of histidine-tagged FetA, bacteria were grown in LB medium amended with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Where necessary, tetracycline (Tc) was added to the growth media at 25 μ g/mL for *E. coli* and 100 μ g/mL for *P. fluorescens*. To counterselect *E. coli* donors in gene replacement experiments, chloramphenicol (Cm) was added at 10 μ g/mL. Mutant enrichment occurred with Tc at 20 μ g/mL and cycloserine at 50 mg/mL.

Ligand-Binding Assays Using ^{55}Fe (Supporting Information Figure S5). EPch- ^{55}Fe was prepared as described previously.¹² To determine the apparent dissociation constants in vivo of EPch- ^{55}Fe binding to FetA and FetA mutants, CHA1085, CHA1343, and CHA1344 cells were washed twice with an equal volume of fresh medium and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at an OD_{600nm} of 1.5. The cells were then incubated at 0 °C to avoid any iron uptake for 1 h in a final volume of 500 μ L in the presence of various concentrations (0.1–600 nM) of siderophore- ^{55}Fe . Incubations were stopped by centrifugation at 12 000 g (4 °C) for 2 min. The supernatant containing the unbound siderophore- ^{55}Fe was removed, and the tubes containing the cell pellet were counted for radioactivity in a scintillation cocktail.⁴² The experiment was repeated with CHA1169 to estimate nonspecific interactions of EPch- ^{55}Fe with the tubes or with the cells.

FetA Purification, Crystallization, and Data Collection. FetA was overexpressed in *P. fluorescens* and purified as described for FauA and ShuA.^{23,43} The pure fractions containing FetA were pooled, dialyzed with 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.75% C8E5 (Bachem), and concentrated to 10 mg/mL. EPch was solubilized in methanol at a concentration of 74 mM, and FeCl₃ was added with a EPch/Fe ratio of 2:1. Prior to crystallization, EPch-Fe was added to FetA at a final concentration of 1.22 mM. Initial crystallization experiments were performed using the MbClass suite and MbClassII suite from QIAGEN, and improvements of the crystallization conditions were performed in LinbroPlates using the sitting-drop vapor-diffusion method at 293 K. FetA-EPch-Fe (10 mg/mL) was crystallized in 14% PEG1500, 0.1 M lithium sulfate, 0.1 M sodium citrate pH 5.6, 20% glycerol. The diffraction data were collected using synchrotron radiation at ESRF on BM30A⁴⁴ using an ADSC Q315r CCD detector (λ = 0.95024 Å). The data were collected using one crystal at 100 K, integrated and scaled at 3.25 Å resolution using XDS.⁴⁵ Crystals belong to the C222₁ space group (Table 2).

Structure Resolution. The phase problem was solved by molecular replacement using PHASER⁴⁶ from CCP4⁴⁷ and FhuA (PDB entry 1BY3¹⁷) as molecular model after replacing the nonconserved residues by alanine residues and after removing the nonaligned parts of sequences. The model was rebuilt at 3.25 Å resolution using COOT⁴⁸ and refined by energy minimization and molecular dynamic using Phenix⁴⁹ and by restrained maximum-likelihood least-squares techniques in REFMAC5⁵⁰ from CCP4.⁴⁷ During refinement of the FetA-EPch-Fe complex in which noncrystallographic symmetry was used, EPch-Fe and sulfate ions were added. Finally, citrate was added into a large peak of positive electron density close to the ferric iron. At the end of the refinement the *R* and *R*_{free}⁵¹ factors were 21.4% and 25.9%, respectively (Table 2). The model was checked using PROCHECK,⁵² WHATCHECK,⁵³ and MOLPROBITY.⁵⁴ All the drawing were prepared using Pymol.⁵⁵

Ligand Docking. The starting conformation of Pch-Fe and EPch-Fe were obtained by converting SymyxDraw⁵⁶ two-dimensional (2D) sketches into 3D coordinates using the Corina 3.10 program.⁵⁷ Automated docking of manually ionized ligands to the FptA X-ray structure (PDB code 1XKW) and the herein described FetA structure was done using standard settings of the GOLD v5.0 program.⁵⁸ All organic molecules were first removed from the protein structure, and hydrogen atoms automatically added using the Biopolymer module of the SYBYL-X1.2 package.⁵⁹ The active site used for sampling the

Table 2.^a

Diffraction Data	
resolution (Å)	48.57–3.26 (3.34–3.26)
wavelength (Å)	0.95024
unit cell (Å)	<i>a</i> = 155.07 <i>b</i> = 170.83 <i>c</i> = 232.62
space group	C222 ₁
no. of unique reflections	48366 (3436)
completeness (%)	99.3 (96.4)
redundancy	8.2 (8.1)
<i>R</i> _{sym} (%) ^b	13.7 (65.9)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	16.11 (3.57)
structure refinement	48.57–3.26 (3.26–3.34)
<i>R</i> _{cryst} (%) ^c	21.4 (29.6)
<i>R</i> _{free} (%)	25.9 (39.6)
<i>F</i> / σ <i>F</i>	0
no. of protein atoms	10449
no. of ligand atoms	80
rms deviation of bond lengths (Å)	0.017
rms deviation of bond angles (deg)	2.079
av B factor (Å ²)	70.49

^a Numbers between parentheses indicate the value in the outer resolution shell. The *R*_{free} was calculated using 5% reflections, which were kept apart from the refinement during the whole process. rms = root-mean-square. ^b *R*_{sym} = $\sum \sum |I_i - I_m| / \sum \sum I_i$, where *I*_i is the intensity of the measured reflection and *I*_m is the mean intensity of this reflection. ^c *R*_{cryst} = $\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$. *R*_{free} is the same as *R*_{cryst} but calculated for 5% data omitted from the refinement.

conformational space of the ligand was defined by a 10 Å radius sphere centered on the center of mass of Pch-Fe (FptA) and EPch-Fe (FetA). To further speed up the calculation, docking was stopped when the top three ranked solutions were within 1.5 Å rmsd. If this criterion is met, we can assume that these top solutions represent a reproducible pose for the ligand. A maximum of 30 poses were saved for each ligand in standard mol2 format and ranked by decreasing GOLDScore. For each pose, an interaction fingerprint was computed using the IFP program⁶⁰ and compared to that of the FptA-Pch and FetA-EPch X-ray structures, respectively, using a standard Tanimoto coefficient.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. One table giving distances between EPchFe and FetA; one table describing all bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides used in this study; growth curves showing that the His-tagged FetA receptor is active in iron uptake; a sequence alignment deduced from the superposition of FetA/FptA; two views of superimposition of FetA onto FptA, a superimposition of binding pockets from FetA and FptA from the superimposition of FetA onto FptA, a superimposition of EPch-Fe-citrate and Pch-Fe-ethylene glycol from FetA-EPch-Fe-citrate and FptA-Pch-Fe-ethylene glycol, and a Scatchard analysis of the binding of EPch- ^{55}Fe to FetA in vivo. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

isabelle.schalk@unistra.fr; david.cobessi@ibs.fr

■ ACKNOWLEDGMENT

We thank Jeremy Perrin for his help with mutant construction. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the association Vaincre la Mucoviscidose (French Association against cystic fibrosis), the Agence Nationale de Recherche (Grant ANR-08-BLAN-0315-01), and the Swiss National Science Foundation for Scientific Research (project 31003A_132998).

■ REFERENCES

- (1) Hider, R. C.; Kong, X. L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (2) Noinaj, N.; Guillier, M.; Barnard, T. J.; Buchanan, S. K. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 43–60.
- (3) Postle, K.; Larsen, R. A. *Biometals* **2007**, *20*, 453–465.
- (4) Cox, C. D. *J. Bacteriol.* **1980**, *142*, 581–587.
- (5) Cox, C. D.; Rinehart, K. L., Jr.; Moore, M. L.; Cook, J. C., Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 4256–4260.
- (6) Ankenbauer, R. G.; Toyokuni, T.; Staley, A.; Rinehart, K. L., Jr.; Cox, C. D. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5344–5351.
- (7) Rinehart, K. L.; Staley, A. L.; Wilson, S. R.; Ankenbauer, R. G.; Cox, C. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2786–2791.
- (8) Ino, A.; Murabayashi, A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1897–1902.
- (9) Tseng, C. F.; Burger, A.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J.; Yu, S. S.-F.; Chan, S. I.; Abdallah, M. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 419–432.
- (10) Youard, Z. A.; Mislin, G. L. A.; Majcherczyk, P. A.; Schalk, I. J.; Reimann, C. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35546–35553.
- (11) Youard, Z. A.; Wenner, N.; Reimann, C. *Biometals* **2011**, *24*, 513–522.
- (12) Hoegy, F.; Lee, X.; Noël, S.; Mislin, G. L. A.; Rognan, D.; Reimann, C.; Schalk, I. J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14949–14957.
- (13) Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 893–904.
- (14) Mislin, G. L. A.; Hoegy, F.; Cobessi, D.; Poole, K.; Rognan, D.; Schalk, I. J. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1437–1448.
- (15) Bergeron, R. J.; Dionis, J. B.; Elliott, G. T.; Kline, S. J. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 7936–7944.
- (16) Bergeron, R. J.; Xin, M. G.; Weimar, W. R.; Smith, R. E.; Wiegand, J. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2469–2478.
- (17) Drechsel, H.; Jung, G.; Winkelmann, G. *Biometals* **1992**, *5*, 141–148.
- (18) Muller, G.; Isowa, Y.; Raymond, K. N. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13921–13926.
- (19) Neilands, J. B.; Erickson, T. J.; Rastetter, W. H. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 3831–3832.
- (20) Winkelmann, G. *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 43–46.
- (21) Winkelmann, G.; Braun, V. *FEMS Microbiol. Lett.* **1981**, *11*, 237–241.
- (22) Münzinger, M.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H.; Drechsel, H.; Heymann, M.; Winkelmann, G.; Meyer, J.-M. *Biometals* **1999**, *12*, 189–193.
- (23) Brillet, K.; Meksem, A.; Lauber, E.; Reimann, C.; Cobessi, D. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2009**, *65*, 326–331.
- (24) Krissinel, E.; Henrick, K. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2004**, *60*, 2256–2268.
- (25) Locher, K. P.; Rees, B.; Koebnik, R.; Mitschler, A.; Moulinier, L.; Rosenbusch, J. P.; Moras, D. *Cell* **1998**, *95*, 771–778.
- (26) Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.; Chakraborty, R.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 56–63.
- (27) Golovin, A.; Henrick, K. *BMC Bioinf.* **2008**, *9*, 312.
- (28) Magis, C.; Gasparini, D.; Lecoq, A.; Le Du, M. H.; Stura, E.; Charbonnier, J. B.; Mourier, G.; Boulain, J. C.; Pardo, L.; Caruana, A.; Joly, A.; Lefranc, M.; Masella, M.; Menez, A.; Cuniasse, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16190–16205.
- (29) Schalon, C.; Surgand, J.-S.; Kellenberger, E.; Rognan, D. *Proteins* **2008**, *71*, 1755–1778.
- (30) Weil, N.; Rognan, D. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 123–135.
- (31) Barron, L. D. *Space Sci. Rev.* **2008**, *135*, 187–201.
- (32) Lu, H. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2007**, *3*, 149–158.
- (33) Klumpp, C.; Burger, A.; Mislin, G. L.; Abdallah, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1721–1724.
- (34) Youard, Z. A.; Reimann, C. *Microbiology* **2010**, *156*, 1772–1782.
- (35) Froimowitz, M.; Råmsby, S. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1707–1714.
- (36) Surgand, J. S.; Rodrigo, J.; Kellenberger, E.; Rognan, D. *Proteins* **2006**, *62*, 509–538.
- (37) Joshi, D.; Völkl, M.; Shepherd, G. M.; Laska, M. *Chem. Senses* **2006**, *31*, 655–664.
- (38) Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Lab Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- (39) Schnider, U.; Keel, C.; Blumer, C.; Troxler, J.; Défago, G.; Haas, D. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5387–5392.
- (40) Laville, J.; Blumer, C.; Von Schroetter, C.; Gaia, V.; Defago, G.; Keel, C.; Haas, D. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3187–3196.
- (41) Stanisich, V. A.; Holloway, B. W. *Genet. Res.* **1972**, *19*, 91–108.
- (42) Hoegy, F.; Celia, H.; Mislin, G. L.; Vincent, M.; Gallay, J.; Schalk, I. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20222–20230.
- (43) Cobessi, D.; Meksem, A.; Brillet, K. *Proteins* **2010**, *78*, 286–294.
- (44) Roth, M.; Carpentier, P.; Kaikati, O.; Joly, J.; Charraut, P.; Pirocchi, M.; Kahn, R.; Fanchon, E.; Jacquamet, L.; Borel, F.; Bertoni, A.; Israel-Gouy, P.; Ferrer, J. L. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2002**, *58*, 805–814.
- (45) Kabsch, W. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795–800.
- (46) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- (47) Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1994**, *50*, 760–763.
- (48) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2004**, *60*, 2126–2132.
- (49) Adams, P. D.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Hung, L. W.; Loerger, T. R.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Read, R. J.; Sacchettini, J. C.; Sauter, N. K.; Terwilliger, T. C. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2002**, *58*, 1948–1954.
- (50) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1997**, *53*, 240–255.
- (51) Brunger, A. T. *Nature* **1992**, *355*, 472–475.
- (52) Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- (53) Hooft, R. W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E. E. *Nature* **1996**, *381*, 272.
- (54) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2010**, *66*, 12–21.
- (55) Delano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; DeLano Scientific: Palo Alto, CA, 2002.
- (56) *SymyxDraw*; Accelrys Inc.: San Diego, CA, 2011.
- (57) Sadowski, J.; Schwab, C. H. *Computational Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; Bultinck, P., De Winter, H., Langenaeker, W., Tollenaere, J. P., Eds.; Dekker Inc.: New York, 2004; pp 151–212.
- (58) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. *Proteins* **2003**, *52*, 609–623.
- (59) SYBYL-X 1.2; Tripos International: St. Louis, MO, 2011.
- (60) Marcou, G.; Rognan, D. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 195–207.

5 FpvCDEF, un transporteur ABC impliqué dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*

5.1 Introduction

Depuis 2011, je m'intéresse à une autre famille de transporteurs : les transporteurs ABC. Ce type de protéines intervient en effet dans le transport du fer à travers la membrane interne des bactéries Gram-négatives, pour les voies d'acquisition du fer utilisant les sidérophores. Chez *E. coli*, ces protéines transportent les complexes sidérophores-fer à travers la membrane cytoplasmique et le fer se dissocie ensuite du chélateur dans le cytoplasme bactérien. Pour la voie Pvd chez *P. aeruginosa*, le scénario est différent. Il a été clairement montré que le fer se dissocie de la Pvd dans le périplasme (Schalk *et al.*, 2002 ; Greenwald *et al.*, 2007 ; Hannuer *et al.*, 2012a). Le fer sans sidérophore est ensuite transporté vers le cytoplasme. Au laboratoire, nous supposons que FpvCDEF, composé d'une perméase FpvE, d'une ATPase FpvD et de deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF, jouerait ce rôle de transporteur du fer vers le cytoplasme. Cependant, la délétion de ces quatre gènes affecte également la dissociation périplasmique du complexe Pvd-Fe. Il est également intéressant de remarquer que FpvC appartient à la famille TroA capable de lier les sidérophores et les cations divalents. De son côté, FpvF appartient à la famille des protéines capables de chélater les ferri-sidérophores. Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle de FpvCDEF dans le mécanisme de dissociation de Pvd-Fe dans le périplasme bactérien d'une part et dans le transport du fer vers le cytoplasme d'autre part. Dans ce contexte, j'ai étudié la capacité des protéines périplasmiques FpvC et FpvF à lier les complexe Pvd-Fe, le fer et l'apo-Pvd.

5.2 Approches expérimentales

Les gènes *fpvCDEF* (PA2407-10) appartiennent au locus pyoverdine. D'après l'analyse des séquences, le gène *fpvD* (PA2408) coderait pour une ATPase et *fpvE* (PA2409) pour une perméase d'un transporteur ABC. Les deux gènes *fpvC* (PA2407) et *fpvF* (PA2410) coderaient pour des protéines de liaison périplasmiques appartenant à deux familles différentes. Un alignement de séquence a été réalisée, par le Dr Laurent GUILLON, pour vérifier l'appartenance de FpvC et FpvF à cette

superfamille. Grâce au serveur *SignalP 4.1* (Petersen *et al.*, 2011), l'analyse des séquences de ces gènes m'a permis de définir et de localiser la présence d'une séquence signal pour les protéines FpvC et FpvF, ainsi que la masse molaire attendue pour les deux protéines matures grâce à l'application *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005).

Des expériences de pharmacologie, permettant de visualiser le transport et l'accumulation du ^{55}Fe , ont été réalisées sur différents mutants (PAO6383, PAS158, PAS158(pMH3L), PAOpvdFfpvA). En parallèle, des mesures de dissociation du complexe Pvd-Fe ont été menées sur les différentes souches par spectrofluorimétrie. L'objectif était de vérifier l'effet de la délétion des gènes *fpvCDEF* sur le mécanisme global du transport du fer par la voie pyoverdine, chez *P. aeruginosa*. Ces expériences ont été réalisées au laboratoire par Mme Françoise HOEGY.

L'étude des interactions des protéines périplasmiques avec le fer, la Pvd ou le complexe Pvd-Fe a été réalisée *in-vitro*. Pour cela, j'ai tout d'abord mis au point une méthode de production et de purification des protéines FpvC et FpvF. FpvC a été purifiée en deux étapes, sur une colonne échangeuse d'anions de type Source S suivie d'une gel filtration sur une colonne Superdex 200 10/300 GL. FpvF a été purifiée sur une colonne d'affinité HisTrap FF suivie d'une colonne échangeuse d'anions HiTrap Q XL. Après élution, les protéines ont été concentrées par ultrafiltration. Pour les analyses en spectrométrie de masse, j'ai effectué un échange de tampon par ultrafiltration contre une solution d'acétate d'ammonium 100 mM pH 6,5. Ces protocoles de purification m'ont permis d'obtenir de très bon niveau de pureté (**Figure 69**), avec ces échantillons des anticorps polyclonaux ont été produits par la plateforme de l'IGBMC. Grâce à ces anticorps, j'ai effectué l'ensemble des analyses par immunodétection, notamment les expériences de pontage chimique réalisées *in-vivo*, en présence de formaldéhyde 1% (v/v).

Pour vérifier que FpvC et FpvF interagissent, j'ai expérimenté plusieurs approches telles que l'électrophorèse horizontale en conditions natives sur gel d'acrylamide (Choul-Li *et al.*, 2008), la co-immunoprécipitation ou l'analyse sur colonne de gel filtration. Ces techniques ne m'ayant pas permis de visualiser clairement l'interaction entre ces deux protéines, je me suis orienté vers une analyse en spectrométrie de masse en conditions natives et en conditions dénaturantes. J'ai réalisé des tests d'interaction des deux protéines en présence de Pvd, Pvd-Fe ou

Fe^{3+} . Toutes ces analyses ont été accomplies grâce à une collaboration fructueuse avec le Dr Adeline PAGE et Mr Frank RUFFENACH (plateforme de protéomique du CEBGS).

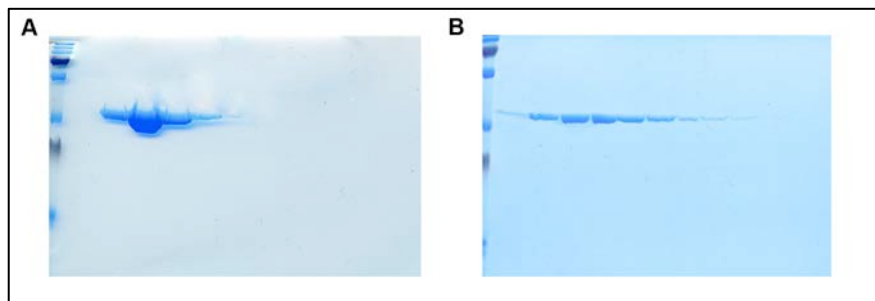


Figure 69 : Purification des protéines FpvC et FpvF

Analyse des fractions d'élution sur gel SDS-PAGE 12% après purification de la protéine FpvC sur colonne Superdex 200 10/300 GL (A), et des fractions d'élution après purification de la protéine FpvF sur colonne HiTrap Q XL (B). La révélation a été effectuée par coloration au bleu de Coomassie.

5.3 Résultats

L'alignement de séquences des protéines FpvC et FpvF, réalisé avec CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007) montre que FpvC appartient à la superfamille TroA. La séquence native de la protéine FpvC laisse apparaître quatre résidus conservés : His-77, His-147, His-213, Asp-290. Pour les protéines TroA, ZnuA et MntA, ces résidus se situent au niveau d'une fente entre les deux domaines globulaire de la protéine et sont impliqués dans la liaison d'ions métalliques (**Figure 70A**).

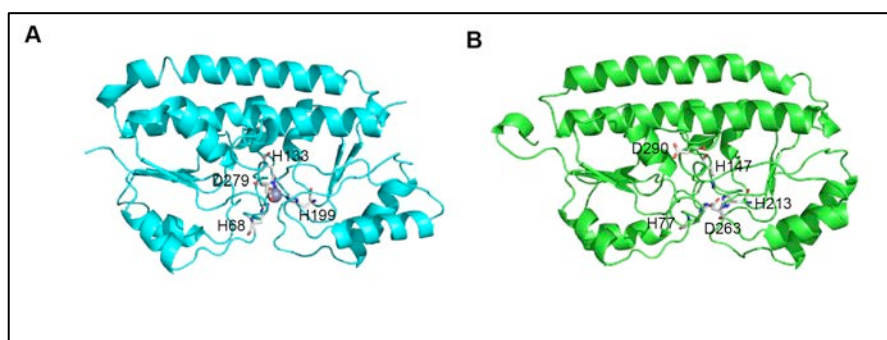


Figure 70 : Représentation de la structure de TroA et prédiction de la structure de FpvC

(A) Représentation de la structure de la protéine TroA (cyan) en complexe avec un atome de zinc, représenté en sphère de van der Waals (gris). Les résidus His-68, His-133, His-199 et Asp-279, impliqués dans la chélation de l'ion métallique, sont représentés sous forme de bâtonnets. (B) Représentation d'une prédiction de structure de la protéine périplasmique FpvC de *P. aeruginosa* (vert). Les résidus His-77, His-147, His-213 et Asp-290, conservés au niveau de l'alignement de séquences, sont représentés sous forme de bâtonnets. Il semblerait cependant que l'Asp-263 soit le 4^{ème} résidu du site de liaison.

A la vue de cet alignement de séquence, j'ai produit un modèle 3D de FpvC par homologie grâce au serveur *EsyPred3d 1.0* (Lambert *et al.*, 2002) afin d'obtenir une prédiction de sa structure. FpvC adopte le repliement classique des protéines de liaison périplasmique, et on retrouve les trois histidines conservées au niveau du site de liaison. Cependant, le résidu Asp-290 se situerait sur une boucle très éloignée du site de liaison, il semblerait que le résidu impliqué dans la coordination du fer soit en réalité l'Asp-263 (**Figure 70B**). En revanche, l'alignement de séquences montre que FpvF appartient à un second groupe de protéines périplasmiques composé de FhuD et BhuT, qui sont des protéines liant les ferri-sidérophores.

La délétion des gènes *fpvCDEF* engendre une inhibition de 30% au niveau du transport du ^{55}Fe . Cependant, il est possible de restaurer un phénotype sauvage par complémentation, grâce à un plasmide portant les quatre gènes (Figure 2, publication n°2). Les expériences de fractionnement cellulaire, couplées aux études de transport de la Pvd- ^{55}Fe , indiquent clairement que FpvCDEF est responsable de la translocation du fer du périplasme vers le cytoplasme. Ces résultats démontrent que le complexe FpvCDEF est impliqué dans le mécanisme de transport du fer par la voie pyoverdine, chez *P. aeruginosa*.

Par ses propriétés de fluorescence, la pyoverdine est un outil très efficace pour l'étude du mécanisme de transport du fer. En effet, si on excite la Pvd à 400 nm, il est possible de suivre l'émission de sa fluorescence à 447 nm. En revanche, lorsqu'elle est complexée avec du fer, la fluorescence de la Pvd est éteinte. Ces propriétés très particulières, nous permettent de suivre la dissociation du complexe par spectrofluorimétrie. En présence des protéines FpvCDEF, une augmentation de la fluorescence est observée lorsque l'on ajoute le complexe Pvd-Fe, correspondant à sa dissociation. En revanche, chez un mutant n'exprimant pas ces protéines la cinétique de dissociation diminue de manière drastique, mais peut être restaurée par complémentation (Figure 3, publication n°2). Ces données suggèrent que ce transporteur ABC est nécessaire à la dissociation du complexe Pvd-Fe. Des données antérieures ont montrées que la dissociation s'opère dans le périplasme par un mécanisme de réduction (Greenwald *et al.*, 2007 ; Hannauer *et al.*, 2010b ; Imperi *et al.*, 2009 ; Schalk *et al.*, 2002). il semblerait donc que FpvCDEF active la dissociation du complexe Pvd-Fe en exportant le fer vers le cytoplasme.

La spectrométrie de masse en **conditions dénaturantes** a permis de vérifier le poids moléculaire attendu des protéines FpvC (30 457 Da) et FpvF (30 145 Da). En parallèle, nous avons observé que FpvF pouvait former un dimère.

En **conditions natives**, aucune des deux protéines n'est capable de fixer le fer seul. Alors que FpvC est prédite comme étant une protéine capable de fixer les métaux, FpvC interagit uniquement avec la Pvd ou le complexe Pvd-Fe et existe seulement à l'état de monomère. En accord avec les prédictions, c'est la protéine FpvF qui interagit préférentiellement avec le sidérophore ou le ferri-sidérophore, notamment en activant la formation de dimère capable de lier chélateur (Tableau 2, publication n°2). En parallèle, l'incubation des deux protéines a permis de montrer la formation de deux complexes : un trimère FpvC-FpvF₂ et un tétramère FpvC₂-FpvF₂. J'ai pu confirmé l'existence de ces multimères par des expériences de pontage chimique, *in vivo*, et l'incubation en présence d'un complexe pyoverdine-métal augmente la quantité de multimères formés et semble les stabiliser.

Après son transport dans périplasma, le ferri-sidérophore interagit non pas avec une protéine périplasmique mais avec un trimère ou un tétramère. Quant à l'absence de fixation de Fe³⁺, ces données suggèrent qu'en présence du ferri-sidérophore, ces complexes multiprotéiques interagissent préférentiellement avec le sidérophore plutôt qu'avec le métal.

5.4 Conclusion

Ce travail a montré que les deux protéines périplasmiques sont capables d'interagir en formant des trimères FpvC-FpvF₂ et des tétramères FpvC₂-FpvF₂. Ces multimères sont eux mêmes capables de lier la pyoverdine ferrique ou la pyoverdine libre. Ceci est le premier exemple d'un transporteur ABC impliqué dans l'acquisition du fer par les sidérophores ayant deux protéines périplasmiques qui interagissent avec le ferri-sidérophore. Ce transporteur ABC FpvCDEF a également un rôle clé dans le mécanisme de dissociation du complexe pyoverdine-fer dans le périplasma, mais il reste à identifier le mécanisme de réduction qui permet cette dissociation. Cette voie pyoverdine diffère des voies du ferrichrome ou de l'entérobactine chez *E. coli* où une seule protéine périplasmique est décrite, où la dissociation s'effectue dans le cytoplasme après transport du ferri-sidérophore au travers de la membrane cytoplasmique. Aucune des deux protéines périplasmiques n'est capable de lier le

Fe^{3+} , dans nos conditions expérimentales. Cependant il serait intéressant de vérifier leur capacité à lier le Fe^{2+} . Dans ce cas, la réductase pourrait intervenir au sein du trimère ou du tétramère afin de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} . FpvF prendrait alors en charge la pyoverdine pour son recyclage vers le milieu extracellulaire. Parallèlement, FpvC pourrait délivrer le fer ferreux au transporteur ABC, FpvDE. J'ai également initié des expériences de cristallisation de ces deux protéines périplasmiques. Les premiers cristaux de FpvC et FpvF ont été obtenus récemment (**Figure 71**) et nous envisageons également des expériences de co-cristallisation afin d'apporter des données structurales sur les complexes FpvC-FpvF₂ et FpvC₂-FpvF₂. L'ensemble de mon travail est intégré à un article publié dans **ACS Chem. Biol.**, en décembre 2012 (Publication n°2 (Brillet *et al.*, 2012)).

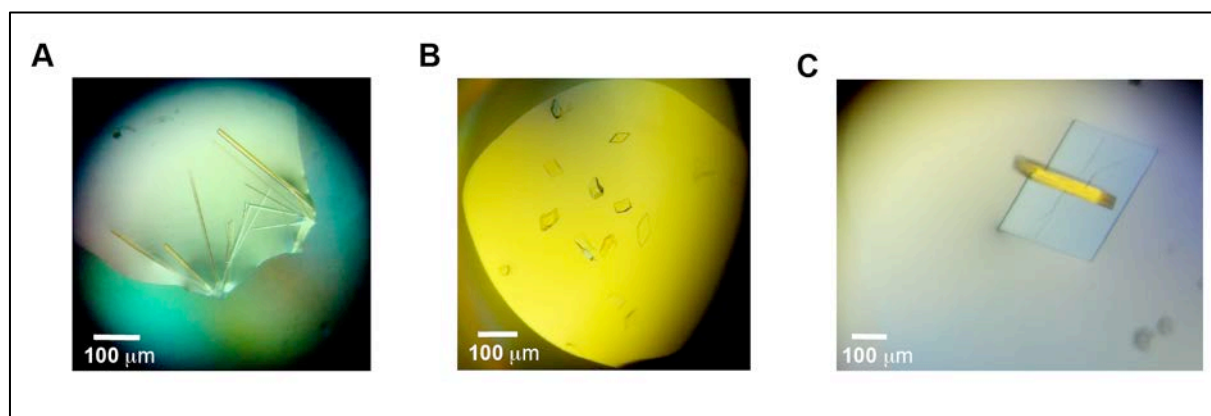


Figure 71 : Cristaux de FpvC et FpvF

Exemples de premiers cristaux obtenus avec FpvC (10 mg.mL⁻¹) en présence de Tris-HCl 0,1 M, PEG 8000 8-12 % (m/v) (A) et avec FpvF (10 mg.mL⁻¹) en présence de trisodium citrate 0,1 M pH 5,5, PEG 3350 18-22 % (m/v) (B) ou de citrate 0,1 M pH 5,5, PEG 3350 18-22 % (C).

5.5 Publication : Brillet *et al.*, 2012, *ACS Chem Biol*

Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., Guillon, L., Hannauer, M., Page, A., Schalk, I. J. An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol*. 2012, Vol 7, n°12, p. 2036-2045.

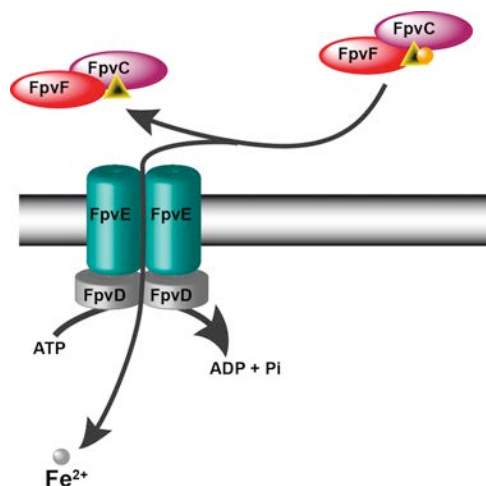




Image courtesy of Karan Bhuripanyo.

■ KARAN BHURIPANYO

Current position: Graduate student research assistant in Prof. Jun Yin's lab, Department of Chemistry, University of Chicago

Education: Baylor University, B.S. in Biochemistry, 2009; University of Chicago, M.S. in Chemistry (organic), research advisor: Jun Yin, 2011

Nonscientific interests: Classical piano, musical composition, East Asian pop culture, chess, good food!

Currently, I am assisting Prof. Yin in the design of an orthogonal ubiquitin transfer pathway, with a particular emphasis on the E2-E3 interface. Our results suggest that E1 enzymes display a surprising level of flexibility in accommodating a variety of different C-terminal sequences in ubiquitin; this may suggest that E2, and perhaps E3 enzymes as well, possess ubiquitin-recognizing-domains that have more stringent requirements for specificity. Interestingly, most E3 enzymes are of RING type, which in the presence of substrate proteins are never covalently linked to ubiquitin and are thought of as merely bridges between the E2 and substrate. Considering that there are only several dozen E2 enzymes, as opposed to thousands of E3 enzymes, the mechanism by which the cell is able to precisely control the ubiquitination of and hence regulate the lifespan of its countless number of proteins makes for an intriguing subject of study. (Read Bhuripanyo's article, DOI: 10.1021/cb300339p)



Image courtesy of Karl Brillet.

■ KARL BRILLET

Current position: Academic engineer position at CNRS, preparing a Ph.D. in the lab of Dr. Isabelle Schalk, CNRS—Strasbourg University, UMR7242, Biotechnology and Cell Signaling unit

Education: University of Caen-Basse Normandie, France, Master in Biochemistry, 1999

Nonscientific interests: Motorbike, trek, movies, theater, music

Iron is an essential element for bacterial growth during infection, and thus understanding the molecular mechanism involved in iron acquisition is a way to identify new antimicrobial targets. In the past years, I performed functional and structural studies of TonB-dependent transporters in Gram-negative bacteria. My project is now focused on the ferrisiderophore transport in *Pseudomonas aeruginosa*, a mutiresistant, Gram-negative bacteria involved in cystic fibrosis. Recently, we identified an inner membrane protein complex FpvCDEF involved in the iron uptake through the pyoverdine pathway. Our studies show that FpvCDEF complex is an ABC transporter with the particularity of having two periplasmic binding proteins FpvC and FpvF. Our experiments highlight complexes formation between FpvC and FpvF, able to bind pyoverdine or pyoverdine-iron. In the future, we will focus on this complex, probably implicated in the ferrisiderophore dissociation process. (Read Brillet's article, DOI: 10.1021/cb300330v)



Image courtesy of Jennifer McCarthy.

■ JENNIFER MCCARTHY

Education: University of Maryland, College Park, B.S. in Biochemistry and B.A. in Music, 2007, Advisor: Steve Rokita; University of Michigan, Ph.D. in Biological Chemistry, 2012, Advisor: Janet L. Smith

Nonscientific interests: Playing the clarinet, reading, cooking

Natural product biosynthetic pathways, such as polyketide synthases, are an abundant source of rare and unusual enzymes synthesizing interesting functional groups. My Ph.D. work

Published: December 21, 2012

An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*

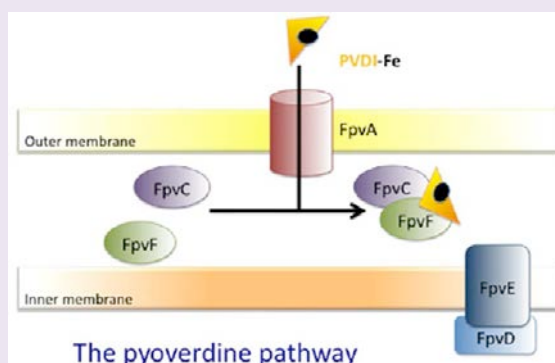
Karl Brillet,[†] Frank Ruffenach,[‡] Hendrik Adams,[†] Laure Journet,[†] Véronique Gasser,[†] Françoise Hoegy,[†] Laurent Guillon,[†] Mélissa Hannauer,[†] Adeline Page,[‡] and Isabelle J. Schalk^{*,†}

[†]UMR 7242, Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

[‡]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM Unité 964/UMR 7104 CNRS, Université de Strasbourg, 1, rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Pyoverdine I is the main siderophore secreted by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to obtain access to iron. After extracellular iron chelation, pyoverdine-Fe uptake into the bacteria involves a specific outer-membrane transporter, FpvA. Iron is then released in the periplasm by a mechanism involving no siderophore modification but probably iron reduction. The proteins involved in this dissociation step are currently unknown. The pyoverdine locus contains the *fpvCDEF* operon, which contains four genes. These genes encode an ABC transporter of unknown function with the distinguishing characteristic of encompassing two periplasmic binding proteins, FpvC and FpvF, associated with the ATPase, FpvE, and the permease, FpvD. Deletion of these four genes partially inhibited cytoplasmic uptake of ⁵⁵Fe in the presence of pyoverdine and markedly slowed down the *in vivo* kinetics of iron release from the siderophore. This transporter is therefore involved in iron acquisition by pyoverdine in *P. aeruginosa*. Sequence alignments clearly showed that FpvC and FpvF belong to two different subgroups of periplasmic binding proteins. FpvC appears to be a metal-binding protein, whereas FpvF has homology with ferrisiderophore binding proteins. *In vivo* cross-linking assays and incubation of purified FpvC and FpvF proteins showed formation of complexes between both proteins. These complexes were able to bind *in vitro* PVDI-Fe, PVDI-Ga, or apo PVDI. This is the first example of an ABC transporter involved in iron acquisition *via* siderophores, with two periplasmic binding proteins interacting with the ferrisiderophore. The possible roles of FpvCDEF in iron uptake by the PVDI pathway are discussed.



Under iron-deficient conditions, fluorescent *Pseudomonas* species are characterized by the overproduction and secretion of siderophores called pyoverdines.¹ Siderophores are high affinity iron chelators, which can solubilize iron and deliver it into the bacterial cells.² They are important for the survival and growth of bacteria in soil and aqueous environments. Siderophores also underlie the virulence of many pathogens in animal models of disease where they compete with the host's iron-chelating proteins such as transferrin or lactoferrin.³ Over 60 pyoverdines have been identified,⁴ forming a large class of siderophores characterized by a conserved dihydroxyquinoline-derived chromophore to which a peptide chain of variable length and composition is attached. The size and amino-acid composition of the peptide moiety of pyoverdines are unique to each *Pseudomonas* species, indicating that the specialization of each bacterium is determined by its siderophore. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produces the siderophore pyoverdine I (PVDI), a partly cyclic octapeptide linked to the chromophore.⁵ Among *Pseudomonas*, biosynthesis of pyoverdine and iron uptake mechanisms are the best known for PVDI in *P. aeruginosa* PAO1. In parallel to PVDI, *P. aeruginosa* is able to produce and use the siderophore pyochelin (PCH) and is able to use siderophores

produced by other microorganisms, such as ferrichrome, enterobactin, and cepabactin.⁶

After chelation of iron in the extracellular medium, PVDI-Fe is transported across the *P. aeruginosa* outer membrane by FpvAI, which is a specific outer-membrane transporter. FpvAI consists of a C-terminal β -barrel domain, a plug domain filling the barrel, followed by a region of four to five residues called the TonB box, and a long periplasmic N-terminal extension.^{7,8} This extension is not involved in the transport of ferrisiderophores but functions in the regulation of transcription *via* a signaling cascade.⁹ The binding site of the ferric siderophore is located outside the membrane above the plug and is composed of residues from both the plug and the β -barrel domains. The FpvAI binding site mostly consists of aromatic residues, including six Tyr residues and two Trp residues, and only three hydrophilic residues. As in all Gram-negative bacteria, the proton-motive force of the inner membrane drives the transport of ferrisiderophore across the outer membrane through

Received: July 5, 2012

Accepted: September 25, 2012

Published: September 25, 2012

interaction of the inner-membrane TonB protein with the TonB box of the outer-membrane transporter.^{10,11}

In Gram-negative bacteria, the subsequent uptake of ferrisiderophores across the inner membrane is performed by either a transporter, belonging to the family of periplasmic binding protein-dependent ABC transporters,¹² or by permeases.^{13,14} In *Escherichia coli*, the transport of ferric siderophores is sustained by a specific ABC transporter for each siderophore pathway: FhuBCD for desferrichrome and desferrioxamine,^{15,16} FecCDE for citrate,^{17,18} and FepCDG for enterobactin.¹⁹ In *P. aeruginosa*, ferripyochelin and ferrichrome are transported across the inner membranes by permeases: FptX for ferripyochelin,¹³ and FiuB and FoxB for ferrichrome.¹⁴ For these siderophore pathways, the whole ferrisiderophore complex is transported into the cytoplasm and iron is then released from the siderophore. The release mechanisms for ferrichrome involve iron reduction²⁰ followed by acetylation of the siderophore and its recycling into the growth media.^{14,21} The release mechanism for ferrienterobactin involves cytoplasmic esterase hydrolysis of the siderophore.²² Previous studies indicated that the dissociation of the PVDI-Fe complex occurs in the periplasm and not in the cytoplasm.^{23,24} This process does not involve any chemical degradation or modification of the siderophore, but apparently an iron reduction. PVDI is then recycled to the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ efflux pump^{24–26} thereby allowing a new cycle of iron uptake to take place. However, the molecular mechanisms involved in the release of metal from PVDI and the reuptake of iron from the periplasm to the cytoplasm remain unknown.

In *P. aeruginosa* PAO1, a periplasmic binding protein-dependent ABC transporter is present at the pyoverdine locus (PA2407–10) and conserved in most *Pseudomonas* species apart in the non-fluorescent *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas mendocina*.²⁷ Expression of these genes is regulated by iron, PvdS,^{27–29} and two other ECF factors.²⁸ Mutation of PA2407–10 genes does not appear to affect growth or PVDI production under iron-limiting conditions,³⁰ another iron uptake pathway probably taking over this process. According to its genome, *P. aeruginosa* PAO1 has at least 11 iron uptake pathways.³¹ In the present study, we reinvestigated the involvement of PA2407–10 genes in iron acquisition via the PVDI pathway in *P. aeruginosa* PAO1. We showed that deletion of these four genes affects cytoplasmic ⁵⁵Fe acquisition via PVDI and inhibited the kinetics of iron release from this siderophore in bacterial cells. *In vitro* experiments with purified FpvC and FpvF (the two periplasmic binding proteins of this ABC transporter) and *in vivo* cross-linking experiments showed formation of complexes with different stoichiometries for the FpvC and FpvF proteins. These complexes could bind PVDI-Fe and apo PVD.

■ RESULTS AND DISCUSSION

fpvCDEF Are Predicted To Encode an ABC Transporter. The sequence of PA2407–10, called here *fpvCDEF* and which is located in the *pvd* locus,^{27,28} is predicted to form an operon encoding a periplasmic binding protein dependent ABC transporter. PA2408 (*fpvD*) codes for a probable ATP-binding component, and PA2409 (*fpvE*) encodes a probable permease of an ABC transporter. PA2407 (*fpvC*) and PA2410 (*fpvF*) are predicted to encode proteins of the TroA-like superfamily.³² Such proteins are periplasmic binding components of ABC-type transport systems that bind ferric siderophores and metal ions such as Mn²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, and/or Zn²⁺. These proteins have a similar organization; two independent globular domains

interact with each other to create the binding cleft between them.³³ TroA-like proteins are generally encoded by ABC-type operons such as *fpvCDEF*. A 317-amino-acid periplasmic protein of 34309.4 Da is expected from the nucleotide sequence of FpvC (PA2407) (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). A signal sequence is predicted by SignalP,³⁴ with a putative cleavage site between residues 37 and 38. From the expected final amino-acid sequence, the predicted molecular mass of the mature form of the FpvC protein is 30457.7 Da.

The nucleotide sequence for FpvF (PA2410) predicts a 305-amino-acid periplasmic protein. SignalP predicted a putative cleavage site between residues 25 and 26,³⁴ and the expected molecular mass of the mature protein is 30143.3 Da. The molecular weight of each protein was confirmed by ESI-MS analysis under denaturing conditions on purified FpvC and FpvF. The experimental values obtained after deconvolution of the multicharged spectra are 30457 Da for FpvC and 30145 Da for FpvF (Supplemental Table 1). Under native conditions, the molecular weight observed for FpvC was 30522 Da. This higher medium molecular weight corresponded to the addition of three sodium adducts.

Amino-acid sequence alignments clearly indicated that FpvC and FpvF belong to two different subgroups of TroA-like proteins (Figure 1). The first group includes FpvC, TroA, ZnuA, and MntA and corresponds to metal-binding proteins. The second group is composed of FpvF, BhuT, and FhuD, which are all proteins involved in ferrisiderophore binding. For FpvC (as for TroA, ZnuA, and MntA), the four amino-acid residues involved in metal chelation (three His and one Asp) are conserved, suggesting that FpvC is able to chelate a metal. The sequence alignment for FpvF suggests that this protein has a role in ferrisiderophore binding like FhuD and BhuT (Figure 1). For these proteins, the binding site recognizes the siderophore but not the chelated metal.³⁵ On the basis of these sequence homologies, *fpvCDEF* appears to be a mixed ABC transporter that can interact with both a siderophore and a metal via its two periplasmic binding proteins.

FpvCDEF Deletion Partially Affects ⁵⁵Fe Uptake by PVDI and Cytoplasmic ⁵⁵Fe Accumulation. We assessed the ability of a mutant with a *fpvCDEF* deletion to transport and accumulate ⁵⁵Fe in the presence of PVDI. To avoid iron uptake by the siderophore pyochelin (PCH) and in order to control the concentration of PVDI in the experiments, the PCH- and PVDI-negative *P. aeruginosa* mutant PAO6383 (Table 1) and its *fpvCDEF* deletion mutant derivative PAS158 were used. Bacteria were incubated with two different PVDI-⁵⁵Fe concentrations, 100 and 500 nM, and the radioactivity incorporated into the cells was monitored (Figure 2). For 500 nM PVDI-⁵⁵Fe, around 30% inhibition of iron uptake was observed for the *fpvCDEF* mutant. When PAS158 was complemented with pMH3L, a pMMB derivative carrying the *fpvCDEF* genes, this iron uptake was restored to the level measured for PAO6383. Accordingly, FpvC and FpvF are highly expressed in these complemented cells (Supplemental Figure 1). PVDI-⁵⁵Fe uptake inhibition was never complete, even with increasing PVDI-⁵⁵Fe concentrations (1 μM, data not shown). In the presence of 100 nM PVDI-⁵⁵Fe, no iron uptake inhibition was observed, probably because the concentration is not high enough and would only allow one or two turnovers of FpvA transport. We repeated the experiment for each strain after treating the cells with the protonophore CCCP. This compound inhibits the proton motive force (PMF) of the bacteria and thus also inhibits any TonB-dependent uptake.³⁶ As expected, no



Figure 1. Sequence alignment of FpvC (PA2407) and FpvF (PA2410) with proteins belonging to the TroA superfamily, shown to function in the ABC transport of ferric siderophores and metal ions such as Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , and/or Zn^{2+} . Invariant residues as well as highly conserved residues are shaded in blue. Residues occupying conserved positions but deviating from the consensus amino-acid sequence are shaded in brighter blue. The four residues of TroA involved in metal chelation are shaded in yellow. The blue vertical line indicates a 44 amino-acid extension of ZnuA, which is not represented on the alignment. Sequence alignment was performed using CLUSTALW⁵² and was manually readjusted by accounting for the residues involved in metal chelation. Two subgroups are shown. The upper group, composed of FpvC, TroA, ZnuA and MntA, corresponds to metal-binding proteins whereas the lower group, composed of FpvF, BhuT, and FhuD, contains proteins involved in ferrisiderophore chelation.

Table 1. Strains and Plasmids Used in This Study

strains or plasmids	relevant characteristics	source or reference
<i>P. aeruginosa</i> Strains		
PAO1	wild-type strain	46
PAO6383	derivative of PAO1; $\Delta pvdF$ $\Delta pchBA$	47
PAS158	derivative of PAO1; $\Delta pvdF$ $\Delta pchBA$ $\Delta fpvCDEF$	this study
PAOpvdFfpvA	derivative of PAO1; $pvdF::kana$, $\Delta fpvA$	48
PAOpfvC	derivative of PAO1; $pvdC::Gm^R$	30
<i>E. coli</i> Strains		
TOP10	F^- , $mcrA$ $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ $recA1$ $araD139$ $\Delta(ara-leu)7697$ $galU$ $galK$ $rpsL$ $endA1$ $nupG$	Invitrogen
BL21(DE3)	F^- $ompT$ $hsdS_B(r_B - m_B^-)$ gal dcm (λ DE3)	Novagen
Plasmids		
pMMB190	Amp^R , RSF replicon ($IncQ$), tac promoter	49
pME3088	suicide vector; Tc^R ; ColE1 replicon; $EcoRI$ $KpnI$ $DraII$ $XhoI$ $HindIII$ polylinker	50, 51
pME497	mobilizing plasmid, Ap^R	51
pJET1/blunt vector	rep (pMB1), bla (Ap^R), $eco47IR$, $PlacUV5$	Fermentas
pMH3L	pMMB190 carrying $BamHI$ - $HindIII$ fragment containing $fpvCDEF$	this study
pLJ68	pJET1/blunt carrying $EcoRI$ - $HindIII$ fragment containing the 700bp upstream $fpvC$ and the 700 pb downstream $fpvF$	this study
pLJ76	pME3088 carrying $EcoRI$ - $HindIII$ fragment containing the 700bp upstream $fpvC$ and the 700 pb downstream $fpvF$	this study
pET23-789	pET23 carrying a fragment containing the $fpvCDE$ genes	this study
pVEGA6	pMMB190 carrying $EcoRI$ - $HindIII$ fragment containing $fpvF$ -6His	this study

iron uptake occurred with CCCP-treated cells (Figure 2). The inhibition of ^{55}Fe accumulation in cells that are unable to express the FpvCDEF ABC transporter indicates a role of FpvCDEF in the uptake of iron via the PVDI pathway.

The uptake experiments in the presence of 500 nM PVDI- ^{55}Fe were repeated, and cells were fractionated after

30 min of incubation with the siderophore-iron complex and radioactivity in each cell compartment was monitored (Figure 2C). Around 45% less radioactivity was detected in the cytoplasm of PAS158 compared to that of PAO6383. The amount of ^{55}Fe in the periplasm seemed to be independent of the FpvCDEF expression. In the complemented strain PAS158(pMH3L) the amount of ^{55}Fe increased in both periplasm and cytoplasm, consistent with the high expression of the FpvCDEF proteins in this strain (Supplemental Figure 1).

All of these observations indicate that the ABC transporter FpvCDEF is involved in the uptake of iron by the siderophore PVDI and plays a role in iron translocation from the periplasm into the cytoplasm. In the absence of FpvCDEF, PVDI- ^{55}Fe can still be transported across the outer membrane by FpvA but accumulates into the periplasm. This periplasmic ^{55}Fe accumulation explains why in $fpvCDEF$ mutant PAS158 only 30% inhibition of ^{55}Fe uptake is observed.

fpvCDEF Deletion Affects PVDI-Fe Dissociation *in Vivo*

Previous studies have shown that iron is released from PVDI in the periplasm through a mechanism probably involving iron reduction.^{23,24} This dissociation can be followed in real time by exciting the bacterial sample at 400 nm and monitoring the fluorescence at 447 nm.²³ Only apo PVDI is fluorescent at 447 nm (excited at 400 nm^{37,38}). In its ferric form, iron quenches the fluorescence of the siderophore. To investigate further the role of FpvCDEF in iron uptake by PVDI in *P. aeruginosa*, cells of the PVDI-negative mutant PAO6383, its $fpvCDEF$ mutant PAS158, the corresponding complemented strain PAS158(pMH3L), and the $fpvA$ mutant PAOpvdFfpvA were incubated in the presence 20 nM or 100 nM PVDI-Fe (Figure 3). Consistent with previous findings,²³ an increase in fluorescence was observed following the addition of PVDI-Fe to PAO6383. This corresponded to the dissociation of PVDI-Fe (formation of fluorescent apo PVDI) in the bacterial periplasm. No increase of fluorescence was observed in the absence of FpvA, where no PVDI-Fe can be transported into the bacteria. For both tested ferrisiderophore concentrations, deletion of the $fpvCDEF$ genes resulted in a clear decrease of the kinetics of PVDI-Fe dissociation (0.034 and 0.356 $\Delta F \text{ min}^{-1}$ for PAS158 and

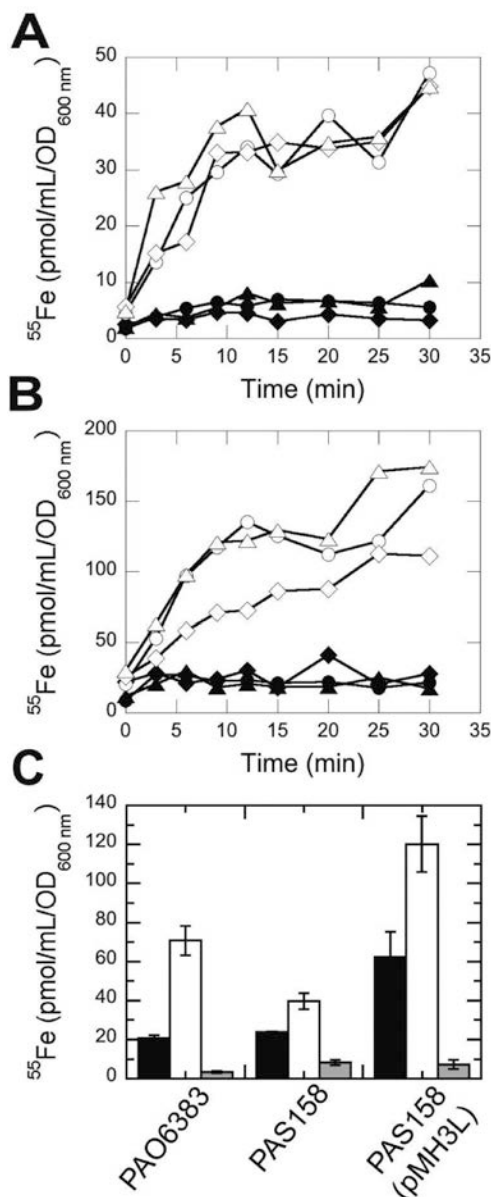


Figure 2. (A, B) Time-dependent uptake of PVDI- ^{55}Fe in *P. aeruginosa* PAO6383, PAS158, and PAS158(pMH3L) strains. PAO6383 is a PCH- and PVDI-negative strain, PAS158 its *fpvCDEF* deletion mutant, and PAS158(pMH3L) the complemented *fpvCDEF* strain. Cells were incubated for 15 min in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) before the initiation of transport assays by the addition of 100 (panel A) or 500 (panel B) nM PVDI- ^{55}Fe (PAO6383, ○; PAS158, ◇; and PAS158(pMH3L), Δ). Samples (100 μL) from the suspension were removed at various time points and filtered; the radioactivity retained was measured. The results are expressed as pmol of PVDI- ^{55}Fe transported per mL of cells at an OD_{600 nm} of 1. The experiment was repeated with the CCCP protonophore at a concentration of 200 μM (PAO6383, ●; PAS158, ◆; and PAS158(pMH3L), ▲). The experiments were repeated three times, and equivalent kinetics were observed. (C) ^{55}Fe repartition in the different cell compartments of *P. aeruginosa* cells. PAO6383, PAS158, and PAS158(pMH3L) cells were incubated for 30 min in the presence of 500 nM PVDI- ^{55}Fe in the same condition as for the uptake assays in panel B. Afterward, the cells were pelleted, the periplasms (black bars), cytoplasms (white bars), and membranes (gray bars) were isolated for each strain, and the amount of ^{55}Fe present was monitored.

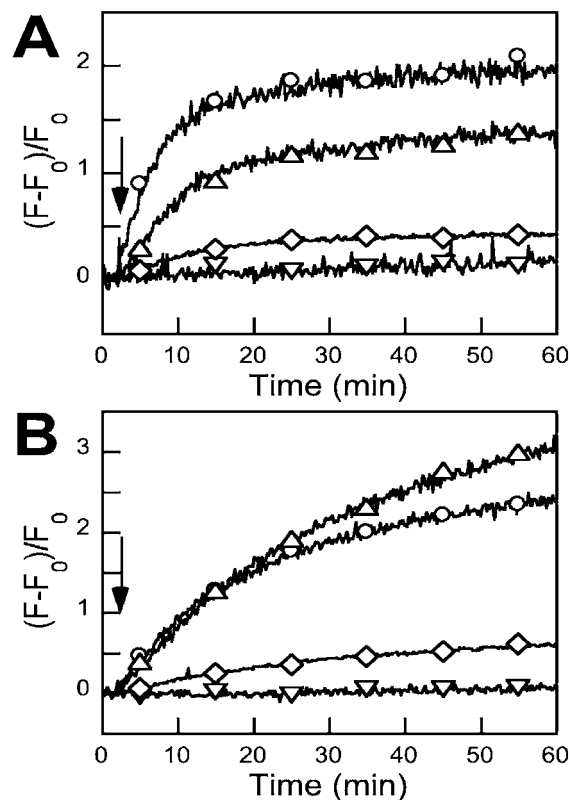


Figure 3. *In vivo* PVDI-Fe dissociation kinetics, monitored by direct excitation of PVDI in PAO6383 (○), PAS158 (◇), PAS158(pMH3L) (Δ), and PAO (▽) cells. PAO6383 is a PCH- and PVDI-negative strain, PAS158 its *fpvCDEF* deletion mutant, PAS158(pMH3L) the complemented *fpvCDEF* strain, and PAO a PVDI- and FpvA mutant. Cells were washed and resuspended to an OD_{600 nm} of 0.2 in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and incubated at 29 °C. Following the addition of 20 (panel A) or 100 nM (panel B) PVDI-Fe (indicated by an arrow), the change in fluorescence (excitation set at 400 nm) was monitored by measuring the emission of fluorescence at 447 nm, every second, for 60 min. The experiments were repeated three times, and equivalent kinetics were observed.

PAO6383, respectively) in the presence of 100 nM PVDI-Fe as compared to the PAO6383 mutant (Figure 3B), and around 85% less apo PVDI was generated. The experiment was also carried out with PAS158 cells carrying pMH3L. Dissociation was restored in PAS158 cells complemented with the four *fpvCDEF* genes (Figure 3).

In conclusion, the data presented in Figures 2 and 3 suggest that FpvCDEF must be involved in the transport of iron across the inner membrane and that this transporter is necessary for an efficient PVDI-Fe dissociation. Previous studies have shown that iron is apparently removed from PVDI in the periplasm by a mechanism involving iron reduction and no degradation of the siderophore^{23–26} and that PVDI is able to bind and oxidize the ferrous ion *in vitro*.³⁹ Therefore, FpvCDEF, by exporting iron across the inner membranes, may activate PVDI-Fe dissociation.

FpvF Interacts More Efficiently with PVDI-Fe than FpvC. FpvC was overexpressed in *E. coli*, and FpvF was overexpressed in *P. aeruginosa* cells. After their purification, both proteins were analyzed independently by ESI-MS. This technique has become widely used for primary-structure determination and characterization of purified proteins. It has also been used to assess the stability of noncovalent complexes in the vacuum of

Table 2. Complexes Formed between FpvC, FpvF and PVDI, PVDI-Fe, and Siderophore-Free Fe³⁺^a

proteins incubated with or without siderophores	proteins or complexes observed and experimental molecular weight in native condition (Da)	proteins incubated with or without siderophores	proteins or complexes observed and experimental molecular weight in native condition (Da)
FpvC	FpvC: 30522 (+3 Na ⁺)		FpvC-PVDI
FpvC + Fe ³⁺	no FpvC-Fe complex was observed		FpvC-FpvF ₂
	FpvC: 30 522		FpvC-FpvF ₂ -PVDI
FpvC + PVDI	FpvC-PVDI: 31856		FpvC ₂ -FpvF ₂
	FpvC		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI
FpvC + PVDI-Fe	FpvC-PVDI-Fe (masses presented in Figure 4A)		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI ₂
FpvF	FpvF: 30145		(masses presented in Figure 7A)
	FpvF ₂ : 60291	FpvC + FpvF + PVDI-Fe	FpvC
FpvF + Fe ³⁺	no FpvF-Fe or FpvF ₂ -Fe complexes were observed		FpvF
	FpvF		FpvC-PVDI-Fe
FpvF + PVDI	FpvF ₂		FpvC-FpvF ₂
	FpvF ₂ -PVDI		FpvC-FpvF ₂ -PVDI-Fe
	(masses presented in Figure 4B)		FpvC-FpvF ₂ -PVDI ₂ -Fe ₂
	FpvF		FpvC ₂ -FpvF ₂
FpvF + PVDI-Fe	FpvF ₂		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI-Fe
	FpvF ₂ -PVDI-Fe		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI ₂ -Fe ₂
	(masses presented in Figure 4C)	FpvC + FpvF + PVDI-Ga	(masses presented in Figure 7B)
FpvC + FpvF	FpvC		FpvC
	FpvF		FpvF
	FpvF ₂		FpvC-PVDI-Ga
	FpvC-FpvF ₂		FpvF-PVDI-Ga
	FpvC ₂ -FpvF ₂		FpvF ₂
	(masses presented in Figure 5)		FpvF ₂ -PVDI-Ga
FpvC + FpvF + Fe ³⁺	FpvC		FpvC-FpvF ₂
	FpvF		FpvC-FpvF ₂ -PVDI-Ga
	FpvC-FpvF ₂		FpvC-FpvF ₂ -PVDI ₂ -Ga ₂
	FpvC ₂ -FpvF ₂		FpvC ₂ -FpvF ₂
FpvC + FpvF + PVDI	FpvC		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI-Ga
	FpvF		FpvC ₂ -FpvF ₂ -PVDI ₂ -Ga ₂
			(masses presented in Supporting Information)

^aFpvC and FpvF were incubated independently or together, in the presence or in the absence of 10 equiv of PVDI, PVDI-Fe, or FeCl₃ in 100 mM ammonium acetate pH 6.5 buffer. The analyses of samples by ESI-MS were realized under native conditions with a final concentration of 10 pmol/μL FpvC and FpvF in 150 mM ammonium acetate. The experimental molecular weights correspond to the molecular weights obtained after the deconvolution of the multicharged ions in native conditions, and the composition of the complexes formed was deduced from the molecular weight.

the mass spectrometer by analyzing their resistance to dissociation.⁴⁰ Native ESI-MS is highly sensitive and rapid and has a low sample consumption, making it a powerful structural biology technique. According to native ESI-MS analyses, FpvC and FpvF were purified in our experimental conditions without any siderophore or metal bound to them (Table 2). These analyses also demonstrated that FpvF can form dimers (FpvF₂), whereas FpvC did not (Table 2).

We next aimed to identify the compounds that bind to FpvC and FpvF and thus eventually transported by the FpvDE transporter. The purified periplasmic binding proteins FpvC and FpvF were individually incubated in the presence of 10 equiv of apo PVDI, PVDI-Fe, or siderophore-free Fe³⁺ before ESI-MS analyses (Table 2 and Figure 4). The molecular weights of PVDI (1336 Da) and PVDI-Fe (1388 Da) were checked by ESI-MS analysis. No interaction was observed between siderophore-free Fe³⁺ and either FpvC or FpvF. In the presence of apo PVDI or PVDI-Fe, the major FpvC form detected was siderophore-free protein. Lower amounts of FpvC-PVDI or FpvC-PVDI-Fe were also detected (Table 2 and Figure 4A). However, FpvC is important for iron acquisition by PVDI, since deletion of *fpvC* affected ⁵⁵Fe accumulation (around 30% inhibition, Supplemental Figure 2) as *fpvCDEF* mutation.

For FpvF, the presence of PVD seemed to activate the formation of FpvF dimers (FpvF₂) with a molecular weight of 60.2 kDa, and only the dimer was able to interact with metal-free PVDI or PVDI-Fe (Table 2, Figure 4B and C). No interaction was seen between FpvF monomers and any form of PVDI. The signal intensity of the multicharged ions corresponding to FpvF₂-PVDI and FpvF₂-PVDI-Fe was lower than the signal intensity of the FpvF dimer ions (Figure 4B).

In conclusion, FpvC, which was predicted to be a metal-binding protein, exists only as a monomer and cannot bind *in vitro* siderophore-free Fe³⁺, though it can interact with PVDI-Fe. FpvF, which belongs according its sequence to the siderophore binding protein family, forms dimers able to interact with apo PVDI or PVDI-Fe. No interaction was observed with siderophore-free iron. According to the amount of protein-PVD-Fe complexes detected by ESI-MS, FpvF seems to be more efficient in interacting with PVDI-Fe than FpvC.

FpvC and FpvF Are Able To Interact and Form Two Complexes with Different Stoichiometries. When the purified periplasmic FpvC and FpvF proteins were incubated together in the absence of Fe³⁺ and siderophore, two complexes were observed by ESI-MS (Table 2 and Figure 5). The first complex comprised one FpvC and two FpvF proteins (FpvC-FpvF₂),

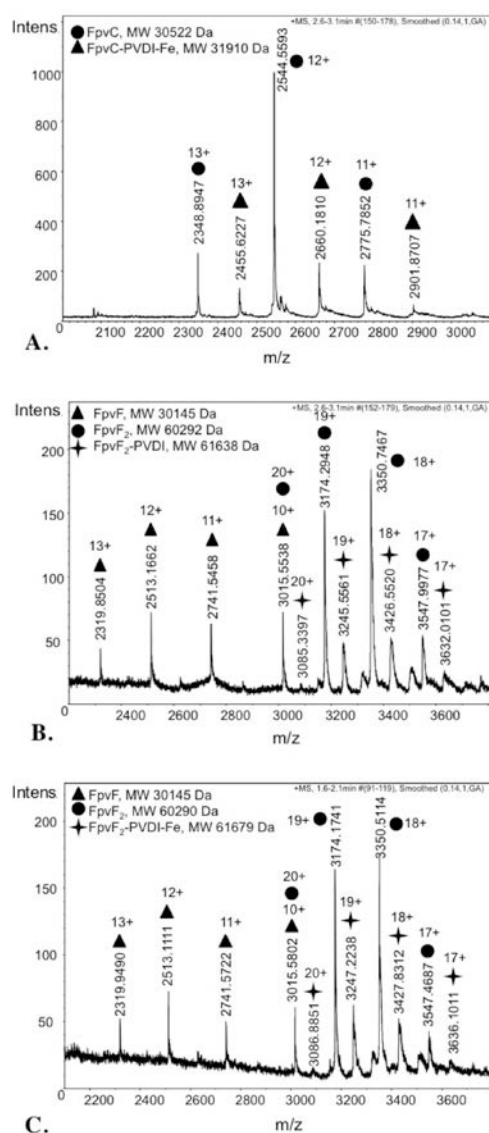


Figure 4. Native mass spectra of FpvC in the presence of PVDI-Fe (A) and of FpvF in the presence of PVDI-Fe (B) or apo PVDI (C). FpvC (A) and FpvF (B, C) were incubated independently, in the presence of 10 equiv of PVDI or PVDI-Fe in 100 mM ammonium acetate buffer pH 6.5. ESI-MS of the samples was performed under native conditions with final concentrations of FpvC and FpvF of 10 pmol/ μ L in 150 mM ammonium acetate. The capillary exit was 150 V for panels A and B and 160 V for panel C. The multicharged ions in panel A correspond to FpvC and FpvC-PVDI-Fe.

and the second complex was composed of dimers of both FpvC and FpvF (FpvC₂-FpvF₂). The ability of FpvC and FpvF to interact was confirmed *in vivo* with cross-linking experiments using formaldehyde (Figure 6). PAO6383 cells were incubated in the presence or absence of PVDI-Fe or PVDI-Ga and in the presence or absence of 1% formaldehyde. After incubation, the periplasmic proteins were isolated by cell fractionation and analyzed by SDS-PAGE. A new protein band was observed using polyclonal anti-FpvC and anti-FpvF at 110 kDa in the presence of formaldehyde as compared to the experiments in the absence of cross-linking agent, suggesting formation of FpvC-FpvF complexes *in vivo*. More FpvF has been observed in this cross-linking complex than FpvC suggesting a FpvC-FpvF₂ stoichiometry as observed by native mass spectrometry. At last,

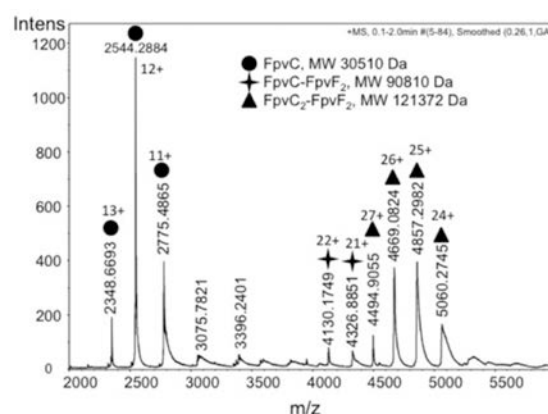


Figure 5. Native mass spectra of FpvC and FpvF incubated together. Equivalent amounts of FpvC and FpvF were incubated together in 100 mM ammonium acetate buffer pH 6.5. ESI-MS of the samples was performed under the same conditions as described in Figure 4.

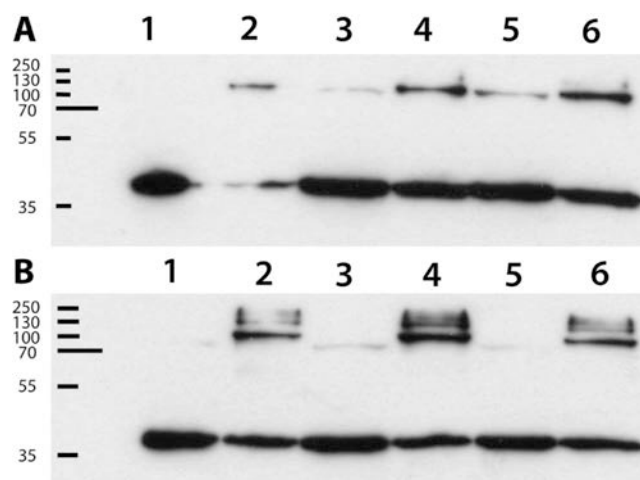


Figure 6. *In vivo* cross-linking of FpvC-FpvF complexes. PAO6382 grown in iron-limited medium were incubated in the presence of 1 μ M PVDI-Fe or PVDI-Ga. After 30 min of incubation at room temperature, 1% formaldehyde was added, and the mixture incubated for another 30 min. Periplasmic proteins were isolated by cell fractionation, subjected to SDS-PAGE in a 12% polyacrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membranes. FpvC (A) and FpvF (B) were detected with polyclonal anti-FpvC and anti-FpvF. The cell were incubated without siderophore (lanes 1, 2), with 1 μ M PVDI-Fe (lanes 3, 4), or with 1 μ M PVDI-Ga (lanes 5, 6). In lanes 1, 3 and 5, the experiment has been performed in the absence of formaldehyde and in lanes 2, 4, and 6 with formaldehyde.

the amount of cross-linked FpvC-FpvF increased in the presence of PVDI-metal complexes, suggesting a stabilization of this protein complex in the presence of PVDI-Fe or PVDI-Ga.

FpvC-FpvF₂ and FpvC₂-FpvF₂ Complexes Are Able to Bind apo PVDI and PVDI-Fe. Purified FpvC and FpvF were incubated together in the presence of 10 or 20 equiv of apo PVDI, PVDI-Fe, or FeCl₃, and the interactions were followed by ESI-MS (Table 2 and Figure 7). Neither FpvC-FpvF₂ nor FpvC₂-FpvF₂ complexes interacted with siderophore-free iron. In the presence of 10 equiv of PVDI-Fe, complexes between FpvC, FpvF, and PVDI-Fe were observed. The stoichiometries of these complexes were 1:2:1:1, 1:2:2:2, 2:2:1:1, and 2:2:2:2 (FpvC:FpvF:PVDI-Fe; Figure 7A and Table 2), consistent with the molecular weights of the *in vivo* cross-link products in

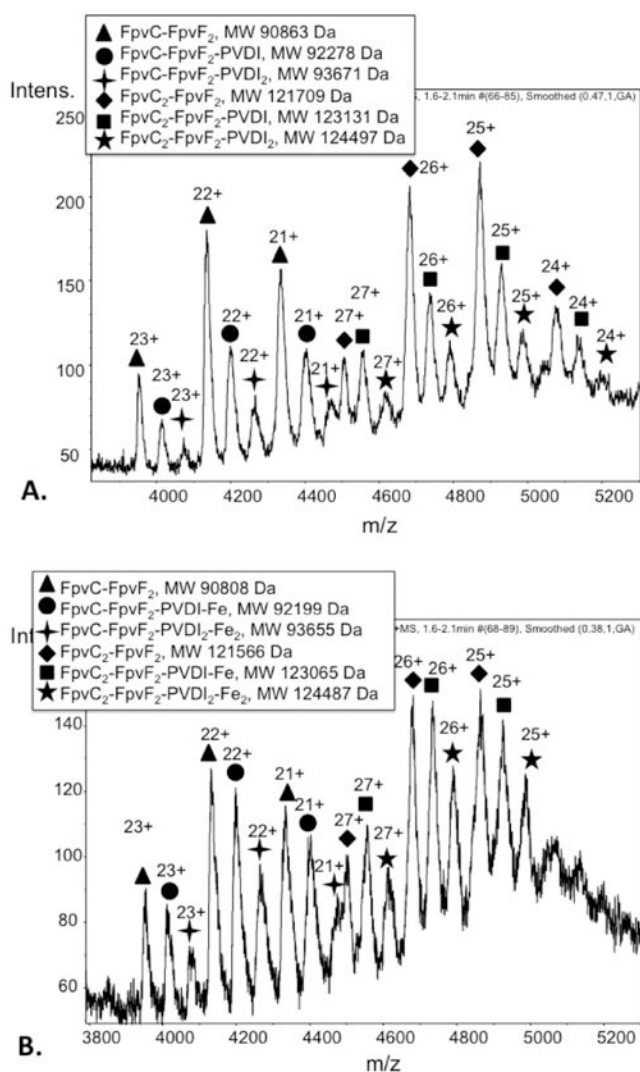


Figure 7. Native mass spectra of FpvC and FpvF incubated together in the presence of PVDI-Fe (A) or apo PVDI (B). FpvC and FpvF were incubated together, in the presence of 10 equiv of PVDI-Fe (A) or PVDI (B) in 100 mM ammonium acetate buffer pH 6.5. ESI-MS of the samples was performed under the same conditions as described in Figure 4.

Figure 6. The increase of PVDI-Fe concentration promoted the formation of large amounts of FpvC₂-FpvF₂-PVDI-Fe and FpvC₂-FpvF₂-PVDI₂-Fe₂ (data not shown). These data suggest that in the *P. aeruginosa* PVDI pathway, the ferrisiderophore in the periplasm interacts with FpvC-FpvF₂ and FpvC₂-FpvF₂ complexes and not just with one periplasmic binding protein. In the presence of PVDI-Ga, equivalent complexes were formed in the same proportions as with PVDI-Fe: FpvC-FpvF₂-PVDI-Ga, FpvC-FpvF₂-PVDI₂-Ga₂, FpvC₂-FpvF₂-PVDI-Ga, and FpvC₂-FpvF₂-PVDI₂-Ga₂ (Table 2 and Supplemental Figure 3).

When the experiment was repeated in the presence of apo PVDI, FpvC-FpvF-PVDI complexes were observed on ESI-MS with the following stoichiometries: 1:2:1, 1:2:2, 2:2:1, and 2:2:2 (Table 2 and Figure 7A).

The ability of FpvC-FpvF₂ and FpvC₂-FpvF₂ to bind both PVDI-Fe and apo PVDI, but not Fe³⁺, suggests that these protein complexes interact more strongly with the PVDI moiety of PVDI-Fe and are thus present in the periplasm of *P. aeruginosa* cells to pick up PVDI-Fe after its transport across the outer

membrane by FpvA. Consistent with this hypothesis, FpvC₂-FpvF₂ or FpvC-FpvF₂ were also able to interact with PVDI-Ga. At last and consistent with the *in vivo* cross-linking experiments, FpvC-FpvF₂ and FpvC₂-FpvF₂ complexes were more efficient in binding PVDI-Fe than the individual FpvC and FpvF proteins.

Conclusion. FpvCDEF is the first example of an ABC transporter with two associated periplasmic binding proteins involved in iron uptake by siderophores in Gram-negative bacteria. FpvC and FpvF are able to form complexes *in vivo* in the periplasm and bind PVDI-Fe. Previous approaches have shown that PVDI-Fe, after uptake across the outer membrane by FpvA, dissociates in *P. aeruginosa* periplasm without any chemical modification of the siderophore but probably *via* a metal reduction step. In such a scenario and according to the data presented here, the two periplasmic FpvC and FpvF must pick up PVDI-Fe in the periplasm after transport by FpvA but do not bring the PVDI-Fe complex to the FpvE permease for uptake across the inner membrane. Instead, they must be somehow involved in the periplasmic dissociation of iron from PVDI and the subsequent transport of iron across the inner membrane into the cytoplasm by FpvDE. Deletion of the four genes of this ABC transporter did not completely inhibit Fe⁵⁵ uptake by PVDI (Figure 2). This is probably because, even in the absence of FpvCDEF and therefore of the FpvC₂-FpvF₂ complex, FpvA is still functional. PVDI-⁵⁵Fe can thus accumulate in the periplasm as reported for PVDI-Ga and other PVDI-metal complexes that are unable to dissociate in *P. aeruginosa*.⁴¹ PVDI-Fe dissociation was more dramatically affected by *fpvCDEF* deletion (Figure 3), indicating that this step must involve FpvC and FpvF. FpvC has three His and one Asp conserved amino-acid residues. We thus hypothesized that within the FpvC-FpvF₂-PVDI-Fe, FpvC-FpvF₂-PVDI₂-Fe₂, FpvC₂-FpvF₂-PVDI-Fe, and FpvC₂-FpvF₂-PVDI₂-Fe₂ complexes these four conserved residues are ready for an exchange with PVDI regarding the coordination of iron. Previous studies have shown that PVDI-Cr was unable to dissociate in the periplasm,²³ confirming that the dissociation mechanism must include a ligand exchange. Indeed, Cr forms complexes with siderophores that are structurally similar to siderophore-Fe but are inert to ligand exchange.⁴² In such a scenario, where both FpvC and FpvF participate in the periplasmic dissociation of PVDI-Fe, there may be a dissociation mechanism where FpvC₂-FpvF₂-PVDI₂-Fe₂ dissociates into FpvC-Fe and FpvF-PVDI or FpvC₂-Fe₂ and FpvF₂-PVDI₂. In agreement with this notion, mass-spectrometry analyses clearly showed that FpvF was more efficient in binding apo PVDI than FpvC. However, neither FpvC nor FpvF was able to bind Fe³⁺ *in vitro*, although further investigations under anaerobic conditions are necessary to check whether FpvC can chelate Fe²⁺ instead of Fe³⁺. Another next key step would consist in determining the X-ray structure of the FpvC₂-FpvF₂-PVDI₂-Fe₂ complex or to study the iron coordination in this complex.

METHODS

Chemicals, Growth Media, and Siderophores. [⁵⁵Fe]Cl₃ was obtained from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, USA). The protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) was purchased from Sigma, and isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from Euromedex.

P. aeruginosa PAO1 strains were grown overnight in succinate medium: 6.0 g L⁻¹ K₂HPO₄, 3.0 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1.0 g L⁻¹ [NH₄]₂SO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 4.0 g L⁻¹ sodium succinate; the pH was adjusted to 7.0 by addition of NaOH at 30 °C. LB broth (Lennox)

and LB broth agar medium were both purchased from Difco and were used as rich medium in all experiments. Media were supplemented as necessary with the relevant antibiotics at the following concentrations: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ carbenicillin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracyclin, and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol.

PVD and PVD-Fe were purified and prepared as previously described.⁴³

Bacterial Strains and Plasmids. The strains and plasmids used in this study are summarized in Table 1. Mutation or cloning strategies are described in Supporting Information.

Iron Uptake Assays and Cell Fractionation. PVD-⁵⁵Fe (0.25 Ci mmol^{-1}) was prepared as previously described,⁴⁴ with a 4-fold excess of PVDI over iron. The uptake assays were carried out as previously described.⁴⁴ An overnight culture under conditions of iron limitation was performed. Bacteria were harvested and prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at an $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ of 1 and were incubated at 37 °C. Transport assays were initiated by adding 100 and 500 nM of PVDI-⁵⁵Fe. Aliquots (100 μL) of the suspension were removed at different times, filtered, and washed with 50 mM Tris-HCl, and the retained radioactivity was counted. The experiment was repeated with cells that had been previously treated with 200 μM CCCP, which is a protonophore that inhibits iron uptake.³⁶

Periplasm and cytoplasm fractions were prepared as previously described.⁴⁵

Fluorescence Spectroscopy. Fluorescence experiments were performed with a PTI (Photon Technology International TimeMaster; Bioritech) spectrofluorometer. The cells were washed with 2 vol of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and were then resuspended in the same buffer to a final $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ of 1. For all experiments, the sample was stirred at 29 °C in a 1 mL cuvette; the excitation wavelength was set at 400 nm, and fluorescence emission was measured at 447 nm, every 300 ms, for the duration of the experiment.

Expression and Protein Purification. *Expression and Purification of FpvC.* *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET23-789 were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin and 40 μM FeSO_4 . After 24 h of culture, bacteria were harvested and resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 20% sucrose). To isolate the periplasmic fraction was added 1 mg mL^{-1} lysozyme, and the mixture was incubated for 2 min on ice. The suspension was then centrifuged for 20 min at 6,700g. The supernatant containing the periplasmic fraction was ultracentrifuged at 125,000g for 20 min to remove membrane traces from the sample. The periplasm was diluted 3X in a solution of 50 mM MES pH 6.5 and 1 mM EDTA, loaded onto a Source S column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM MES pH 6.5 and 1 mM EDTA, and then eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl. The fractions containing FpvC (as determined by SDS-PAGE) were pooled, concentrated, and placed onto a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM MES pH 6.5 and 350 mM NaCl. The fractions containing FpvC were loaded onto a HiTrap Desalting column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM MES pH 6.5 to remove salts from the sample. After purification, all of the protein fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration at 10,000g using a molecular cutoff weight of 10 kDa (Amicon, Millipore).

Expression and Purification of FpvF. BL21(DE3) expressing FpvF were grown at 37 °C in LB medium with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin until the cultured cells reached an OD_{600} of 0.6. Expression of the recombinant protein was induced with 1 mM IPTG at 37 °C for 3 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a solution of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and EDTA 1 mM, and then disrupted by two sonications (50–60% amplitude). Soluble proteins were separated from the cell membranes by a 125,000g ultracentrifugation for 20 min. Twenty millimolar imidazole was added to the supernatant containing FpvF. The sample was applied onto a HisTrap column (GE Healthcare) equilibrated in a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. The protein was eluted with a linear gradient of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole. The fractions containing FpvF (as determined by SDS-PAGE) were pooled, concentrated, and washed by ultrafiltration with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and loaded onto a HiTrap Q column

equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5. The protein was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7.5. The FpvF fractions were loaded onto a HiTrap desalting column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 to remove salt traces from the sample. After purification, all of the protein fractions were then pooled and concentrated by ultrafiltration at 10,000g using a molecular cutoff weight of 10 kDa (Amicon, Millipore).

Electrospray Mass Spectrometry Analysis. All studies were performed using an electrospray time-of-flight mass spectrometer (ESI-MS) (MicroTOF II, Bruker, Bremen, Germany). The FpvC and FpvF proteins were prepared at 100 μM concentration in 100 mM ammonium acetate buffer pH 6.5. Ultrafiltration at 10,000g using a molecular cutoff weight of 10 kDa (Amicon, Millipore) was used for the buffer exchange. Proteins were incubated with the equivalent of 10–20 FeCl_3 , PVDI, or PVDI-Fe. Samples were analyzed under denaturing conditions at a final concentration of 5 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$ in water/acetonitrile v/v 1% formic acid and under native conditions at a final concentration of 10 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$ in 150 mM ammonium acetate. The samples were continuously infused into the ion source at a flow rate of 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ using a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA). Data were acquired in the positive mode. An ESI-L low-concentration tuning mix (Agilent Technologies) was used to calibrate the device for denaturation analyses, whereas a 1 mg mL^{-1} solution of cesium iodide (Fluka) in ethanol was used to calibrate the device for native analyses. To preserve the noncovalent complexes, relatively mild interface conditions were used; a declustering voltage (Capillary exit) was ranged from 40 to 200 V, and the capillary temperature was set to 160 and 180 °C. The time of acquisition was between 30 s and 1 min. Data were analyzed with Data Analysis software (ver 4.0 SP1, Bruker) and the protein electro-spray spectra were deconvoluted using Maximum Entropy or Charge State Ruler.

Cross-Linking. An overnight culture of PAO6383 (50 mL) in iron-limited medium was harvested and washed twice in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8). The cell suspension was incubated in the presence of 1 μM PVDI-Fe or 1 μM PVDI-Ga during 30 min. After incubation at RT, the cells were incubated another 30 min in the presence or absence of 1% formaldehyde. The cells were harvested and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 20% sucrose to isolate the periplasmic fractions as described above. The periplasmic fractions were analyzed by immunoblotting using FpvC and FpvF antibodies.

Immunoblot Analysis. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting (Bio-Rad). The nitrocellulose membranes were then blocked by incubation for 20 min in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6, 5% dried milk powder) followed by incubation in blocking buffer supplemented with a primary antibody. They were then incubated in blocking buffer supplemented with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Sigma, dilution 1/10000). Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). Anti-FpvC and anti-FpvF polyclonal antisera were prepared from purified FpvC and FpvF, respectively. New Zealand rabbits were immunized with 200 μg of proteins in 1 mL of PBS and Freund's Complete Adjuvant V.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by the Centre National de la Recherche Scientifique and by grants from the Centre International de Recherche au Frontière de la Chimie (FRC) and from the ANR (Agence Nationale de Recherche, ANR-08-BLAN-0315-01). We thank B. Hass and A. Chapelle for their help in the construction of pVEGA6 and pET23-789 vectors, respectively.

REFERENCES

- (1) Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., and Palleroni, N. J. (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2745–2753.
- (2) Hider, R. C., and Kong, X. (2011) Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637–657.
- (3) Ratledge, C., and Dover, L. G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941.
- (4) Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M., and Budzikiewicz, H. (2008) Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* 21, 259–271.
- (5) Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M. T., Dell, A., and Abdallah, M. A. (1990) Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals* 3, 155–170.
- (6) Poole, K., and McKay, G. A. (2003) Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* 8, d661–686.
- (7) Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007) A β -strand lock-exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure* 15, 1383–1391.
- (8) Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007) From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J. Mol. Biol.* 68, 398–406.
- (9) Schalk, I. J., Lamont, I. L., and Cobessi, D. (2009) Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* 22, 671–678.
- (10) Adams, H., Zeder-Lutz, G., Greenwald, J., Schalk, I. J., Célia, H., and Pattus, F. (2006) Interaction of TonB with outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 5752–5761.
- (11) Zhao, Q., and Poole, K. (2002) Mutational analysis of the TonB1 energy coupler of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184, 1503–1513.
- (12) Koster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* 152, 291–301.
- (13) Cuiv, P. O., Clarke, P., Lynch, D., and O'Connell, M. (2004) Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *J. Bacteriol.* 186, 2996–3005.
- (14) Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L., Shanzer, A., and Schalk, I. J. (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J. Bacteriol.* 192, 1212–1220.
- (15) Koster, W., and Braun, V. (1986) Iron hydroxamate transport of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the *fhuB* gene and identification of the protein. *Mol. Gen. Genet.* 204, 435–442.
- (16) Koster, W., and Braun, V. (1989) Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* 217, 233–239.
- (17) Braun, V., and Herrmann, C. (2007) Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 6913–6918.
- (18) Staudenmaier, H., Van Hove, B., Yaraghi, Z., and Braun, V. (1989) Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 2626–2633.
- (19) Chenault, S. S., and Earhart, C. F. (1991) Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol. Microbiol.* 5, 1405–1413.
- (20) Matzanke, B. F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein, A. X., and Hantke, K. (2004) FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* 43, 1386–1392.
- (21) Hartman, A., and Braun, V. (1980) Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *J. Bacteriol.* 143, 246–255.
- (22) Brickman, T. J., and McIntosh, M. A. (1992) Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* 267, 12350–12355.
- (23) Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L. A., Graumann, P. L., and Schalk, I. J. (2007) Real-time FRET visualization of ferric-pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J. Biol. Chem.* 282, 2987–2995.
- (24) Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., and Schalk, I. J. (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Report* 2, 412–418.
- (25) Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20440–20445.
- (26) Schalk, I. J., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2002) Recycling of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41, 1663–1671.
- (27) Ravel, J., and Cornelis, P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas*. *Trends Microbiol.* 11, 195–200.
- (28) Llamas, M. A., Mooij, M. J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008) Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* 67, 458–472.
- (29) Ochsner, U., Snyder, A., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8312–8317.
- (30) Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (2002) GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 45, 1277–1287.
- (31) Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 1882–1891.
- (32) Lee, Y. H., Deka, R. K., Norgard, M. V., Radolf, J. D., Hasemann, C. A., Journet, L., Bouveret, E., Rigal, A., Lloubes, R., Lazdunski, C., Benedetti, H., Larsen, R. A., Thomas, M. G., and Postle, K. (1999) *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat. Struct. Biol.* 6, 628–633.
- (33) Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J., and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* 584, 2606–2617.
- (34) Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.
- (35) Chu, B. C., and Vogel, H. J. (2011) A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport. *Biol. Chem.* 392, 39–52.
- (36) Clément, E., Mesini, P. J., Pattus, F., Abdallah, M. A., and Schalk, I. J. (2004) The binding mechanism of pyoverdin with the outer

membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* 43, 7954–7965.

(37) Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M. A., Pattus, F., and Schalk, I. J. (2002) The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 41, 14591–14601.

(38) Schalk, I. J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (1999) Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* 38, 9357–9365.

(39) Xiao, R., and Kisaalita, W. S. (1998) Fluorescent pseudomonad pyoverdines bind and oxidize ferrous ion. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1472–1476.

(40) Loo, J. A. (1997) Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 16, 1–23.

(41) Schalk, I. J., Hannauer, M., and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* 13, 2844–2854.

(42) Leong, J., and Neillands, J. B. (1976) Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 126, 823–830.

(43) Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A. Z., and Abdallah, M. A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* 33, 6391–6402.

(44) Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2001) Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol. Microbiol.* 39, 351–360.

(45) Nader, M., Journet, L., Meksem, A., Guillon, L., and Schalk, I. J. (2011) Mechanism of ferrisiderophore uptake by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane transporter FpvA: no diffusion channel formed at any time during ferrisiderophore uptake. *Biochemistry* 50, 2530–2540.

(46) Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warren, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.

(47) Hoegy, F., Lee, X., Noël, S., Mislin, G. L., Rognan, D., Reimann, C., and Schalk, I. J. (2009) Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent *Pseudomonads*. *J. Biol. Chem.* 284, 14949–14957.

(48) Shirley, M., and Lamont, I. L. (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191, 5634–5640.

(49) Morales, V. M., Backman, A., and Bagdasarian, M. (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* 97, 39–47.

(50) Voisard, C., Bull, C., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., Défago, G., Haas, D. (1994) Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches, in *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms* (O’Gara, F., Dowling, D. N., and Boesten, B., Eds.), pp 67–89, VCH, Weinheim, Germany.

(51) Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., and Haas, D. (1999) Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14073–14078.

(52) Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.

Partie III - Conclusion générale et perspectives

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, le fer est un élément indispensable à la vie. Il a un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques comme la synthèse d'acides nucléiques, la phosphorylation oxydative, le transfert d'électrons ou la respiration. Le fer possède également un rôle clé au niveau de la croissance bactérienne. Pour contourner le problème de biodisponibilité du fer, les microorganismes ont développé des systèmes d'acquisition élaborés. Le mécanisme le plus courant passe par la synthèse et l'excrétion de chélateurs ayant une très forte affinité pour le fer. Le transport de ces complexes au travers de la membrane externe des bactéries Gram-négatives implique des transporteurs TonB-dépendants. Les premières structures de TBDT, exprimés chez *E. coli*, ont été résolues en 1998 et en 2005 seulement quatre structures de TBDT étaient publiées : FepA, FhuA, FecA et BtuB.

Dans la première partie de cette thèse, l'optimisation du protocole de purification du transporteur FpvA, chez *P. aeruginosa*, a permis de résoudre la structure de la forme vide de ce TBDT et de la comparer aux structures des complexes FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe. Le transport de petits composés au travers de la membrane externe est énergie-dépendant et implique une interaction directe entre la protéine TonB et la boîte TonB du TBDT. Ces résultats ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, un mouvement du domaine de signalisation autorisant un échange de brins β qui permet l'interaction de la boîte TonB avec la partie C-terminale de la protéine TonB. Ce mouvement du domaine de signalisation permet également une interaction avec le facteur régulateur FpvR. Ces données montrent qu'il est nécessaire d'avoir plusieurs changements de conformation suite à la liaison du ligand pour permettre sa translocation et l'activation de la cascade de signalisation (Publication n°9). Ces résultats ont été confirmés par des travaux équivalents réalisés sur le transporteur FecA (Mokdad *et al.*, 2012).

Les chapitres 2, 3 et 4 de cette thèse ont été consacrés aux études structurales et fonctionnelles de quatre TBDT de bactéries Gram-négatives. Un protocole efficace allant du clonage à la cristallisation a été mis en place. L'étape délicate de bioproduction a été réalisée à partir de systèmes d'expression homologues ou hétérologues. Une méthode de purification éprouvée, couplée à une approche optimisée du criblage des conditions de cristallisation a tout d'abord permis de

résoudre la structure du transporteur de l'alcaligine, FauA, chez *B. pertussis* à 2,3 Å. Plusieurs jeux de données de diffraction des rayons X ont également été collectés à haute résolution pour plusieurs TBDT (ShuA, FetA, SuxA), validant notre approche expérimentale (Publication n°7).

La co-cristallisation de la forme native du transporteur ShuA, chez *S. dysenteriae*, avec des sels d'atomes lourds a permis d'améliorer la qualité des cristaux et d'augmenter leur pouvoir diffractant. La collecte d'un jeu de données du complexe ShuA-Pb et d'un jeu de données de la forme sélénée de ShuA a permis de déterminer sa structure à une résolution de 2,6 Å. La comparaison de la structure ShuA avec celle du complexe HasR-HasA-hème a permis de proposer un mécanisme de fixation de l'hème par ajustement induit. La coordination de la molécule d'hème par les His-86 et His-420, conservées chez les transporteurs d'hème, viendrait déstabiliser deux réseaux de liaisons hydrogène allant de l'His-86 à la boîte TonB. Ces changements conformationnels permettraient alors l'interaction avec la protéine TonB et l'énergisation du transporteur (Publications n°5 & 6).

Le protocole présenté dans la publication n°7 a permis de résoudre la structure du transporteur de l'énantiopyochéline FetA, exprimé chez *P. fluorescens*. L'analyse de la structure du complexe FetA-EPch-Fe, couplée à des études pharmacologiques et de docking a explicité l'importance de liaisons hydrogène cruciales dans la reconnaissance spécifique du ligand. Ces résultats ont permis de caractériser, pour la première fois, les bases de l'énantiosélectivité au niveau structural (Publication n°3).

Aujourd'hui dans la *Protein Data Bank*, on trouve 47 structures de protéines impliquées dans le transport de complexe ferrique ou autres nutriments au travers de la membrane externe des bactéries Gram-négatives, sous différentes formes (apo ou holo). L'ensemble de ces structures ne représente que 13 TBDT. Mon travail a permis de résoudre la structure de la forme apo d'un de ces transporteurs mais également de trois nouveaux TBDT. Malgré toutes les informations apportées par ces structures, le mécanisme de translocation du ligand au travers de ces transporteurs n'est toujours pas élucidé. La compréhension de ces mécanismes reste un défi important pour les prochaines années. TonB est un élément clé pour le transport de composés *via* les TBDT. La compréhension du mécanisme moléculaire permettant l'énergisation des transporteurs peut permettre aux chimistes organiciens de développer et de vectoriser des inhibiteurs spécifiques de l'interaction

TonB-TBDT, pouvant enrayer le développement de bactéries pathogènes chez l'hôte et stopper l'infection. En parallèle, une stratégie dite du « Cheval de Troie », c'est à dire en couplant un antibiotique à un sidérophore, permettrait d'utiliser les voies de transport du fer pour inhiber la croissance bactérienne et cibler spécifiquement des pathogènes multirésistants aux antibiothérapies actuelles (Noel *et al.*, 2011 ; Zheng *et al.*, 2012). De récents travaux, publiés par Lukacik *et al.* et Patzer *et al.*, montrent que des fusion entre le lysozyme T4 et une toxine bactérienne, comme la pesticine, permettent de dégrader le peptidoglycane des bactéries Gram-négatives en utilisant les voies de transport du fer (Lukacik *et al.*, 2012a ; Lukacik *et al.*, 2012b ; Patzer *et al.*, 2012 ; Lukacik *et al.*, 2013).

Après avoir travaillé sur les transporteurs de la membrane externe, il était intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués en aval, au niveau du périplasme et de la membrane interne. La pyoverdine est un des sidérophores majeurs produits par *P. aeruginosa*. Après la chélation du fer dans le milieu extracellulaire, le complexe Pvd-Fe est transporté au travers de la membrane *via* FpvA. Ensuite, le fer est relargué dans le périplasme par un mécanisme n'impliquant pas de modification au niveau du sidérophore mais apparemment une réduction du fer. FpvCDEF est très probablement le transporteur impliqué dans le transport du fer vers le cytoplasme, après sa dissociation du sidérophore. La particularité de ce transporteur ABC est de posséder deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF. Les travaux réalisés *in vitro* ont montré que ces protéines interagissent en formant des trimères FpvC-FpvF₂ et des tétramères FpvC₂-FpvF₂ capables de lier le sidérophore ou le ferri-sidérophore. Ceci est le premier exemple d'un transporteur ABC impliqué dans l'acquisition du fer par les sidérophores, ayant deux protéines périplasmiques qui interagissent avec le sidérophore ferrique. Ce travail a révélé que le transporteur FpvCDEF est nécessaire à la dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasme (Publication n°1). Cependant il reste à identifier le mécanisme de réduction qui permettrait cette dissociation ainsi que les protéines associées (réductases). Cette étude sera intégrée dans le projet « IronPath » financé par l'ANR à partir de 2013.

L'ensemble de ces travaux a finalement permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes de transport du fer chez les bactéries

Gram-négatives. Aujourd'hui il reste encore de nombreux points à élucider mais les informations recueillies au cours de ces études nous donnent des pistes intéressantes pour la suite. Plus précisément, j'aimerais étudier au niveau moléculaire les interactions entre les protéines périplasmiques et le transporteur FpvA afin de comprendre comment la ferri-pyoverdine passe du site de liaison du TBDT vers les protéines périplasmiques, du transporteur ABC. D'après plusieurs articles (Carter *et al.*, 2006 ; Krewulak & Vogel, 2011), les protéines de liaisons périplasmiques pourraient être présentées au TBDT grâce à la protéine TonB, facilitant ainsi le transport du ligand vers le périplasma. Au laboratoire, nous disposons de souches exprimant le domaine bouchon du transporteur FpvA. Dans les projets futurs, je souhaiterais étudier par des approches biochimiques les interactions entre le domaine bouchon, les protéines de liaisons périplasmiques et la protéine TonB afin de déterminer comment s'effectue le transfert du complexe Pvd-Fe vers les protéines FpvC et FpvF, chez *P. aeruginosa*.

Il y a quelques mois, j'ai obtenu les premiers cristaux des protéines périplasmiques FpvC et FpvF. Je souhaite donc poursuivre les études structurales de ces deux protéines et résoudre la structure de chacun des monomères. Si nous arrivons à les séparer, nous pourrions envisager de résoudre la structure du trimère ou du tétramère. En parallèle, il serait également intéressant d'exprimer, de purifier et de cristalliser le transporteur FpvDE.

De plus, un nouveau complexe de membrane interne (FpvGHJK), impliqué dans la dissociation du ferri-sidérophore, a récemment été identifié au laboratoire. Il sera donc intéressant de déterminer ses partenaires d'interaction pour mieux comprendre le mécanisme global de ce transport chez *P. aeruginosa*.

Annexe

Revue : Sélectivité et stéréosélectivité des transporteurs de sidérophores ferriques

1 Introduction

L'article que je vais présenter dans ce chapitre est une revue qui traite des différentes caractéristiques structurales et fonctionnelles des transporteurs de sidérophores bactériens. Il reprend en grande partie les données présentées dans l'introduction et dans les résultats scientifiques (Chapitres 1 et 2). Pour éviter la redondance d'informations, je ne considérerai ici que le côté sélectif et stéréosélectif de ces systèmes de transport dédiés à l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives. Ce travail a été élaboré en synergie avec le Dr Isabelle SCHALK et le Dr Gaëtan MISLIN, et reprend les données bibliographiques sur ce sujet et une partie des résultats produits par l'équipe au cours des dernières années (Publication n°1 (Schalk *et al.*, 2012a)).

2 Discussion

Le fer est essentiel pour le développement des micro-organismes. Pour acquérir cet élément, ils secrètent des sidérophores dans le milieu extracellulaire et des TBDT sont exprimés au niveau de la membrane externe. Le transport des ferri-sidérophores est énergie dépendant et s'opère grâce à la machinerie TonB. A l'inverse des sidérophores, les TBDT ont des structures très similaires mais leur site de liaison sont très spécifiques et autorisent un certain degré de sélectivité. Des expériences de transport du ^{55}Fe ont montré que chaque TBDT reconnaît et transporte un sidérophore particulier et parfois quelques sidérophores dont la structure est très proche. Un très bon exemple concerne le système de transport du fer par la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*. Chez les *Pseudomonas* fluorescents, chaque espèce produit un type de pyoverdine qui lui est propre et son TBDT associé. La pyoverdine est composée d'un chromophore et d'une partie peptidique (8 à 12 résidus) linéaire, cyclique ou partiellement cyclique (Budzikiewicz, 2004). Les expériences de transport et la résolution de la structure du transporteur FpvA en

complexe avec différentes pyoverdines montrent qu'il existe des reconnaissances croisées et parfois même un transport. Au laboratoire, différents travaux ont indiqués qu'il existait des pyoverdines de haute et de basse affinité, où le mode de coordination du fer est semblable (**Figure 72**). D'après la superposition des structures, les différences d'affinité sont dues à la nature du premier acide aminé de la chaîne peptidique. Malgré les différences observées en terme d'affinité ou de transport, les changements conformationnels observés au niveau de FpvA sont quasiment identiques (Greenwald *et al.*, 2009). Il semble que l'hexacoordination du fer, impliquant le chromophore, soit suffisante pour générer la liaison du ferri-sidérophore sur FpvA.

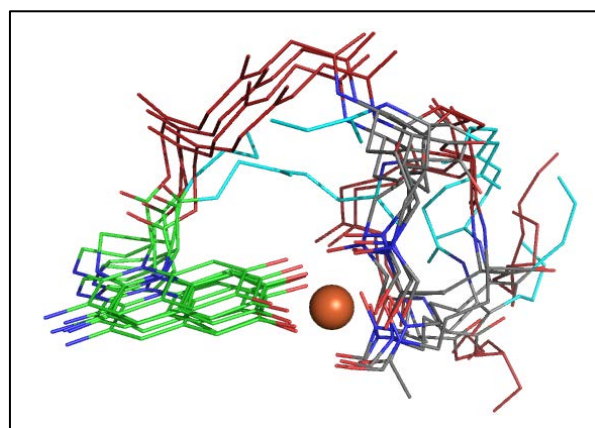


Figure 72 : Superposition des structures de différents complexe pyoverdine-fer lié à FpvA

L'alignement des différentes pyoverdines a été réalisé à partir du « squelette » de FpvA. Le chromophore est représenté en vert, l'atome de fer en sphère de van der Waals orange. La partie peptidique des pyoverdines de haute affinité est représentée en rouge (PvdI, ATCC 13525, DSM 50106, Pfl 18.1) et en cyan pour celle de basse affinité (G173, Pa6).

A partir des structures de TBDT, on observe que la nature des acides aminés, impliqués dans la liaison du ferri-sidérophore, est corrélée aux caractéristiques physico-chimiques du ligand et peut être extrêmement variable. A titre d'exemple, la poche de liaison de FecA est composée de résidus chargés positivement alors que celle des transporteurs comme FhuA ou FptA implique des résidus majoritairement aromatiques (Cobessi *et al.*, 2005a ; Ferguson *et al.*, 2002a ; Ferguson *et al.*, 1998 ; Greenwald, 2009 ; Locher *et al.*, 1998 ; Yue *et al.*, 2003).

Certains TBDT de ferri-sidérophores sont également capable de transporter d'autres composés comme des antibiotiques ou des toxines bactériennes. En effet le transporteur FhuA est capable de lier l'albomycine, un antibiotique basé sur une structure analogue au ferrichrome et contenant plusieurs groupements hydroxamates. L'analogie structurale entre les deux composés explique pourquoi l'albomycine est capable de se lier au transporteur. FhuA est également capable de transporter le composé CGP 4382, un dérivé semi-synthétique de la rifamycine. La structure du

complexe FhuA-CGP 4382 (PDB 1FI1) montre que ce composé occupe le site de liaison de manière analogue au ferrichrome.

Les colicines sont des toxines produites par certaines bactéries et capables de tuer d'autres espèces bactériennes. Les TBDT sont la cible de ces toxines. *E. coli* produit un TBDT Cir capable de lier et de transporter le fer en complexe avec des catécholates linéaires, comme la dihydroxybenzoyl sérine ou des dérivés de céphalosporines. La structure du complexe Cir-colicine I a été résolue en 2007 (Buchanan *et al.*, 2007). De manière surprenante, la colicine se lie au niveau du récepteur Cir en mimant la liaison d'un ferri-sidérophore. La liaison de cette toxine génère également des changements de conformation inhabituels au niveau des boucles L7 et L8 (**Figure 73**). Paradoxalement, la liaison d'antibiotiques et de toxines explicite un surprenant manque de sélectivité de la part des TBDT.

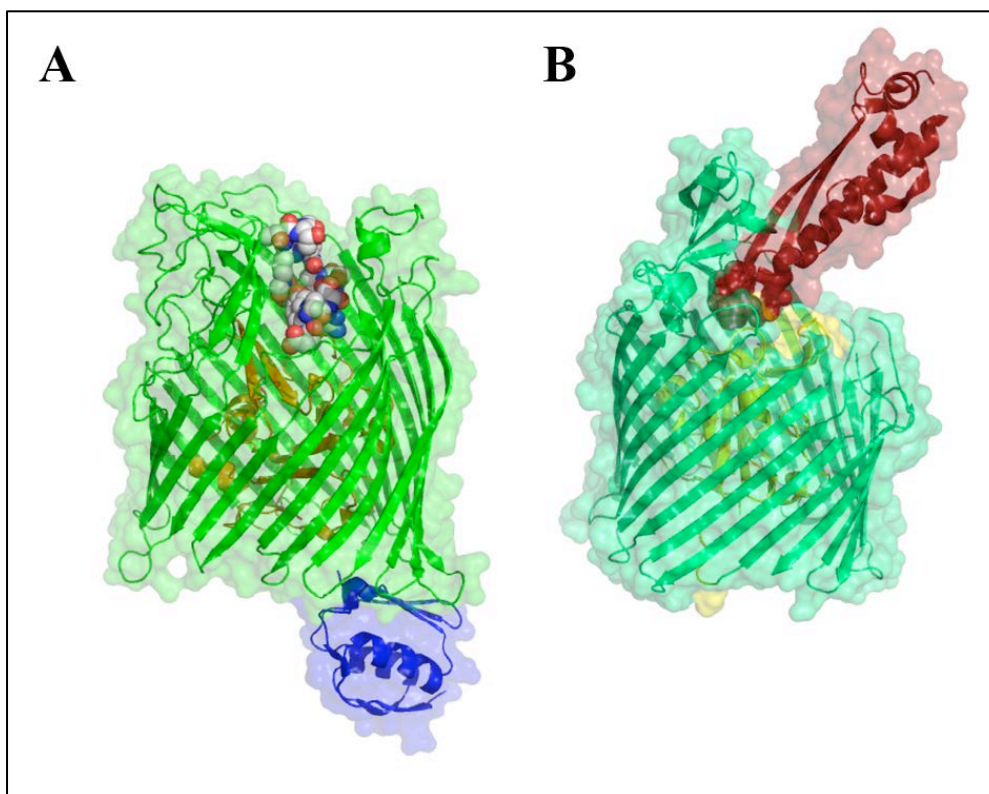


Figure 73 : Structure des complexes FpvA-Pvd-Fe et Cir-colicine I

Comparaison des structures de FpvA-Pvd-Fe (**A**) (PDB 2IAH) et Cir-colicine I (**B**) (PDB 2HDI). FpvA est représentée en vert pour le tonneau, orange pour le domaine bouchon et bleu pour le domaine de signalisation. La ferri-pyoverdine est représentée en sphères de van der Waals. Le transporteur Cir est représenté en turquoise pour le tonneau et jaune pour le domaine bouchon. La colicine est représentée en rouge, et en sphères de van der Waals pour la partie qui interagit avec Cir. La colicine occupe le site de liaison en mimant l'interaction d'un complexe sidérophore-fer.

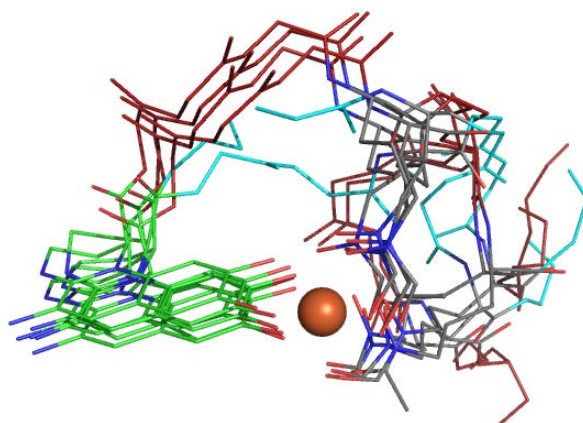
Comme je l'ai décrit dans l'article n°3, la stéréospécificité des voies de transport des ferri-sidérophores a été rapportée pour des ligands tels que la pyochéline, la parabactine, l'acide rhodotorulique, la rhizoferrine, le ferrichrome ou l'entérobactine. L'exemple le mieux décrit à ce jour reste l'importante stéréosélectivité des TBDT de la pyochéline et de l'énantiopyochéline (Brillet *et al.*, 2011).

De nombreux résultats obtenus au laboratoire montre que les sidérophores sont capables de chélater d'autres métaux que le fer (Braud *et al.*, 2009b ; Braud *et al.*, 2009). Cependant, les expériences de liaison montre que l'affinité de transporteurs, comme FpvA ou FptA, est plus forte pour la forme ferrique du sidérophore que pour d'autres complexes métalliques. Au niveau des structures tridimensionnelles qui ont été résolues sous forme holo, le fer est toujours hexacoordiné par le sidérophore et lui seul interagit avec le transporteur. Le chélateur forme une sorte d'enveloppe autour du métal empêchant ainsi son interaction directe avec le TBDT. Ces résultats montrent que les TBDT ne sont pas hautement sélectifs vis à vis du métal transporté. Dans le cas de la voie pyoverdine, chez *P. aeruginosa*, la sélection du métal est en réalité contrôlée par une pompe d'efflux qui exporte les complexes métalliques indésirables pour la bactérie dans le milieu extracellulaire (Hannauer *et al.*, 2012a). Pour toutes les structures résolues à ce jour, l'interaction a lieu entre le transporteur et le sidérophore, aucune interaction n'est mise en jeu avec le métal. Cette tolérance en terme de sélectivité des métaux est probablement commune à l'ensemble de cette famille de transporteur.

L'ensemble des données présentes dans la littérature montre que les protéines de la famille des TBDT se composent toujours d'un tonneau β obstrué par un domaine bouchon. Le transport du ferri-sidérophore est énergie dépendant et implique la machinerie TonB de la membrane interne. Le site de liaison du ligand est spécifique mais autorise parfois la fixation et le transport de composés structuralement proches. Aujourd'hui, 13 structures de TBDT ont été résolues sous leurs formes apo et/ou holo, cependant le mécanisme de translocation du ligand au travers de ces transporteurs n'est toujours pas élucidé, ce qui représente un défi pour les années à venir.

3 Publication : Schalk *et al.*, 2012a, *Curr Top Membr* (Revue)

Schalk, I. J., Mislin, G. L., **Brillet, K.** Structure, function and binding selectivity and enantioselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Curr Top Membr*, 2012, Vol 69, p. 37-66.





Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters

Isabelle J. Schalk¹, Gaëtan L.A. Mislin and Karl Brillet

UMR 7242, Université de Strasbourg–CNRS, ESBS, Boulevard Sébastien Brant, Strasbourg, France

¹Corresponding author: E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr

Contents

1. Introduction	38
2. Siderophores	40
3. Structure of Siderophore–Iron TBDTs	43
4. Binding Sites of Siderophore–Iron TBDTs	48
4.1. Siderophore Selectivity	48
4.2. Siderophore Stereoselectivity	52
4.3. Metal Selectivity	54
4.4. Change of Conformations Induced by Siderophore–Iron Binding to TBDTs	55
5. Siderophore–Iron Transport by TBDTs	57
5.1. Uptake by TBDTs Requires Energy	57
5.2. Mechanism of Siderophore–Iron Translocation across TBDT	58
6. TBDT Are Involved in Signaling Cascades	59
7. Conclusion	60
Acknowledgments	60
References	61

Abstract

To get access to iron, microorganisms produce and release into their environment small organic metal chelators called siderophores. In parallel, they produce siderophore–iron outer membrane transporters (also called TonB-Dependent Transporters or TBDT) embedded in the outer membrane; these proteins actively reabsorb the siderophore loaded with iron from the extracellular medium. This active uptake requires energy in the form of the proton motive force transferred from the inner membrane to the outer membrane transporter via the inner membrane TonB complex. Siderophores produced by microorganisms are structurally very diverse with molecular weights of 150 up to 2000 Da. Siderophore–iron uptake from the extracellular medium by TBDTs is a highly selective and sometimes even stereoselective process, with each siderophore

having a specific TBDT. Unlike the siderophores, all TBDTs have similar structures and belong to the outer membrane β -barrel protein superfamily. The way in which the siderophore–iron complex passes through the TBDT is still unclear. In some bacteria, TBDTs are also partners of signaling cascades regulating the expression of proteins involved in siderophore biosynthesis and siderophore–iron acquisition.



1. INTRODUCTION

Iron is an essential element for almost all forms of life. The oxidation state of iron can change, reversibly, and it can coordinate and activate oxygen. These properties have resulted in iron being a cofactor of various enzymes involved in key metabolic processes, including ATP synthesis, nucleotide biosynthesis, and DNA replication, transcription and repair (Drakesmith & Prentice, 2008). The paradox of this essential metal is its extremely low solubility in aerobic and physiological environments. The presence of oxygen rapidly oxidizes iron(II) into insoluble ferric oxyhydroxides with a solubility product of 10^{-39} . In the host during infections, iron is also poorly bioavailable for pathogens, because it is always in complex with biological macromolecules, for example hemes, ferritins (iron storage proteins), transferrin and lactoferrin (two proteins involved in iron transport). Thus, iron concentrations in various bacterial environments are estimated between 10^{-9} and 10^{-18} M (Raymond, Dertz, & Kim, 2003). To overcome this problem of iron bioavailability, microorganisms produce and use siderophores, small molecular weight iron chelators secreted into the environment. The function of siderophores is to allow iron uptake by microbial cells. Siderophores have a high affinity for iron(III) and are consequently able to solubilize iron from the bacterium's environment and to compete with the host's iron-chelating proteins. The siderophore–iron complexes formed are then transported back into the bacterial cytoplasm by specific transporters.

The Gram-negative bacterial envelope is composed of outer and inner membranes separated by a periplasm. Small molecules of molecular weight lower than 600 Da can cross the outer membrane (from the extracellular medium into the periplasm) by passive diffusion through porins (Nikaido, 2003). Siderophore–iron complexes are transported across the outer membrane by TBDTs (TonB-dependent transporters). These transporters are required by Gram-negative bacteria for uptake of compounds of molecular weight higher than 600 Da and/or present at low concentrations in the bacterial cell's environment. This uptake is energy dependent. The proton motive force of the inner membrane is used to activate the TBDTs

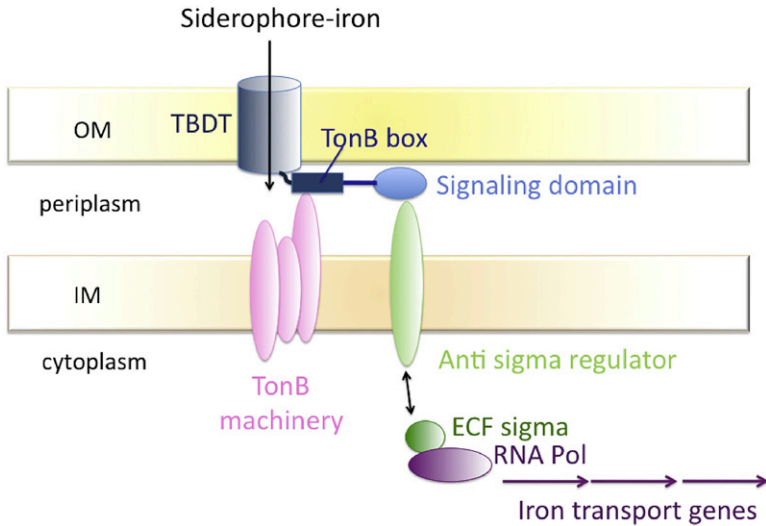


Figure 1 TBDTs are involved in siderophore–iron uptake and, in some cases, in signaling cascades regulating expression of genes involved in iron acquisition. Siderophore–iron complexes from the extracellular medium are recognized by their corresponding specific TBDT, which serves to transport the siderophore–iron complex into the periplasm. Some TBDTs are also involved in signaling cascades regulating the transcription of genes encoding proteins involved in iron uptake. This signaling cascade is initiated by the binding of the siderophore–iron complex to the TBDT, and involves several components: the N-terminal signaling domain of the TBDT, the inner membrane sigma regulator protein and the cytoplasmic extracytoplasmic function (ECF) sigma factor. Both transport and induction functions require energy transduction from the TonB machinery in the inner membrane. For color version of this figure, the reader is referred to the online version of this book.

via an inner membrane complex called the TonB machinery (Fig. 1) (Postle & Larsen, 2007). Once in the periplasm, the fate of siderophore–iron complexes depends on the siderophore and bacterium. Iron can be released from the siderophore in the periplasm, as for example in the pyoverdine pathway in *Pseudomonas aeruginosa* (Greenwald et al., 2007; Schalk, Abdallah, & Pattus, 2002; Yeterian, Martin, Lamont, & Schalk, 2010) or transported across the inner membrane into the cytoplasm by either ABC transporters or permeases (Cuiv, Clarke, Lynch, & O’Connell, 2004; Hannauer, Barda, Mislin, Shanzer, & Schalk, 2010; Koster, 2001). Iron release from the siderophore in the periplasm or cytoplasm involves the reduction of the iron and/or degradation or modification of the siderophore (Brickman & McIntosh, 1992; Hartman & Braun, 1980; Matzanke, Anemuller, Schunemann, Trautwein, & Hantke, 2004). Iron uptake has to be tightly

controlled because an excess of free iron can catalyze the generation of highly reactive oxygen and nitrogen intermediates that damage biological macromolecules. Therefore, expression of the proteins involved in siderophore biosynthesis and in siderophore–iron uptake is tightly regulated by the intracellular concentration of iron (Braun & Braun, 2002; Fleischhacker & Kiley, 2011; Visca, Leoni, Wilson, & Lamont, 2002).

This review focuses only on the transport of siderophore–iron complexes from the extracellular medium into the bacterial periplasm by TBDTs. We first consider some examples of siderophores and describe the chemical and structural diversities of these compounds. Then, the structures of TBDTs solved to date are presented, and the specificity of the recognition between siderophore–iron complexes and TBDT-binding sites will be addressed. Mechanistic models of siderophore–iron translocation across the outer membrane by TBDT are discussed and the involvement of these proteins in signal cascades considered.



2. SIDEROPHORES

More than 500 different siderophores have now been identified and 270 are characterized structurally (for a review on siderophores, see Boukhalfa & Crumbliss, 2002; Hider & Kong, 2011). These compounds are organic chelators produced by microorganisms, fungi and plants to make iron accessible (Hider & Kong, 2011). They all have a low molecular weights (150–2000 Da), and present a high and specific affinity for iron(III).

The high affinity and selectivity of siderophores for Fe(III) is due to (i) stringent selection of metal-binding groups, (ii) the number of binding units, and (iii) their stereochemical arrangement. Oxygen atoms are the best donors for iron(III) coordination and the most common geometry for iron(III) coordination is octahedral with six heteroatoms arranged around the iron center (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). This octahedral coordination favors the formation of the thermodynamically stable high-spin iron(III) species. The oxygen atoms of the siderophore are organized into bidentate functions, such as catechols, hydroxamates and α -hydroxycarboxylates (Fig. 2) (Hider & Kong, 2011). In some siderophores, nitrogen is also involved as donor atom, but in such structures, the affinity for iron(III) tends to be lower (Hider & Kong, 2011). The hexadentate structure is the most common siderophore form, with a mixture of coordination ligands (mostly hydroxamate and catechol functions) attached to either linear or cyclic

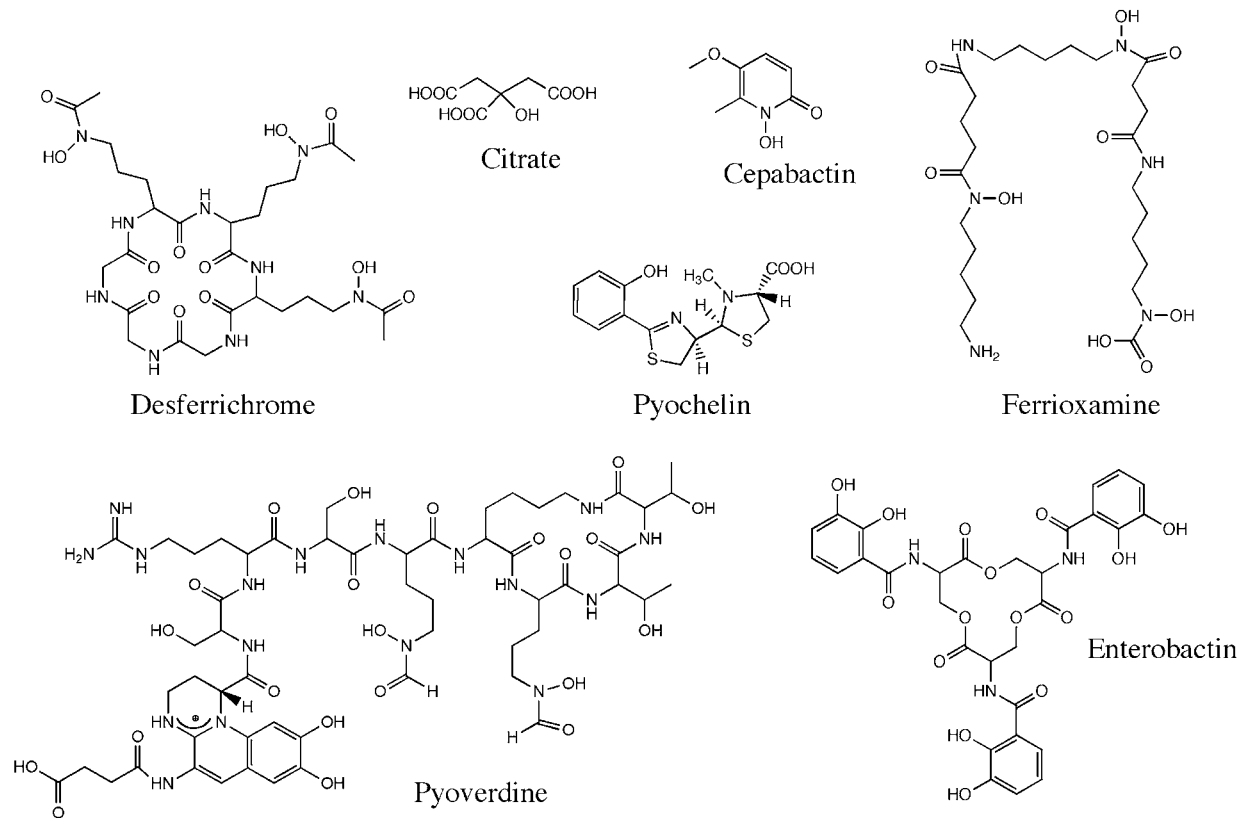


Figure 2 Structures of representative siderophores.

structures (Fig. 2). Siderophores with lower denticity (tetradentate, tridentate and bidentate) are also produced by microorganisms, but these chelators cannot alone achieve full Fe(III) coordination and complexes with higher siderophore:Fe(III) stoichiometry have been described (Fig. 2) (Spasojevic, Boukhalfa, Stevens, & Crumbliss, 2001).

In general, hexadentate siderophores have a much higher affinity for Fe(III) than do tetradentate siderophores, which have a higher iron affinity than bidentate siderophores (Albrecht-Gary & Crumbliss, 1998). All siderophores possess a higher affinity for iron(III) than for iron(II). For example, desferrioxamine B, a hexadentate siderophore with three hydroxamate units, has an affinity for iron(III) that is 20 orders of magnitude higher than that for iron(II) (Helman & Lawrence, 1989).

For many siderophores, a large range of closely related structures have been reported. For example, more than 60 analogues of pyoverdines (Fuchs, Schafer, Geoffroy, & Meyer, 2001) have been reported, and 21 analogues of desferriochrome, 21 analogues of enterobactin and 20 analogues of ferrioxamines have been described (Hider & Kong, 2011). In siderophore structures, it is very common to find D-amino acids, unusual amino acids like ornithine, and N- and C-terminal blocked peptides, and these residues provide resistance to peptidase and to other lytic enzyme activities. Also a specific feature of siderophores produced by marine bacteria is the presence of one or two fatty acyl chains (Butler, 2005; Martinez *et al.*, 2003; Xu, Martinez, Groves, & Butler, 2002); consequently, these chelators are surface active and tend to form molecular micelles (Butler, 2005; Martinez *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2002).

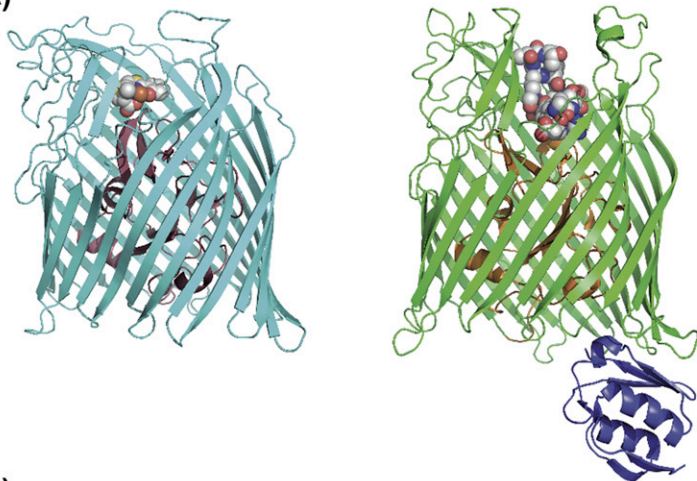
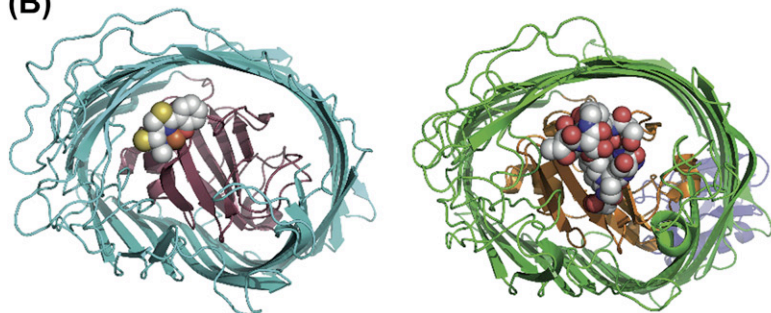
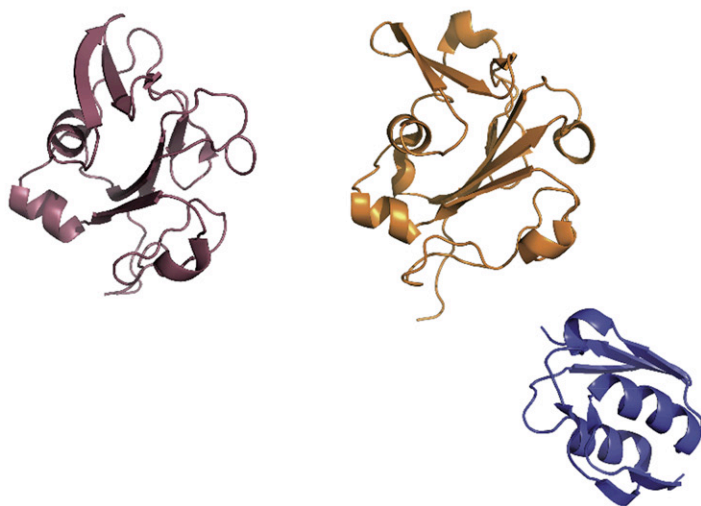
Most bacteria are able to produce several siderophores of different chemical structures and to use in addition heterologous siderophores (siderophores produced by other microorganisms). For example, *P. aeruginosa* produces two major siderophores, pyoverdine and pyochelin (Fig. 2), but is able to use at least five heterologous siderophores: cepabactin, ferriochrome, enterobactin, ferrioxamine and citrate (Hannauer *et al.*, 2010; Llamas *et al.*, 2006; Mislin *et al.*, 2006; Schalk, 2008). Why bacteria synthesize and use multiple siderophores is still unclear. It does, however, incontestably illustrate the high importance of iron for microorganisms, and is presumably a mechanism driven by evolution. It has been proposed that this diversity results from the interplay between siderophore-producing and nonproducing microorganisms: when there are many non-producers exploiting a siderophore, it is beneficial to produce a siderophore unusable by the dominant population (Lee, van Baalen, & Jansen, 2012).



3. STRUCTURE OF SIDEROPHORE–IRON TBDBTS

TBDBTs are located in the bacterial outer membrane and their biological function is to import nutriment, and especially siderophore–iron complexes, from the extracellular medium. These transporters are characterized by a very stringent siderophore selectivity. This is associated with a strong correlation between the number of siderophores able to be used by a bacterium and the number of genes encoding iron-regulated TBDBTs in its genome. Genome sequencing has revealed that many bacteria have numerous genes encoding these transporters, but not all are involved in iron acquisition (Blanvillain et al., 2007; Schauer, Gouget, Carriere, Labigne, & de Reuse, 2007). In the *P. aeruginosa* genome, there are 32 genes coding for TBDBTs but only 11 seem to be involved in iron uptake (Llamas et al., 2006). *Escherichia coli* has seven genes coding for siderophore–iron TBDBTs. The different siderophore–iron TBDBTs share 20–45% sequence homology and two major groups can be identified. Members of the first group are composed of only two domains, a β -barrel domain and a plug domain (Fig. 3), and these transporters are only involved in siderophore–iron transport processes. The second group has an additional periplasmic domain called the signaling domain (Fig. 3); this domain is not involved in siderophore–iron uptake but plays a key role in the signaling cascade regulating the expression of proteins involved in siderophore biosynthesis and siderophore–iron uptake (Fig. 1) (Braun & Braun, 2002; Visca, 2004). An important conserved sequence of about seven residues, corresponding to the so-called TonB box, is found in the N-terminal part of the plug domain of proteins of group 1 and between the plug and the signaling domain of the proteins of group 2. This TonB box is necessary for TBDBTs to become active: it is required for siderophore–iron complex transport from the extracellular medium into the periplasm and, for TBDBTs of group 2, for activation of the signaling cascade (Shirley & Lamont, 2009). Indeed, deletion of this small region abolishes both transport and activation of the signaling cascade (Shirley & Lamont, 2009).

The first three structures of TBDBTs were published at the end of 1998 and beginning of 1999: two structures of FhuA (Ferguson, Hofmann, Coulton, Diederichs, & Welte, 1998; Locher et al., 1998) and one of FepA (Buchanan et al., 1999), the *E. coli* ferrichrome and ferrienterobactin TBDBTs, respectively. The structures of 12 more TBDBTs have been solved

(A)**(B)****(C)**

since then: six are siderophore–iron TBDTs (FecA, FpvA, FptA, FetA, Cir and FauA, [Table 1](#)), three are involved in the uptake of other compounds (vitamin B12 and heme) and one is apparently also involved in iron uptake (FrpB) but its siderophore has not been identified yet ([Table 1](#)). In addition, the structures have been solved of these TBDTs in various loading states, and for two of them bound to the periplasmic domain of TonB (FhuA and BtuB, the ferrichrome and vitamin B12 TBDTs in *E. coli*, respectively; [Table 1](#)). All these structures are composed of a 22-stranded antiparallel transmembrane β -barrel ([Fig. 3](#)). The lumen of the barrel is filled with the N-terminal globular domain (named plug, hatch or cork) and the binding site is always located on the extracellular face of the transporter, exposed to the solvent, and is constituted by residues of both the plug and the β -barrel domains.

The barrel domain of TBDTs is around 70 Å in height and most transmembrane strands extend beyond the outer leaflet of the bilayer. The tilt of the β -strands relative to the axis of the barrel is always around 45°. The β -strands of the transmembrane barrel are connected by 11 long and flexible extracellular loops and 10 periplasmic turns. The length and amino acid content of the extracellular loops differ between transporters and may play a role in ligand recognition and binding (see below).

The plug domains of TBDTs are mostly a mixed four-stranded β -sheet with surrounding loops and helices. They are globular in form and occlude the lumen of the β -barrel thereby preventing direct passage of the siderophore–iron complex across the barrel. One region of the plug domain is exposed to the periplasm and the other to the extracellular medium and participates in the ligand-binding site. The plug domain is kept in place in the β -barrel by 40–70 hydrogen bonds and two salt bridges involving four highly conserved residues: two Arg residues of the plug and two conserved Glu in the barrel domain ([Chimento, Kadner, & Wiener, 2005](#); [Wiener,](#)

Figure 3 Structure of FptA (left) and FpvA (right), the *P. aeruginosa* pyochelin–iron and pyoverdine–iron TBDTs, respectively ([Brillet et al., 2007](#); [Wirth et al., 2007](#)). Both transporters are loaded with their corresponding siderophore–iron complex. The β -barrel is colored in cyan in FptA and in green in FpvA, the plug domains are shown in purple (FptA) and in orange (FpvA) and the signaling domain in blue. The TonB boxes are disordered in both structures. The pyochelin– and pyoverdine–iron complexes are displayed in van der Waals spheres. (A) Overall side view of FptA and FpvA. (B) Overall top (extracellular) view. (C) Structure of the plug domains with the signaling domain for FpvA (side view). All the drawings in this review were prepared using PyMol. See the color plate.

Table 1 Known structures of TBDT involved in siderophore–iron transport

Origin	TBDT	Ligand or protein in complex	Resolution (Å)	PDB code	Reference
<i>E. coli</i>	FhuA	No ligand	2.50	2FCP	Ferguson et al. (1998)
<i>E. coli</i>	FhuA	No ligand	2.50	1QFG	Ferguson, Braun, et al. (2000)
<i>E. coli</i>	FhuA	No ligand	2.70	1BY3	Locher et al. (1998)
<i>E. coli</i>	FhuA	Ferrichrome	2.70	1QFF	Ferguson, Welte, et al. (2000)
<i>E. coli</i>	FhuA	Ferrichrome	2.60	1BY5	Locher et al. (1998)
<i>E. coli</i>	FhuA	Ferrichrome	2.70	1FCP	Ferguson et al. (1998)
<i>E. coli</i>	FhuA	Albomycin	3.10	1QKC	Ferguson, Braun, et al. (2000)
<i>E. coli</i>	FhuA	Rifamycin	2.90	1FI1	Ferguson et al. (2001)
<i>E. coli</i>	FhuA	Phenylferricrocin	2.95	1QJQ	Ferguson, Braun, et al. (2000)
<i>E. coli</i>	FhuA	TonB	3.30	2GRX	Pawelek et al. (2006)
<i>E. coli</i>	FecA	No ligand	2.50	1PNZ	Yue et al. (2003)
<i>E. coli</i>	FecA	No ligand	2.00	1KMO	Ferguson et al. (2002)
<i>E. coli</i>	FecA	Dicitrate	2.15	1PO0	Yue et al. (2003)
<i>E. coli</i>	FecA	Dicitrate–iron	2.50	1KMP	Ferguson et al. (2002)
<i>E. coli</i>	FecA	Dicitrate–iron	3.40	1PO3	Yue et al. (2003)
<i>E. coli</i>	FepA	No ligand	2.40	1FEP	Buchanan et al. (1999)
<i>E. coli</i>	Cir	No ligand	2.65	2HDF	Buchanan et al. (2007)

<i>E. coli</i>	Cir	Colicin Ia-R	2.50	2HDI	Buchanan et al. (2007)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	No ligand	2.77	2O5P	Brillet et al. (2007)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	No ligand	2.90	2W75	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine	3.60	1XKH	Cobessi, Célia, Folschweiller, et al. (2005)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine—iron	2.73	2IAH	Wirth et al. (2007)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine—iron	2.71	2W16	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine _{DSM50106} —iron	2.90	2W6T	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine _{G173} —iron	3.00	2W6U	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine _{Pa6} —iron	2.80	2W76	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine _{PH18.1} —iron	2.90	2W77	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FpvA	Pyoverdine _{ATCC13535} —iron	3.00	2W78	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FptA	Pyochelin—iron	2.00	1XKW	Greenwald et al. (2009)
<i>P. aeruginosa</i>	FetA	Enantio-pyochelin—iron	3.26	3QLB	Brillet et al. (2011)
<i>N. meningitidis</i>	FrpB	No ligand	2.40	/	Salem et al. (2012)
<i>B. pertussis</i>	FauA	No ligand	2.33	3EFM	Brillet, Meksem, Lauber, Reimann, and Cobessi (2009)

E. coli, *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *N. meningitidis*, *Neisseria meningitidis*; *B. pertussis*, *Bordetella pertussis*; FhuA, TBDT of ferrichrome; FecA, TBDT of citrate—iron; FepA, TBDT of enterobactin—iron; Cir, TBDT of iron complex of dihydroxybenzoylserine; FpvA, TBDT of pyoverdine—iron; FptA, TBDT of pyochelin—iron; FetA, TBDT of enantio-pyochelin—iron; FrpB, TBDT of an unknown siderophore—iron complex; FauA, TBDT of alcaligin—iron.

2005). Several other conserved motifs are found in all TBDT structures (Chimento *et al.*, 2005; Noinaj, Guillier, Barnard, & Buchanan, 2010; Wiener, 2005): TEE, PGV, IRG box, LIDG box, RP box and the H β 4 motifs. In all TBDT structures, the plug is highly solvated inside the barrel pore (Chimento *et al.*, 2005).

The conserved TonB box is located at the beginning of the plug domain on the periplasmic face of the TBDT and has either ordered or disordered conformations. However, no good correlation between the siderophore–iron loading status of the TBDT and the conformation of its TonB box has been demonstrated. (Fanucci, Lee, and Cafiso 2003) suggest that the conformation of this small domain may be very sensitive to its environment, and to solutes used during crystallization (Freed, Horanyi, Wiener, & Cafiso 2010).

Some TBDTs have an additional N-terminal domain, upstream from the plug domain and called the signaling domain. The signaling domain structure has only been observed *in situ* in FpvA (TBDT of *P. aeruginosa*) loaded or not loaded with pyoverdine–iron (Fig. 4) (Brillet *et al.*, 2007; Wirth, Meyer-Klaucke, Pattus, & Cobessi, 2007). For FecA and PupA (citrate–iron and pseudobactin–iron TBDTs in *E. coli* and *Pseudomonas putida*, respectively), this domain was cloned without the rest of the protein and the 3D structure solved by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Ferguson *et al.*, 2007). The overall folding of this domain is well conserved and involves two α -helices sandwiched between two β -sheets (Fig. 4D and E). In FpvA, the signaling domain is linked to the plug by a long flexible loop called the connecting loop and containing the TonB box (Fig. 4A). In FpvA structures, the signaling domain moves between the two positions depending on the loading status of the transporter (Fig. 4A–C), suggesting that it is highly flexible probably because of the long connecting loop.



4. BINDING SITES OF SIDEROPHORE–IRON TBDTs

4.1. Siderophore Selectivity

The high siderophore selectivity of TBDTs was demonstrated in the 1990s by work based on siderophore–⁵⁵Fe uptake assays and mutagenesis. Each TBDT recognizes and transports a specific siderophore, in some cases a few structurally related siderophores, but never siderophores with different chemical structures. Over the last 10 years, the resolution of several TBDT

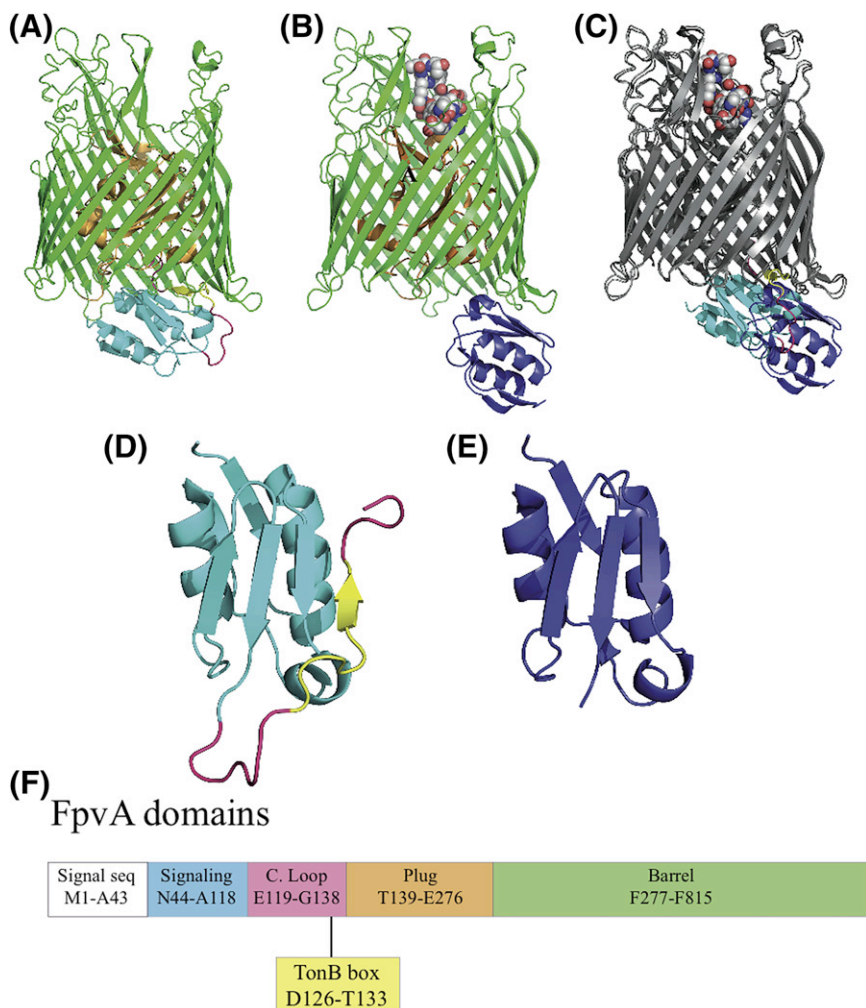


Figure 4 *Conformational change in the signaling domain of FpvA upon binding of pyoverdine-iron (Brillet et al., 2007).* The β -barrel and plug domains are colored in green and orange, respectively, in A and B. The signaling domain of apo FpvA and FpvA-pyoverdine-iron are cyan and blue, respectively. The connecting loop and TonB box are only visible in the apo FpvA structure and are in pink and in yellow, respectively. The pyoverdine-iron complexes are displayed in van der Waals spheres (A) Side view of apo FpvA. (B) Side view of FpvA-pyoverdine-iron. (C) Superimposition of apo FpvA and FpvA-pyoverdine-iron. (D) View of the signaling domain in FpvA. (E) View of the signaling domain in FpvA-Pvd-Fe. (F) The different FpvA domains: Signal seq., signal sequence; Signaling, signaling domain, C. loop, connecting loop; Plug, plug domain and barrel, barrel domain. See the color plate.

structures has revealed that the binding site is always located in the lumen on the extracellular face of the transporter and is composed of residues of the barrel and the plug domains. This rule applies to all known TBDT structures, whatever the siderophore recognized and transported. In all cases, the binding affinity is in the range of 0.1–5 nM (Clément, Mesini, Pattus, Abdallah, & Schalk, 2004; Hoegy *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 1997; Schalk *et al.*, 2001) and the binding kinetics are often biphasic (Clément *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 1997). This binding is energy independent: the TBDT is able to bind its corresponding siderophore–iron complex even in the absence of any proton motive force and TonB expression, but no uptake occurs (Clément *et al.*, 2004; Hoegy *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 1997; Schalk *et al.*, 2001). The nature of the amino acids involved in binding sites allowing specific siderophore recognition differs between TBDTs. For example, the citrate–iron recognition binding pocket of FecA is lined with positively charged residues (Ferguson *et al.*, 2002; Yue, Grizot, & Buchanan, 2003), whereas the corresponding regions of FhuA and FptA (ferrichrome and enterobactin–iron TBDTs in *E. coli*) are predominantly lined with aromatic residues (Cobessi, Celia, & Pattus, 2005; Ferguson *et al.*, 1998; Locher *et al.*, 1998).

Uptake assays and TBDT structures indicate that some transporters are able to transport structurally related siderophores. The best examples of this are the pyoverdine–iron uptake pathways in fluorescent *Pseudomonads*. Each strain produces its own pyoverdine, composed of an aromatic chromophore derived from 2,3-diamino-6,7-dihydroquinoline, linked to a peptide of 8–12 residues. The peptide part is unique to each strain. Some are linear, others partially or entirely cyclic, and their composition and length are specific to the producer strain (Budzikiewicz, 2004). The production of a specific pyoverdine goes in *Pseudomonads* with the expression of a corresponding TBDT. Uptake assays using ^{55}Fe have shown that these different pyoverdine/TBDT pathways are highly specific with very little cross recognition or cross uptake (Meyer *et al.*, 2002). The structure of the pyoverdine–TBDT, FpvA from *P. aeruginosa*, has been solved in complex with its own pyoverdine–iron complex and with non-cognate pyoverdines of high or low affinity (Greenwald *et al.*, 2009). ^{55}Fe uptake by FpvA was found only with pyoverdines of high affinity (Greenwald *et al.*, 2009). Surprisingly, all siderophores tested induced nearly the same conformational changes in FpvA and the chromophore; the iron and its chelating groups in the various pyoverdine–iron complexes have equivalent configurations in all structures solved (Fig. 5). Presumably, this is

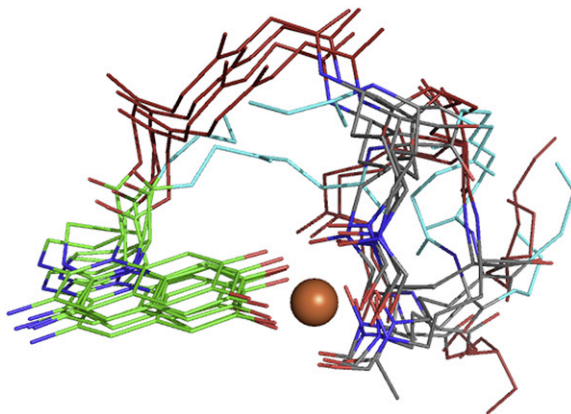


Figure 5 *Overlay of the different pyoverdine–iron complexes bound to FpvA (Greenwald et al., 2009).* The alignment was performed using only the FpvA backbone. For clarity, only the backbones of the pyoverdine peptides are represented. The chromophore ring (green) and the side chain of the modified amino acids involved in iron chelation (gray) are shown as sticks, with nitrogen in blue and oxygen in red. The iron atoms are represented as orange spheres. The color code is red for the high-affinity pyoverdines (PVDI, ATCC 13525, DSM 50106 and Pfl 18.1) and cyan for the low-affinity pyoverdines (G173 and Pa6). See the color plate.

because iron coordination obeys the same rules in all pyoverdine–iron complexes. A close relationship between transporter–siderophore–iron structures and the measured affinities was found not in the FpvA structures but in the different pyoverdine structures. The high- and low-affinity binders could be distinguished on the basis of the structure of the first amino acids of the pyoverdine peptide chain (Fig. 5), whereas the structure of the C-terminal portion of the siderophores, often cyclic, does not appear to make any large contribution to the interaction between the siderophore and the FpvA. According to these structures, the iron with its six dentates (involving the chromophore) seems to be the first element to position itself in the FpvA site, and then the peptide moiety positions according to its sequence and to its affinity for the binding site. FpvA has the same conformation in all seven pyoverdine–iron structures, so probably only the chromophore, the iron and its chelating groups cause the change of conformation observed in FpvA.

Some TBDTs are also able to bind and transport ligands other than siderophores, including in some cases antibiotics. The structures of FhuA (ferrichrome TBDT in *E. coli*) bound to albomycin and rifamycin have been solved (Ferguson, Braun, et al., 2000; Ferguson et al., 2001). These

antibiotics bind to the ferrichrome binding pocket in FhuA. Albomycin is an antibiotic that consists of a hydroxamate-type iron-chelating siderophore, structurally analogous to ferrichrome, and an antibiotically active, thiribosyl pyrimidine moiety (Ferguson, Braun, *et al.*, 2000). This similarity between ferrichrome and albomycin explains why this antibiotic is able to bind to FhuA binding pocket. FhuA also transports the semisynthetic rifamycin derivative CGP 4832, although the chemical structure of this antibiotic differs markedly from that of ferrichrome. The X-ray structure reveals that rifamycin CGP 4832 occupies the same ligand-binding site as ferrichrome and albomycin, thus demonstrating a surprising lack of selectivity of FhuA for this molecule.

TBDTs actively transport siderophores and siderophore–antibiotic conjugates like albomycin, but are also the targets of bacterial toxins including the colicins and bacteriophages. Colicins are large toxic peptides secreted by certain bacterial strains to kill other bacteria (for a recent review, see Cascales *et al.*, 2007). The structure of *E. coli* TBDT Cir in complex with colicin I has been solved (Buchanan *et al.*, 2007). Interestingly, the receptor-binding domain of colicin I (protein of 69 kDa) mimics siderophore binding by sitting in the binding pocket at approximately the same depth as metal chelates (Fig. 6) and like siderophore–iron complexes forms hydrogen bonds with residues of the plug domain. The binding of colicin I also induces a large unusual movement in extracellular loops L7 and L8: these loops move to open outward by 37° as compared with the same loops in the uncomplexed Cir structure.

4.2. Siderophore Stereoselectivity

Stereospecificity of siderophore-dependent iron uptake pathways has been reported for the following siderophores: pyochelin, parabactin, rhodotorulic acid, rhizoferrin, ferrichrome and enterobactin (Bergeron, Dionis, Elliott, & Kline, 1985; Bergeron, Xin, Weimar, Smith, & Wiegand, 2001; Drechsel, Jung, & Winkelmann, 1992; Muller, Isowa, & Raymond, 1985; Münzinger *et al.*, 1999; Neilands, Erickson, & Rastetter, 1981; Winkelmann, 1979). The best example is pyochelin, a thiazoline-containing siderophore with three chiral centers, produced by *P. aeruginosa* (Hoegy *et al.*, 2009). *Pseudomonas fluorescens* produces enantio-pyochelin, the same molecule but with the opposite configuration for the three asymmetric centers (Youard, Wenner, & Reimann, 2011). Enantio-pyochelin promotes growth under iron limitation of *P. fluorescens*, but not that of *P.*

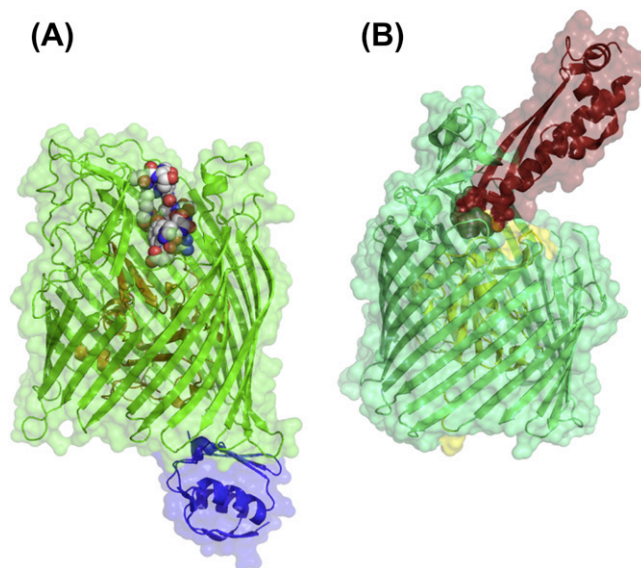


Figure 6 *Pyoverdine–iron in its binding site on FpvA and interaction between colicin I and the Cir-binding site (Buchanan et al., 2007).* FpvA is in green (barrel), orange (plug) and blue (signaling domain). Cir is colored in dark green (barrel) and yellow (plug) and colicin in red and the region of colicin interacting with Cir is represented in van der Waals spheres. The region of colicin I interacting with CirA mimics siderophore–iron binding and sits at approximately the same depth in the binding site as siderophore–iron in the structures of other TBDTs. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this book.

aeruginosa (Hoegy et al., 2009). Reciprocally, pyochelin promotes growth of *P. aeruginosa* but is not functional for *P. fluorescens* (Hoegy et al., 2009). After iron chelation in the extracellular medium, pyochelin–Fe(III) and enantio-pyochelin–Fe(III) are recognized and transported by their specific outer membrane transporters: FptA in *P. aeruginosa* and FetA in *P. fluorescens* (Hoegy et al., 2009). The two TBDTs share little sequence identity but substantial structural similarities, and surprisingly the pyochelin and enantio-pyochelin binding pockets do not share any structural similarity but display similar physicochemical properties (Brillet et al., 2011; Cobessi, Celia, & Pattus, 2005). Structural analysis of FetA–enantio-pyochelin–Fe(III) and FptA–pyochelin–Fe(III) combined with mutagenesis and docking studies revealed that the stereospecific recognition of both enantiomers by their corresponding transporters is determined by the configuration of the siderophore’s chiral C4'' center (Fig. 7) (Brillet et al., 2011; Cobessi, Celia, & Pattus, 2005; Hoegy et al., 2009). This recognition

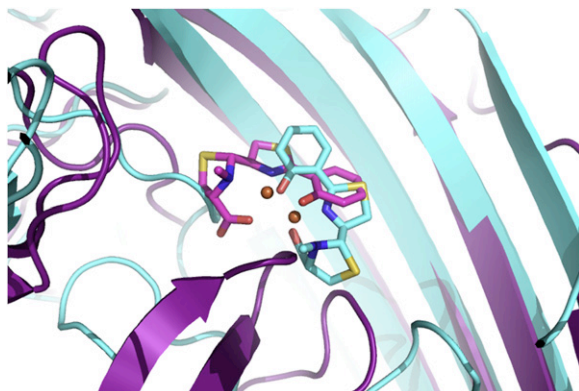


Figure 7 *Superimposition of FptA–pyochelin–iron and FetA–enantio-pyochelin–iron showing the location and conformation of the siderophore–iron complexes in their corresponding binding sites (Brillet et al., 2011; Cobessi, Celia, & Pattus, 2005).* FptA and FetA are colored purple and cyan, respectively. Pyochelin and enantio-pyochelin are in purple and cyan, respectively. The iron ion is orange. See the color plate.

involves specific hydrogen bonds between the Arg91 guanidinium group and enantio-pyochelin–Fe for FetA and between the Leu117–Leu116 main chain and pyochelin–Fe for FptA. FetA and FptA are the first TBDTs to be structurally described with opposing binding enantioselectivity for their ligands.

Stereochemistry also appears to be important for the interaction of pyoverdine–iron to its transporter, FpvA. The 3D structure of pyoverdine–Ga(III) was determined by NMR and reveals the presence in solution of two interchanging conformations of the siderophore upon binding of the gallium(III) ion (Wasielewski et al., 2008). Both conformers are present with roughly equivalent populations. The conformational interchange involves a stereoisomerization of the metal-binding coordination accompanied by a change in the global shape of the complex (Wasielewski et al., 2008). In the crystal structures of the various FpvA–pyoverdine–iron complexes determined (Greenwald et al., 2009; Wirth et al., 2007), only the Λ -4 configuration was observed, revealing a conformer selectivity of the binding site.

4.3. Metal Selectivity

There are extensive data showing that siderophores are able to chelate metal cations other than iron (Braud, Hoegy, Jezequel, Lebeau, & Schalk, 2009; Braud, Geoffroy, Hoegy, Mislin, & Schalk, 2010; Chen, Jurkewitch,

Bar-Ness, & Hadar, 1994; Hernlem, Vane, & Sayles, 1996; Neubauer, Nowack, Furrer, & Schulin, 2000). Binding experiments have shown that FpvA and FptA (pyoverdine–iron and pyochelin–iron TBDTs in *P. aeruginosa*) are able to bind their corresponding siderophore when complexed with metals other than iron (Braud, Hannauer, Mislin, & Schalk, 2009; Hannauer et al., 2012; Schalk et al., 2011). The affinities are highest for the ferric form of the siderophore and lower for complexes between siderophores and aluminum(III), manganese(II) or silver(I). In all TBDT structures solved, iron is always hexacoordinated by the siderophore and the transporter interacts only with the chelator, which forms like a shell around the metal. This absence of direct interaction between TBDTs and the metal chelated by siderophores probably explains the large metal specificity of this transporter. Uptake assays have shown that FpvA and FptA are both able to transport metals other than iron. Co^{2+} , Ga^{3+} and Ni^{2+} can accumulate via the pyochelin pathway in *P. aeruginosa* cells but with uptake rates 23- to 35-fold lower than for pyochelin–iron (Braud, Hannauer et al., 2009). Uptake assays with various mutants, monitored by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for metal detection and by fluorescence for pyoverdine detection, show that FpvA has a broad metal specificity for both the binding and uptake of pyoverdine–metal complexes (Hannauer et al., 2012). The same approach shows that the metal selectivity of the pyoverdine/FpvA pathway is controlled by the PvdRT–OpmQ efflux pump, which exports all unwanted metals complexed with the siderophore from the bacterial periplasm (Hannauer et al., 2012). For all TBDTs with solved structures, the transporters interact only with the siderophore and not with the iron ion, so this wide metal permissiveness may be a common feature to transporters of this family.

4.4. Change of Conformations Induced by Siderophore–Iron Binding to TBDTs

Comparisons of TBDT structures, loaded or not loaded with their corresponding siderophore–iron complexes, have been possible only for FhuA, FecA and FpvA, the only TBDTs crystallized in different loading status (Table 1). Binding of siderophore–iron complexes to TBDTs induces conformational changes in the transporter: in the binding site itself, in some of the extracellular loops and in the N-terminal region.

Comparison of pyoverdine–gallium(III) in solution (structure solved by NMR) and pyoverdine–iron(III) bound to FpvA (X-ray structure) reveals

a distinct change in the conformation of the siderophore peptide backbone upon binding to the TBDT and on regions neighboring the binding pocket of the receptor (Wasielewski *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2007). This dynamic behavior suggests an induced fit mechanism during binding.

The crystal structures of FpvA bound to non-cognate pyoverdines with high or low affinities indicate that extracellular loop L7 moves, bringing a Trp and a Tyr closer to the high-affinity pyoverdines, but not to the low-affinity pyoverdines, for which little movement of L7 is observed (Greenwald *et al.*, 2009). In the case of FecA, ligand binding leads to a major change in the conformation of extracellular loops L7 and L8: they close toward the ferric citrate binding pocket, thereby preventing the escape of the siderophore (Ferguson *et al.*, 2002). Deletion of these loops inhibits citrate-iron binding to FecA (Sauter & Braun, 2004). Mutagenesis studies with FpvA implicate L4, L7 and L9 in pyoverdine-Fe uptake (Nader *et al.*, 2007). Finally, no such loop closure has been detected for FhuA (Ferguson *et al.*, 1998; Locher *et al.*, 1998). However, molecular dynamics simulations suggest that L8 of FhuA closes the binding site following the binding of ferrichrome in a manner similar to that observed with FecA (Faraldo-Gomez, Smith, & Sansom, 2004), but deletion of this loop has little effect on ferrichrome transport (Endriss & Braun, 2004). Elimination of the L3 and L11 loops of FhuA abolishes ferrichrome binding and transport (Endriss & Braun, 2004), consistent with an important role for these loops in transport.

Ferrisiderophore binding also triggers additional structural changes at the periplasmic surface of the plug domain. FhuA and FecA contain a short helical region called the switch helix, which unwinds in the presence of bound substrate (Ferguson *et al.*, 1998, 2001, 2002; Ferguson, Braun, *et al.*, 2000; Locher *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 2003), possibly leading to a movement of the TonB box required for interaction with TonB. The unwinding of the switch helices in crystal structures of ferrisiderophore-bound FhuA and FecA suggests that TonB may recognize a disordered conformation of the TonB box. However, as stated above, if we consider all TBDT structures, no real correlation can be established between the siderophore-iron loading status of the transporters and the conformation of the TonB box.

Moreover, in FpvA structures, the positioning of the signaling domain in the periplasm depends on the loading status of the transporter but the folding is not affected by loading (Brillet *et al.*, 2007; Schalk, Lamont, & Cobessi, 2009; Wirth *et al.*, 2007). The signaling domain of unloaded FpvA interacts with residues of its TonB box (Fig. 4) (Brillet *et al.*, 2007). This interaction is very similar to those of the TonB boxes of BtuB and FhuA with TonB

(Pawelek et al., 2006; Shultis, Purdy, Banchs, & Wiener, 2006): the TonB box forms a four-stranded β -sheet with three β -strands of the signaling domain. When loaded with pyoverdine–Fe, the signaling domain moves, probably activating the signaling cascade and enabling the interaction of the TonB box with TonB. In FpvA–pyoverdine–Fe, the TonB box cannot be detected from electron density following pyoverdine–Fe binding suggesting that the flexibility of the connecting loop probably allows FpvA to interact with both FpvR, to regulate the expression of pyoverdine biosynthetic genes and *fpva*, and TonB for energy transduction and pyoverdine–Fe uptake.



5. SIDEROPHORE–IRON TRANSPORT BY TBDTs

5.1. Uptake by TBDTs Requires Energy

The pore through the barrel of TBDTs is completely occluded and does not allow diffusion of ligands without an energy input to open the pore. The outer membranes do not contain an energy source. The proton motive force of the inner membrane is the energy source for this transport and is transferred to the outer membrane TBDTs via a complex of three different inner membrane proteins: TonB, ExbB and ExbD. The N-terminal end of TonB is inserted in the cytoplasmic membrane and its C-proximal regions interact with the region called the TonB box of TBDTs. Bacteria have several 100–1000 copies of each TBDT and only a few 100 copies of TonB, so TonB is undoubtedly not permanently associated with TBDTs (Higgs, Larsen, & Postle, 2002). ExbB spans the inner membrane three times and most of the protein is in the cytoplasm. The organization of ExbD is similar to that of TonB.

The crystal structures of the periplasmic part of TonB in complex with FhuA loaded with ferrichrome or BtuB from *E. coli* loaded with vitamin B12 have been solved (Pawelek et al., 2006; Shultis et al., 2006). In these structures, the binding of TonB to the transporters causes only small changes in the structures of the TBDTs, except for the conformation of the TonB box, which is in a defined position. A four-stranded β -sheet is formed between a β -strand of the TonB box and the three-stranded β -sheet of TonB (Fig. 8). This interaction is very similar to that between the TonB box of FpvA and the three-stranded β -sheet of the signaling domain of this transporter (Brillet et al., 2007). The rest of the TBDT structure is not affected by the binding of TonB and looks likely to be an inactive form of the transporter, with the siderophore–iron complex still in its binding site on

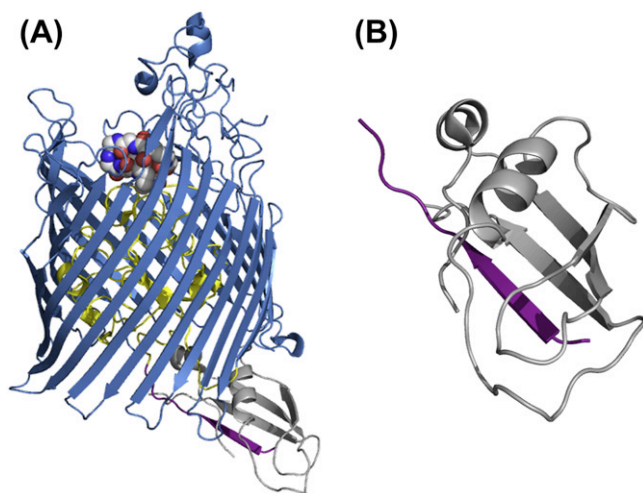


Figure 8 *Structure of FhuA in complex with the periplasmic part of TonB (Pawelek et al., 2006).* The β -barrel, plug domains and TonB box of FhuA are shown in blue, yellow and purple, respectively. TonB is in gray. The ferrichrome is displayed in van der Waals spheres. (A) Side view of TonB–FhuA–ferrichrome. (B) View of the interaction between the Ton box (purple) of FhuA and TonB (gray). See the color plate.

the extracellular face of the TBDT and the barrel domain still closed by the plug.

Many questions still remain unanswered about this TonB machinery and the way it activates TBDTs. It is still not known how the TonB–ExbB–ExbD complex responds to the proton motive force, what roles ExbB and ExbD play in this energy transfer, how this energy is transferred to the TBDT and how the TBDT responds to the energy input.

5.2. Mechanism of Siderophore–Iron Translocation across TBDT

The transport of molecules across the outer membrane needs formation of a channel; this channel needs to be able to handle siderophore–iron complexes up to 2000 Da and even compounds of 29–69 kDa like colicins (Cascales et al., 2007). No pore like those in porins for example or channel is found inside the receptor in any of the TonB-dependent structures. Several mechanisms have been proposed for channel formation, and in particular: (i) a major change in the conformation of the plug domain, (ii) the movement of this domain out of the β -barrel, and (iii) a combination of the two

(Eisenhauer, Shames, Pawelek, & Coulton, 2005; Endriss, Braun, Killmann, & Braun, 2003; Ma et al., 2007). Many different experimental approaches have been used to resolve this issue, but without success (Eisenhauer et al., 2005; Endriss et al., 2003; Ma et al., 2007). The data obtained are often contradictory between approaches used, making it impossible to conclude about the mechanism. Structure analyses of FhuA–TonB and BtuB–TonB led to the suggestion of a mechanical pulling model in which TonB induces total or partial unfolding of the plug domain, by exerting a very modest mechanical force on the transporter (Gumbart, Wiener, & Tajkhorshid, 2007). Numerous water molecules have been observed at the plug–barrel interface in the structures of TBDTs. These water molecules could reduce the activation energy barrier associated with any partial or total dissociation of the plug from the barrel thereby creating a channel between the barrel and the plug, allowing penetration of the siderophore–iron complex (Faraldo-Gomez et al., 2004). Note that for FpvA in *P. aeruginosa* (Nader, Journet, Meksem, Guillon, & Schalk, 2011) and FhuA in *E. coli* (Braun, Endriss, Killmann, & Braun, 2003), reconstituted TBDTs have been obtained by coexpression in the same strain of separately encoded plug and β -barrel domains, each endowed with a signal sequence. This indicates polypeptide complementation after secretion across the cytoplasmic membrane. The *in vivo* reconstituted FpvA binds pyoverdine–iron with the same affinity as wild-type FpvA, indicating that the plug is correctly and functionally inserted into the barrel despite the production of the plug and the β -barrel separately *in vivo*. For both reconstituted transporters (FpvA and FhuA), no passive diffusion of siderophore–iron complexes was observed; the siderophore–iron uptake was TonB dependent, but less efficient than that by the wild-type proteins. It is unknown whether this reconstitution occurs after β -barrel incorporation into the outer membrane or in the periplasm, with a periplasmic, partially folded β -barrel intermediate. Nevertheless, these data indicate that the barrel and the plug domains function independently and are able to associate. Clearly, further work is necessary to elucidate the mechanism of channel formation by TBDTs.



6. TBDT ARE INVOLVED IN SIGNALING CASCADES

In the case of the TonB-dependent receptors involved in signaling cascades, the signaling domain moves to allow interaction with the anti-sigma regulator of the inner membrane. This switch has been observed only in FpvA

structures, both loaded and not loaded with pyoverdine–iron (Brillet *et al.*, 2007; Wirth *et al.*, 2007). In apo FpvA, the signaling domain is located below the plug domain and interacts with the TonB box forming a mixed four-stranded β -sheet composed of the three-stranded β -sheet of the signaling domain and one of the TonB box (Fig. 4). Binding of ferripyoverdine disrupts this interaction between the TonB box and the signaling domain, which moves to another position (Fig. 4). In this configuration, the TonB protein is able to interact with the TonB box and FpvR with the signaling domain. TonB is then able to induce the formation of a channel for siderophore–iron uptake and FpvR activates the signaling cascade.



7. CONCLUSION

Sequence alignment studies clearly show that all TBDTs, whatever the siderophore–iron complex transported, are organized as a β -barrel domain filled with a plug domain. The uptake process always involves the inner membrane proton motive force and a TonB protein. The binding site is highly specific for a single siderophore or for structurally related siderophores; it is always located on the extracellular face of the transporter and is composed of residues of both the barrel and the plug domains. The first structure of a TBDT was solved more than 14 years ago (1998) and today more than 14 TBDTs involved in siderophore–iron or other nutrient uptake have been crystallized and their structures, with different loading status, solved (a total of more than 45 different structures have been described). Despite all this structural information, the mechanism of ligand translocation across these transporters has not been clearly documented. The understanding of the different dynamic conformational changes necessary for translocation of the ligand across such structures remains an important challenge for the coming years.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, by grants from the Centre International de Recherche au Frontière de la Chimie, from the ANR (Agence Nationale de Recherche, ANR-08-BLAN-0309-02) and from the Association Vaincre la Mucoviscidose.

REFERENCES

- Albrecht-Gary, A. M., & Crumbliss, A. L. (1998). Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Metal Ions in Biological Systems*, 35, 239–327.
- Bergeron, R. J., Dionis, J. B., Elliott, G. T., & Kline, S. J. (1985). Mechanism and stereospecificity of the parabactin-mediated iron-transport system in *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(13), 7936–7944.
- Bergeron, R. J., Xin, M. G., Weimar, W. R., Smith, R. E., & Wiegand, J. (2001). Significance of asymmetric sites in choosing siderophores as deferration agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(15), 2469–2478.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denance, N., et al. (2007). Plant carbohydrate scavenging through *tonB*-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One*, 2(2), e224.
- Boukhalfá, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15(4), 325–339.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2010). The siderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: another biological function of these two siderophores. *Environmental Microbiology Report*, 2(3), 419–425.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 5317–5325.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1079–1091.
- Braun, M., Endriss, F., Killmann, H., & Braun, V. (2003). *In vivo* reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5508–5518.
- Braun, V., & Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 529(1), 78–85.
- Brickman, T. J., & McIntosh, M. A. (1992). Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(17), 12350–12355.
- Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., et al. (2007). A β -strand lock-exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure*, 15(11), 1383–1391.
- Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimann, C., & Cobessi, D. (2009). Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 65(Pt 4), 326–331.
- Brillet, K., Reimann, C., Mislin, G. L. A., Noël, S., Rognan, D., Schalk, I. J., et al. (2011). Pyochelin enantiomers and their outer membrane siderophore transporters in fluorescent *Pseudomonads*: structural bases of a unique enantiospecific recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41), 16503–16509.
- Buchanan, S. K., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, M. M., Barnard, T. J., et al. (2007). Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO Journal*, 26(10), 2594–2604.
- Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., et al. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology*, 6(1), 56–63.

- Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the *Pseudomonadaceae sensu stricto* (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 87, 81–237.
- Butler, A. (2005). Marine siderophores and microbial iron mobilization. *Biometals*, 18(4), 369–374.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., et al. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71(1), 158–229.
- Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E., & Hadar, Y. (1994). Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Science Society of American Journal*, 58, 390–396.
- Chimento, D. P., Kadner, R. J., & Wiener, M. C. (2005). Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: implications for the transport cycle. *Proteins*, 59(2), 240–251.
- Clément, E., Mesini, P. J., Pattus, F., Abdallah, M. A., & Schalk, I. J. (2004). The binding mechanism of pyoverdinin with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry*, 43(24), 7954–7965.
- Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2005). The crystal structure of the pyoverdinin outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 34(1), 121–134.
- Cobessi, D., Celia, H., & Pattus, F. (2005). Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 352(4), 893–904.
- Cuiv, P. O., Clarke, P., Lynch, D., & O'Connell, M. (2004). Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2996–3005.
- Drakesmith, H., & Prentice, A. (2008). Viral infection and iron metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 6(7), 541–552.
- Drechsel, H., Jung, G., & Winkelmann, G. (1992). *Biometals*, 5, 141–148.
- Eisenhauer, H. A., Shames, S., Pawelek, P. D., & Coulton, J. W. (2005). Siderophore transport through *Escherichia coli* outer membrane receptor FhuA with disulfide-tethered cork and barrel domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30574–30580.
- Endriss, F., Braun, M., Killmann, H., & Braun, V. (2003). Mutant analysis of the *Escherichia coli* FhuA protein reveals sites of FhuA activity. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4683–4692.
- Endriss, F., & Braun, V. (2004). Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4818–4823.
- Fanucci, G. E., Lee, J. Y., & Cafiso, D. S. (2003). Spectroscopic evidence that osmolytes used in crystallization buffers inhibit a conformation change in a membrane protein. *Biochemistry*, 42(45), 13106–13112.
- Faraldo-Gomez, J. D., Smith, G. R., & Sansom, M. S. P. (2004). Molecular dynamics simulations of the bacterial outer membrane protein FhuA: a comparative study of the ferrichrome-free and bound states. *Biophysical Journal*, 85, 1406–1420.
- Ferguson, A. D., Amezcua, C. A., Halabi, N. M., Chelliah, Y., Rosen, M. K., Ranganathan, R., et al. (2007). Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), 513–518.
- Ferguson, A. D., Braun, V., Fiedler, H. P., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (2000). Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Science*, 9(5), 956–963.

- Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D., & Deisenhofer, J. (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science*, 295(5560), 1715–1719.
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397), 2215–2220.
- Ferguson, A. D., Kodding, J., Walker, G., Bos, C., Coulton, J. W., Diederichs, K., et al. (2001). Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. *Structure*, 9(8), 707–716.
- Ferguson, A. D., Welte, W., Hofmann, E., Lindner, B., Holst, O., Coulton, J. W., et al. (2000). A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins. *Structure*, 8(6), 585–592.
- Fleischhacker, A. S., & Kiley, P. J. (2011). Iron-containing transcription factors and their roles as sensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 335–341.
- Freed, D. M., Horanyi, P. S., Wiener, M. C., & Cafiso, D. S. (2010). Conformational exchange in a membrane transport protein is altered in protein crystals. *Biophysical Journal*, 99(5), 1604–1610.
- Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V., & Meyer, J. M. (2001). Siderotyping—a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Current Topics of Medicinal Chemistry*, 1(1), 31–57.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L. A., Graumann, P. L., et al. (2007). Real-time FRET visualization of ferric-pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 2987–2995.
- Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J. M., et al. (2009). FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Molecular Microbiology*, 72(5), 1246–1259.
- Gumbart, J., Wiener, M. C., & Tajkhorshid, E. (2007). Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophysical Journal*, 93(2), 496–504.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L., Shanzer, A., & Schalk, I. J. (2010). The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1212–1220.
- Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., & Schalk, I. J. 2012. The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 14(7), 1696–1708.
- Hartman, A., & Braun, V. (1980). Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *Journal of Bacteriology*, 143(1), 246–255.
- Helman, R., & Lawrence, G. D. (1989). The increase in ferrioxamine B reduction potential with increasing acidity of the medium. *Journal Electroanalytical Chemistry (Bioelectrochemical Bioenergetics)*, 22, 187–196.
- Hernlen, B. J., Vane, L. M., & Sayles, G. D. (1996). Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chimica Acta*, 244(2), 179–184.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2011). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Report*, 27(5), 637–657.
- Higgs, P. I., Larsen, R. A., & Postle, K. (2002). Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Molecular Microbiology*, 44(1), 271–281.
- Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G. L., Vincent, M., Gallay, J., & Schalk, I. J. (2005). Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of

- Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20222–20230.
- Hoegy, F., Lee, X., Noël, S., Mislin, G. L., Rognan, D., Reimann, C., et al. (2009). Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent *Pseudomonads*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 14949–14957.
- Koster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 291–301.
- Lee, W., van Baalen, M., & Jansen, V. A. (2012). An evolutionary mechanism for diversity in siderophore-producing bacteria. *Ecology Letters*, 15(2), 119–125.
- Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C., & Bitter, W. (2006). The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1882–1891.
- Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P., et al. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell*, 95(6), 771–778.
- Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D. C., Jin, B., Jiang, X., et al. (2007). Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 397–406.
- Martinez, J. S., Carter-Franklin, J. N., Mann, E. L., Martin, J. D., Haygood, M. G., & Butler, A. (2003). Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3754–3759.
- Matzanke, B. F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein, A. X., & Hantke, K. (2004). FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry*, 43(5), 1386–1392.
- Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Bayse, C., Cornelis, P., Barelmann, I., Taraz, K., et al. (2002). Siderophore-mediated iron uptake in fluorescent *Pseudomonas*: characterization of the pyoverdine-receptor binding site of three cross-reacting pyoverdines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 179–183.
- Mislin, G. L. A., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., & Schalk, I. J. (2006). Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1437–1448.
- Muller, G., Isowa, Y., & Raymond, K. N. (1985). Stereospecificity of siderophore-mediated iron uptake in *Rhodotorula pilimanae* as probed by enantiorhodotorulic acid and isomers of chromic rhodotorulate. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(26), 13921–13926.
- Münzinger, M., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Drechsel, H., Heymann, M., Winkelmann, G., et al. (1999). S, S-rhizoferrin (enantio-rhizoferrin)—a siderophore of *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii* DSM 6297—the optical antipode of R, R-rhizoferrin isolated from fungi. *Biometals*, 12(2), 189–193.
- Nader, M., Dobbelaere, W., Vincent, M., Journet, L., Adams, H., Cobessi, D., et al. (2007). Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 46(42), 11707–11717.
- Nader, M., Journet, L., Meksem, A., Guillon, L., & Schalk, I. J. (2011). Mechanism of ferrisiderophore uptake by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane transporter FpvA: no diffusion channel formed at any time during ferrisiderophore uptake. *Biochemistry*, 50(13), 2530–2540.
- Neilands, J. B., Erickson, T. J., & Rastetter, W. H. (1981). Stereospecificity of the ferric enterobactin receptor of *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(8), 3831–3832.
- Neubauer, U., Nowack, B., Furrer, G., & Schulin, R. (2000). Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology*, 34, 2749–2755.

- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology*, 64, 43–60.
- Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C. M., Moiseeva, N., Allaire, M., et al. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science*, 312(5778), 1399–1402.
- Payne, M. A., Igo, J. D., Cao, Z., Foster, S. B., Newton, S. M., & Klebba, P. E. (1997). Biphasic binding kinetics between FepA and its ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21950–21955.
- Postle, K., & Larsen, R. A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*, 20(3–4), 453–465.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., & Kim, S. S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3584–3588.
- Salem, M., Prince, S. M., Patel, H., Chan, H., Feavers, I. M., & Derrick, J. P. Refolding, purification and crystallization of the FrpB outer membrane iron transporter from *Neisseria meningitidis*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 68(Pt 2), 213–215.
- Sauter, A., & Braun, V. (2004). Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5303–5310.
- Schalk, I. J. (2008). Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5–6), 1159–1169.
- Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2002). Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 41(5), 1663–1671.
- Schalk, I. J., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2844–2854.
- Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2001). Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Molecular Microbiology*, 39(2), 351–360.
- Schalk, I. J., Lamont, I. L., & Cobessi, D. (2009). Structure–function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, 22(4), 671–678.
- Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A., & de Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular Microbiology*, 63(4), 1054–1068.
- Shirley, M., & Lamont, I. L. (2009). Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5634–5640.
- Shultis, D. D., Purdy, M. D., Banchs, C. N., & Wiener, M. C. (2006). Outer membrane active transport: structure of the BtuB: TonB complex. *Science*, 312(5778), 1396–1399.
- Spasojevic, I., Boukhalfa, H., Stevens, R. D., & Crumbliss, A. L. (2001). Aqueous solution speciation of Fe(III) complexes with dihydroxamate siderophores alcaligin and rhodotorulic acid and synthetic analogues using electrospray ionization mass spectrometry. *Inorganic Chemistry*, 40(1), 49–58.
- Visca, P. (2004). Iron regulation and siderophore signalling in virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. In J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas*, Vol. 2 (pp. 69–123). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J., & Lamont, I. L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1177–1190.
- Wasielewski, E., Tzou, D. L., Dillmann, B., Czaplicki, J., Abdallah, M. A., Atkinson, R. A., et al. (2008). Multiple conformations of the metal-bound pyoverdine PvdI, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: a nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, 47(11), 3397–3406.
- Wiener, M. C. (2005). TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Current Opinion in Structural Biology*, 15(4), 394–400.
- Winkelmann, G. (1979). Evidence for stereospecific uptake of iron chelates in fungi. *FEBS Letters*, 97(7), 43–46.
- Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., & Cobessi, D. (2007). From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *Journal of Molecular Biology*, 68(2), 398–406.
- Xu, G., Martinez, J. S., Groves, J. T., & Butler, A. (2002). Membrane affinity of the amphiphilic marinobactin siderophores. *Journal of the American Chemical Society*, 124(45), 13408–13415.
- Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Report*, 2(3), 412–418.
- Youard, Z. A., Wenner, N., & Reimmann, C. (2011). Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *Biomaterials*, 24(3), 513–522.
- Yue, W. W., Grizot, S., & Buchanan, S. K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *Journal of Molecular Biology*, 332(2), 353–368.

Références Bibliographiques

- Aisen, P. and A. Leibman (1972). "Lactoferrin and transferrin: a comparative study." *Biochim Biophys Acta* **257**(2): 314-323.
- Aisen, P., A. Leibman and J. Zweier (1978). "Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin." *J Biol Chem* **253**(6): 1930-1937.
- Albrecht-Gary, A. M., S. R. Blanc, A. Z. Ocacktan and M. A. Abdallah (1994). "Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*." *Inorg. Chem.* **333**: 6391-6402.
- Andersen, C. B., M. Torvund-Jensen, M. J. Nielsen, C. L. de Oliveira, H. P. Hersleth, N. H. Andersen, J. S. Pedersen, G. R. Andersen and S. K. Moestrup (2012). "Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex." *Nature* **489**(7416): 456-459.
- Andrews, S. C. (1998). "Iron storage in bacteria." *Adv Microb Physiol* **40**: 281-351.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-237.
- Ankenbauer, R., L. F. Hanne and C. D. Cox (1986). "Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdine production." *J Bacteriol* **167**(1): 7-11.
- Anzaldi, L. L. and E. P. Skaar (2010). "Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens." *Infect Immun* **78**(12): 4977-4989.
- Arnoux, P., R. Haser, N. Izadi, A. Lecroisey, M. Delepierre, C. Wandersman and M. Czjzek (1999). "The crystal structure of HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*." *Nat Struct Biol* **6**(6): 516-520.
- Ash, M. R., M. J. Maher, J. M. Guss and M. Jormakka (2011). "The initiation of GTP hydrolysis by the G-domain of FeoB: insights from a transition-state complex structure." *PLoS One* **6**(8): e23355.
- Banyard, S. H., D. K. Stammers and P. M. Harrison (1978). "Electron density map of apoferritin at 2.8-Å resolution." *Nature* **271**(5642): 282-284.
- Bagg, A. and J. B. Neilands (1987). "Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*." *Biochemistry* **26**(17): 5471-5477.
- Baker, H. M. and E. N. Baker (2012). "A structural perspective on lactoferrin function." *Biochem Cell Biol* **90**(3): 320-328.
- Barjon, C., K. Wecker, N. Izadi-Pruneyre and P. Delepelaire (2007). "Mutagenesis and molecular modeling reveal three key extracellular loops of the membrane receptor HasR that are involved in hemophore HasA binding." *J Bacteriol* **189**(14): 5379-5382.
- Barker, K. D., K. Barkovits and A. Wilks (2012). "Metabolic flux of extracellular heme uptake in *Pseudomonas aeruginosa* is driven by the iron-regulated heme oxygenase (HemO)." *J Biol Chem* **287**(22): 18342-18350.
- Beare, P. A., R. J. For, L. W. Martin and I. L. Lamont (2003). "Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis." *Mol Microbiol* **47**(1): 195-207.
- Beasley, F. C., C. L. Marolda, J. Cheung, S. Buac and D. E. Heinrichs (2011). "Staphylococcus aureus transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence." *Infect Immun* **79**(6): 2345-2355.
- Beddek, A. J. and A. B. Schryvers (2010). "The lactoferrin receptor complex in Gram negative bacteria." *Biometals* **23**(3): 377-386.
- Blanvillain, S., D. Meyer, A. Boulanger, M. Lautier, C. Guynet, N. Denance, J. Vasse, E. Lauber and M. Arlat (2007). "Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria." *PLoS One* **2**(2): e224.

- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* **277**(5331): 1453-1462.
- Boukhalfa, H. and A. L. Crumbliss (2002). "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport." *Biometals* **15**(4): 325-339.
- Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros and M. F. Cellier (2002). "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Infect Immun* **70**(11): 6032-6042.
- Bracken, C. S., M. T. Baer, A. Abdur-Rashid, W. Helms and I. Stojiljkovic (1999). "Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function." *J Bacteriol* **181**(19): 6063-6072.
- Bradbeer, C. (1993). "The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **175**(10): 3146-3150.
- Brandel, J., N. Humbert, M. Elhabiri, I. J. Schalk, G. L. Mislin and A. M. Albrecht-Gary (2012). "Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes." *Dalton Trans* **41**(9): 2820-2834.
- Braud, A., M. Hannauer, G. L. Mislin and I. J. Schalk (2009b). "The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity." *J Bacteriol* **191**(11): 3517-3525.
- Braud, A., F. Hoegy, K. Jezequel, T. Lebeau and I. J. Schalk (2009). "New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway." *Environ Microbiol* **11**(5): 1079-1091.
- Braun, V. (1997). "Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface." *Arch Microbiol* **167**(6): 325-331.
- Braun, V. and M. Braun (2002). "Iron transport and signaling in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **529**(1): 78-85.
- Braun, V. and K. Hantke (2011). "Recent insights into iron import by bacteria." *Curr Opin Chem Biol* **15**(2): 328-334.
- Brickman, T. J. and S. K. Armstrong (1999). "Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species." *J Bacteriol* **181**(19): 5958-5966.
- Brickman, T. J. and S. K. Armstrong (2007). "Impact of alcaligin siderophore utilization on in vivo growth of *Bordetella pertussis*." *Infect Immun* **75**(11): 5305-5312.
- Brickman, T. J. and M. A. McIntosh (1992). "Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex." *J Biol Chem* **267**(17): 12350-12355.
- Brillet, K., L. Journet, H. Celia, L. Paulus, A. Stahl, F. Pattus and D. Cobessi (2007). "A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif." *Structure* **15**(11): 1383-1391.
- Brillet, K., A. Meksem, E. Lauber, C. Reimann and D. Cobessi (2009a). "Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**(Pt 4): 326-331.
- Brillet, K., A. Meksem, A. Thompson and D. Cobessi (2009b). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**(Pt 4): 402-405.
- Brillet, K., C. Reimann, G. L. Mislin, S. Noel, D. Rognan, I. J. Schalk and D. Cobessi (2011). "Pyochelin enantiomers and their outer-membrane siderophore transporters in fluorescent pseudomonads: structural bases for unique enantiospecific recognition." *J Am Chem Soc* **133**(41): 16503-16509.

- Brillet, K., F. Ruffenach, H. Adams, L. Journet, V. Gasser, F. Hoegy, L. Guillon, M. Hannauer, A. Page and I. J. Schalk (2012). "An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*." *ACS Chem Biol*.
- Brooks, B. E. and S. K. Buchanan (2008). "Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1930-1945.
- Buchanan, S. K., P. Lukacik, S. Grizot, R. Ghirlando, M. M. Ali, T. J. Barnard, K. S. Jakes, P. K. Kienker and L. Esser (2007). "Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import." *EMBO J* **26**(10): 2594-2604.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm and J. Deisenhofer (1999). "Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*." *Nat Struct Biol* **6**(1): 56-63.
- Budzikiewicz, H. (2004). "Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.)." *Fortschr Chem Org Naturst* **87**: 81-237.
- Bullen, J. J. (1981). "The significance of iron in infection." *Rev Infect Dis* **3**(6): 1127-1138.
- Burkhard, K. A. and A. Wilks (2007). "Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. Substrate specificity and identification of the heme protein ligands." *J Biol Chem* **282**(20): 15126-15136.
- Butcher, J., S. Sarvan, J. S. Brunzelle, J. F. Couture and A. Stintzi (2012). "Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(25): 10047-10052.
- Cadieux, N., C. Bradbeer and R. J. Kadner (2000). "Sequence changes in the ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein." *J Bacteriol* **182**(21): 5954-5961.
- Cadieux, N. and R. J. Kadner (1999). "Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10673-10678.
- Caillet-Saguy, C., M. Piccioli, P. Turano, G. Lukat-Rodgers, N. Wolff, K. R. Rodgers, N. Izadi-Pruneyre, M. Delepierre and A. Lecroisey (2012). "Role of the Iron Axial Ligands of Heme Carrier HasA in Heme Uptake and Release." *J Biol Chem* **287**(32): 26932-26943.
- Calmettes, C., R. H. Yu, L. P. Silva, D. Curran, D. C. Schriemer, A. B. Schryvers and T. F. Moraes (2011). "Structural variations within the transferrin binding site on transferrin-binding protein B, TbpB." *J Biol Chem* **286**(14): 12683-12692.
- Carrondo, M. A. (2003). "Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint." *EMBO J* **22**(9): 1959-1968.
- Carter, D. M., I. R. Miousse, J. N. Gagnon, E. Martinez, A. Clements, J. Lee, M. A. Hancock, H. Gagnon, P. D. Pawelek and J. W. Coulton (2006). "Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD." *J Biol Chem* **281**(46): 35413-35424.
- Cartron, M. L., S. Maddocks, P. Gillingham, C. J. Craven and S. C. Andrews (2006). "Feo--transport of ferrous iron into bacteria." *Biometals* **19**(2): 143-157.
- Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin and D. Cavard (2007). "Colicin biology." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(1): 158-229.
- Cascales, E., R. Lloubes and J. N. Sturgis (2001). "The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB." *Mol Microbiol* **42**(3): 795-807.
- Cescau, S., H. Cwerman, S. Letoffe, P. Delepelaire, C. Wandersman and F. Biville (2007). "Heme acquisition by hemophores." *Biometals* **20**(3-4): 603-613.
- Chakraborty, R., E. Storey and D. van der Helm (2007). "Molecular mechanism of ferrisiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*." *Biometals* **20**(3-4): 263-274.

- Chang, C., A. Mooser, A. Pluckthun and A. Wlodawer (2001). "Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold." *J Biol Chem* **276**(29): 27535-27540.
- Cherezov, V., E. Yamashita, W. Liu, M. Zhalnina, W. A. Cramer and M. Caffrey (2006). "In meso structure of the cobalamin transporter, BtuB, at 1.95 Å resolution." *J Mol Biol* **364**(4): 716-734.
- Chimento, D. P., R. J. Kadner and M. C. Wiener (2005). "Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: implications for the transport cycle." *Proteins* **59**(2): 240-251.
- Chimento, D. P., A. K. Mohanty, R. J. Kadner and M. C. Wiener (2003). "Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB." *Nat Struct Biol* **10**(5): 394-401.
- Choul-Li, S., H. Adams, F. Pattus and H. Celia (2008). "Visualization of interactions between siderophore transporters and the energizing protein TonB by native PAGE." *Electrophoresis* **29**(6): 1333-1338.
- Chu, B. C., A. Garcia-Herrero, T. H. Johanson, K. D. Krewulak, C. K. Lau, R. S. Peacock, Z. Slavinskaya and H. J. Vogel (2010). "Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view." *Biometals* **23**(4): 601-611.
- Chu, B. C., R. S. Peacock and H. J. Vogel (2007). "Bioinformatic analysis of the TonB protein family." *Biometals* **20**(3-4): 467-483.
- Chu, B. C. and H. J. Vogel (2011). "A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport." *Biol Chem* **392**(1-2): 39-52.
- Clement, E., P. J. Mesini, F. Pattus and I. J. Schalk (2004). "The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status." *Biochemistry* **43**(24): 7954-7965.
- Cobessi, D., H. Celia, N. Folschweiller, I. J. Schalk, M. A. Abdallah and F. Pattus (2005b). "The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution." *J Mol Biol* **347**(1): 121-134.
- Cobessi, D., H. Celia and F. Pattus (2005a). "Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Mol Biol* **352**(4): 893-904.
- Cobessi, D., A. Meksem and K. Brillet (2010). "Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism." *Proteins* **78**(2): 286-294.
- Cope, D., S. Thomas, J. Latimer, C. Slaughter, U. Mülle-Eberhard and E. J. Hansen (1994). "The 100 kDa haem/haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization." *Mol Microbiol* **13**: 863-873.
- Cope, L. D., S. E. Thomas, Z. Hrkál and E. J. Hansen (1998). "Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*." *Infect Immun* **66**(9): 4511-4516.
- Cope, L. D., R. Yogev, U. Müller-Eberhard and E. J. Hansen (1995). "A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b." *J Bacteriol* **177**(10): 2644-2653.
- Cornelis, P., D. Hohnadel and J. M. Meyer (1989). "Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains." *Infect Immun* **57**(11): 3491-3497.
- Cornelissen, C. N. (2003). "Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria." *Front Biosci* **8**: d836-847.
- Cornelissen, C. N. and A. Hollander (2011). "TonB-Dependent Transporters Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*." *Front Microbiol* **2**: 117.
- Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore and J. C. Cook, Jr. (1981). "Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7): 4256-4260.

- Cuiv, P. O., P. Clarke, D. Lynch and M. O'Connell (2004). "Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively." *J Bacteriol* **186**(10): 2996-3005.
- Cuiv, P. O., D. Keogh, P. Clarke and M. O'Connell (2007). "FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane." *J Bacteriol* **189**(1): 284-287.
- Dawson, J. H. (1988). "Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases." *Science* **240**(4851): 433-439.
- Dawson, R. J. and K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." *Nature* **443**(7108): 180-185.
- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel (1985). "Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution." *Nature* **318**(6047): 618-624.
- Deneer, H. G., V. Healey and I. Boychuk (1995). "Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria* spp." *Microbiology* **141** (Pt 8): 1985-1992.
- Dockal, M., D. C. Carter and F. Ruker (1999). "The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties." *J Biol Chem* **274**(41): 29303-29310.
- Dougherty, M. J. and D. M. Downs (2006). "A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*." *Microbiology* **152**(Pt 8): 2345-2353.
- Drake, E. J. and A. M. Gulick (2011). "Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis." *ACS Chem Biol* **6**(11): 1277-1286.
- Drakesmith, H. and A. Prentice (2008). "Viral infection and iron metabolism." *Nat Rev Microbiol* **6**(7): 541-552.
- Endriss, F. and V. Braun (2004). "Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **186**(14): 4818-4823.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (1999). "Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein." *J Bacteriol* **181**(20): 6223-6229.
- Faraldo-Gomez, J. D. and M. S. Sansom (2003). "Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(2): 105-116.
- Fenton, H. J. H. (1876). "On new reaction of tartaric acid." *Chem News* **33**: 190-190.
- Ferguson, A. D., C. A. Amezcua, N. M. Halabi, Y. Chelliah, M. K. Rosen, R. Ranganathan and J. Deisenhofer (2007). "Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2): 513-518.
- Ferguson, A. D., V. Braun, H. P. Fiedler, J. W. Coulton, K. Diederichs and W. Welte (2000b). "Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA." *Protein Sci* **9**(5): 956-963.
- Ferguson, A. D., R. Chakraborty, B. S. Smith, L. Esser, D. van der Helm and J. Deisenhofer (2002a). "Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA." *Science* **295**(5560): 1715-1719.
- Ferguson, A. D. and J. Deisenhofer (2002b). "TonB-dependent receptors-structural perspectives." *Biochim Biophys Acta* **1565**(2): 318-332.
- Ferguson, A. D. and J. Deisenhofer (2004). "Metal import through microbial membranes." *Cell* **116**(1): 15-24.
- Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs and W. Welte (1998). "Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide." *Science* **282**(5397): 2215-2220.
- Ferguson, A. D., J. Koding, G. Walker, C. Bos, J. W. Coulton, K. Diederichs, V. Braun and W. Welte (2001). "Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA." *Structure* **9**(8): 707-716.

- Ferguson, A. D., W. Welte, E. Hofmann, B. Lindner, O. Holst, J. W. Coulton and K. Diederichs (2000a). "A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins." *Structure* **8**(6): 585-592.
- Fleischhacker, A. S. and P. J. Kiley (2011). "Iron-containing transcription factors and their roles as sensors." *Curr Opin Chem Biol* **15**(2): 335-341.
- Flores Jimenez, R. H. and D. S. Cafiso (2012). "The N-terminal domain of a TonB-dependent transporter undergoes a reversible stepwise denaturation." *Biochemistry* **51**(17): 3642-3650.
- Fontecave, M., J. Coves and J. L. Pierre (1994). "Ferric reductases or flavin reductases?" *Biometals* **7**(1): 3-8.
- Fournier, C., A. Smith and P. Delepelaire (2011). "Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity." *Mol Microbiol* **80**(1): 133-148.
- Freed, D. M., P. S. Horanyi, M. C. Wiener and D. S. Cafiso (2010). "Conformational exchange in a membrane transport protein is altered in protein crystals." *Biophys J* **99**(5): 1604-1610.
- Fuchs, R., M. Schafer, V. Geoffroy and J. M. Meyer (2001). "Siderotyping--a powerful tool for the characterization of pyoverdines." *Curr Top Med Chem* **1**(1): 31-57.
- Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard and M. A. McIntosh (2002). "Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter." *Mol Microbiol* **44**(5): 1225-1234.
- Garcia-Herrero, A. and H. J. Vogel (2005). "Nuclear magnetic resonance solution structure of the periplasmic signalling domain of the TonB-dependent outer membrane transporter FecA from *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **58**(5): 1226-1237.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." *The proteomics Protocols Handbook XVIII*: 571-607.
- Genco, C. A. and D. W. Dixon (2001). "Emerging strategies in microbial haem capture." *Mol Microbiol* **39**(1): 1-11.
- Giege, R. and C. Sauter (2010). "Biocrystallography: past, present, future." *HFSP J* **4**(3-4): 109-121.
- Grass, G. (2006). "Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done." *Biometals* **19**(2): 159-172.
- Greenwald, J., F. Hoegy, M. Nader, L. Journet, G. L. Mislin, P. L. Graumann and I. J. Schalk (2007). "Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron." *J Biol Chem* **282**(5): 2987-2995.
- Greenwald, J., M. Nader, H. Celia, C. Gruffaz, V. Geoffroy, J. M. Meyer, I. J. Schalk and F. Pattus (2009). "FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter." *Mol Microbiol* **72**(5): 1246-1259.
- Gresock, M. G., M. I. Savenkova, R. A. Larsen, A. A. Ollis and K. Postle (2011). "Death of the TonB Shuttle Hypothesis." *Front Microbiol* **2**: 206.
- Grigg, J. C., G. Ukpabi, C. F. Gaudin and M. E. Murphy (2010). "Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system." *J Inorg Biochem* **104**(3): 341-348.
- Grim, C. J., M. H. Kothary, G. Gopinath, K. G. Jarvis, J. J. Beaubrun, M. McClelland, B. D. Tall and A. A. Franco (2012). "Identification and Characterization of *Cronobacter* spp. Iron Acquisition Systems." *Appl Environ Microbiol*.
- Gudmundsdottir, A., P. E. Bell, M. D. Lundrigan, C. Bradbeer and R. J. Kadner (1989). "Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport." *J Bacteriol* **171**(12): 6526-6533.
- Guerinot, M. L. (1994a). "Microbial iron transport." *Annu Rev Microbiol* **48**: 743-772.
- Guerinot, M. L. and Y. Yi (1994b). "Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available." *Plant Physiol* **104**(3): 815-820.
- Gumbart, J., M. C. Wiener and E. Tajkhorshid (2007). "Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport." *Biophys J* **93**(2): 496-504.

- Hannauer, M., Y. Barda, G. L. Mislin, A. Shanzer and I. J. Schalk (2010a). "The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome." *J Bacteriol* **192**(5): 1212-1220.
- Hannauer, M., A. Braud, F. Hoegy, P. Ronot, A. Boos and I. J. Schalk (2012a). "The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*." *Environ Microbiol* **14**(7): 1696-1708.
- Hannauer, M., M. Schafer, F. Hoegy, P. Gizzi, P. Wehrung, G. L. Mislin, H. Budzikiewicz and I. J. Schalk (2012b). "Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain." *FEBS Lett* **586**(1): 96-101.
- Hannauer, M., E. Yeterian, L. W. Martin, I. L. Lamont and I. J. Schalk (2010b). "An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*." *FEBS Lett* **584**(23): 4751-4755.
- Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." *Curr Opin Microbiol* **4**(2): 172-177.
- Hartmann, A. and V. Braun (1980). "Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome." *J Bacteriol* **143**(1): 246-255.
- Heinrichs, D. E. and K. Poole (1993). "Cloning and sequence analysis of a gene (pchR) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **175**(18): 5882-5889.
- Heinrichs, D. E. and K. Poole (1996). "PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fptA) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor." *J Bacteriol* **178**(9): 2586-2592.
- Hider, R. C. and X. Kong (2010). "Chemistry and biology of siderophores." *Nat Prod Rep* **27**(5): 637-657.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson and T. J. Gibson (1996). "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments." *Methods Enzymol* **266**: 383-402.
- Higgs, P. I., R. A. Larsen and K. Postle (2002). "Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA." *Mol Microbiol* **44**(1): 271-281.
- Ho, W. W., H. Li, S. Eakanunkul, Y. Tong, A. Wilks, M. Guo and T. L. Poulos (2007). "Holo- and apo-bound structures of bacterial periplasmic heme-binding proteins." *J Biol Chem* **282**(49): 35796-35802.
- Hoegy, F., H. Celia, G. L. Mislin, M. Vincent, J. Gallay and I. J. Schalk (2005). "Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **280**(21): 20222-20230.
- Hoegy, F., X. Lee, S. Noel, D. Rognan, G. L. Mislin, C. Reimann and I. J. Schalk (2009). "Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent pseudomonads." *J Biol Chem* **284**(22): 14949-14957.
- Hollenstein, K., R. J. Dawson and K. P. Locher (2007). "Structure and mechanism of ABC transporter proteins." *Curr Opin Struct Biol* **17**(4): 412-418.
- Hornung, J. M., H. A. Jones and R. D. Perry (1996). "The hmu locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem--protein complexes as iron sources." *Mol Microbiol* **20**(4): 725-739.
- Howard, S. P., C. Herrmann, C. W. Stratilo and V. Braun (2001). "In vivo synthesis of the periplasmic domain of TonB inhibits transport through the FecA and FhuA iron siderophore transporters of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **183**(20): 5885-5895.
- Hrkal, Z., Z. Vodrazka and I. Kalousek (1974). "Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin." *Eur J Biochem* **43**(1): 73-78.

- Hung, K. W., J. Y. Tsai, T. H. Juan, Y. L. Hsu, C. D. Hsiao and T. H. Huang (2012). "Crystal Structure of the *Klebsiella pneumoniae* NFeoB/FeoC Complex and Roles of FeoC in Regulation of Fe²⁺ Transport by the Bacterial Feo System." *J Bacteriol* **194**(23): 6518-6526.
- Hutchings, M. I., T. Palmer, D. J. Harrington and I. C. Sutcliffe (2009). "Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em." *Trends Microbiol* **17**(1): 13-21.
- Imbert, M. and R. Blondeau (1998). "On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium." *Curr Microbiol* **37**(1): 64-66.
- Imperi, F., F. Tiburzi and P. Visca (2009). "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20440-20445.
- Izadi, N., Y. Henry, J. Haladjian, M. E. Goldberg, C. Wandersman, M. Delepierre and A. Lecroisey (1997). "Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition." *Biochemistry* **36**(23): 7050-7057.
- Jacquamet, L., D. Aberdam, A. Adrait, J. L. Hazemann, J. M. Latour and I. Michaud-Soret (1998). "X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **37**(8): 2564-2571.
- James, H. E., P. A. Beare, L. W. Martin and I. L. Lamont (2005). "Mutational analysis of a bifunctional ferrisiderophore receptor and signal-transducing protein from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **187**(13): 4514-4520.
- James, K. J., M. A. Hancock, J. N. Gagnon and J. W. Coulton (2009). "TonB interacts with BtuF, the *Escherichia coli* periplasmic binding protein for cyanocobalamin." *Biochemistry* **48**(39): 9212-9220.
- Jaskula, J. C., T. E. Letain, S. K. Roof, J. T. Skare and K. Postle (1994). "Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes." *J Bacteriol* **176**(8): 2326-2338.
- Jones, P. M., M. L. O'Mara and A. M. George (2009). "ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma." *Trends Biochem Sci* **34**(10): 520-531.
- Kammler, M., C. Schon and K. Hantke (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **175**(19): 6212-6219.
- Kampfenkel, K. and V. Braun (1992). "Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein." *J Bacteriol* **174**(16): 5485-5487.
- Karlsson, M., K. Hannavy and C. F. Higgins (1993). "ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm." *Mol Microbiol* **8**(2): 389-396.
- Katigbak, J. and Y. Zhang (2012). "Iron Binding Site in a Global Regulator in Bacteria - Ferric Uptake Regulator (Fur) Protein: Structure, Mossbauer Properties, and Functional Implication." *J Phys Chem Lett* **2012**(3): 3503-3508.
- Kaur, A. P., I. B. Lansky and A. Wilks (2009). "The role of the cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) of *Pseudomonas aeruginosa* in intracellular heme trafficking and iron homeostasis." *J Biol Chem* **284**(1): 56-66.
- Kim, H., H. Lee and D. Shin (2012). "The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron." *Biochem Biophys Res Commun* **423**(4): 733-738.
- Kodding, J., F. Killig, P. Polzer, S. P. Howard, K. Diederichs and W. Welte (2005). "Crystal structure of a 92-residue C-terminal fragment of TonB from *Escherichia coli* reveals significant conformational changes compared to structures of smaller TonB fragments." *J Biol Chem* **280**(4): 3022-3028.
- Koebnik, R. (2005). "TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule?" *Trends Microbiol* **13**(8): 343-347.
- Kohler, S. D., A. Weber, S. P. Howard, W. Welte and M. Drescher (2010). "The proline-rich domain of TonB possesses an extended polyproline II-like conformation of sufficient length to span the periplasm of Gram-negative bacteria." *Protein Sci* **19**(4): 625-630.
- Koster, W. (2001). "ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12." *Res Microbiol* **152**(3-4): 291-301.

- Korkhov, V. M., S. A. Mireku and K. P. Locher (2012). "Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F." *Nature* **490**(7420): 367-372.
- Krewulak, K. D. and H. J. Vogel (2008). "Structural biology of bacterial iron uptake." *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1781-1804.
- Krewulak, K. D. and H. J. Vogel (2011). "TonB or not TonB: is that the question?" *Biochem Cell Biol* **89**(2): 87-97.
- Krieg, S., F. Huche, K. Diederichs, N. Izadi-Pruneyre, A. Lecroisey, C. Wandersman, P. Delepelaire and W. Welte (2009). "Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(4): 1045-1050.
- Kurusu, G., S. D. Zakharov, M. V. Zhalnina, S. Bano, V. Y. Eroukova, T. I. Rokitskaya, Y. N. Antonenko, M. C. Wiener and W. A. Cramer (2003). "The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon." *Nat Struct Biol* **10**(11): 948-954.
- Laghaei, R., D. G. Evans and R. D. Coalson (2013). "Metal binding sites of human h-chain ferritin and iron transport mechanism to the ferroxidase sites: A molecular dynamics simulation study." *Proteins*.
- Lambert, C., N. Leonard, X. De Bolle and E. Depiereux (2002). "ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures." *Bioinformatics* **18**(9): 1250-1256.
- Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil and M. L. Vasil (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7072-7077.
- Lamont, I. L., A. F. Konings and D. W. Reid (2009). "Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis." *Biometals* **22**(1): 53-60.
- Langman, L., I. G. Young, G. E. Frost, H. Rosenberg and F. Gibson (1972). "Enterochelin system of iron transport in *Escherichia coli*: mutations affecting ferric-enterochelin esterase." *J Bacteriol* **112**(3): 1142-1149.
- Lansky, I. B., G. S. Lukat-Rodgers, D. Block, K. R. Rodgers, M. Ratliff and A. Wilks (2006). "The cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) from the heme uptake system of *Pseudomonas aeruginosa* is an intracellular heme-trafficking protein to the delta-regioselective heme oxygenase." *J Biol Chem* **281**(19): 13652-13662.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh and K. Postle (1997). "Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions." *J Bacteriol* **179**(10): 3213-3221.
- Lavrrar, J. L. and M. A. McIntosh (2003). "Architecture of a fur binding site: a comparative analysis." *J Bacteriol* **185**(7): 2194-2202.
- Lee, J. W. and J. D. Helmann (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." *Biometals* **20**(3-4): 485-499.
- Lee, J. Y., B. K. Janes, K. D. Passalacqua, B. F. Pfleger, N. H. Bergman, H. Liu, K. Hakansson, R. V. Somu, C. C. Aldrich, S. Cendrowski, P. C. Hanna and D. H. Sherman (2007). "Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*." *J Bacteriol* **189**(5): 1698-1710.
- Lee, Y. H., R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf and C. A. Hasemann (1999). "Treponema pallidum TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone." *Nat Struct Biol* **6**(7): 628-633.
- Lefevre, J., P. Delepelaire, M. Delepierre and N. Izadi-Pruneyre (2008). "Modulation by substrates of the interaction between the HasR outer membrane receptor and its specific TonB-like protein, HasB." *J Mol Biol* **378**(4): 840-851.
- Letain, T. E. and K. Postle (1997). "TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **24**(2): 271-283.

- Letoffe, S., J. M. Ghigo and C. Wandersman (1994). "Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9876-9880.
- Letoffe, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange and C. Wandersman (2009). "Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28): 11719-11724.
- Letoffe, S., K. Omori and C. Wandersman (2000). "Functional characterization of the HasA(PF) hemophore and its truncated and chimeric variants: determination of a region involved in binding to the hemophore receptor." *J Bacteriol* **182**(16): 4401-4405.
- Letoffe, S., V. Redeker and C. Wandersman (1998). "Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore." *Mol Microbiol* **28**(6): 1223-1234.
- Lewis, L. A., M. H. Sung, M. Gipson, K. Hartman and D. W. Dyer (1998). "Transport of intact porphyrin by HpuAB, the hemoglobin-haptoglobin utilization system of *Neisseria meningitidis*." *J Bacteriol* **180**(22): 6043-6047.
- Liu, M., H. J. Boulouis and F. Biville (2012). "Heme degrading protein HemS is involved in oxidative stress response of *Bartonella henselae*." *PLoS One* **7**(5): e37630.
- Locher, K. P. (2009). "Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1514): 239-245.
- Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch and D. Moras (1998). "Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes." *Cell* **95**(6): 771-778.
- Lopez, C. S., R. S. Peacock, J. H. Crosa and H. J. Vogel (2009). "Molecular characterization of the TonB2 protein from the fish pathogen *Vibrio anguillarum*." *Biochem J* **418**(1): 49-59.
- Lu, S. and H. I. Zgurskaya (2012). "Role of ATP binding and hydrolysis in assembly of MacAB-TolC macrolide transporter." *Mol Microbiol*.
- Lukacik, P., T. J. Barnard, P. W. Keller, K. S. Chaturvedi, N. Seddiki, J. W. Fairman, N. Noinaj, T. L. Kirby, J. P. Henderson, A. C. Steven, B. J. Hinnebusch and S. K. Buchanan (2012a). "Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(25): 9857-9862.
- Lukacik, P., T. J. Barnard and S. K. Buchanan (2012b). "Using a bacteriocin structure to engineer a phage lysin that targets *Yersinia pestis*." *Biochem Soc Trans* **40**(6): 1503-1506.
- Lukacik, P., T. J. Barnard, B. J. Hinnebusch and S. K. Buchanan (2013). "Specific targeting and killing of Gram-negative pathogens with an engineered phage lytic enzyme." *Virulence* **4**(1): 90-91.
- Matzanke, B. F., S. Anemuller, V. Schunemann, A. X. Trautwein and K. Hantke (2004). "FhuF, part of a siderophore-reductase system." *Biochemistry* **43**(5): 1386-1392.
- Matzanke, B. F., D. J. Ecker, T. S. Yang, B. H. Huynh, G. Muller and K. N. Raymond (1986). "Escherichia coli iron enterobactin uptake monitored by Mossbauer spectroscopy." *J Bacteriol* **167**(2): 674-680.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper and S. C. Andrews (2003). "Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis." *J Biol Chem* **278**(32): 29478-29486.
- Mehmood, S., C. Domene, E. Forest and J. M. Jault (2012). "Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(27): 10832-10836.
- Meyer, J. M. (2000). "Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species." *Arch Microbiol* **174**(3): 135-142.

- Meyer, J. M. and M. A. Abdallah (1978). "The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties." *J. Gen. Microbiol* **107**: 319-328.
- Meyer, J. M., C. Gruffaz, V. Raharinosy, I. Bezverbnaya, M. Schafer and H. Budzikiewicz (2008). "Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method." *Biomaterials* **21**(3): 259-271.
- Meyer, J. M. and J. M. Hornsperger (1978). "Role of pyoverdine Pf, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport." *J. Gen. Microbiol* **107**: 329-331.
- Michel, L., N. Gonzalez, S. Jagdeep, T. Nguyen-Ngoc and C. Reimann (2005). "PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector." *Mol Microbiol* **58**(2): 495-509.
- Mills, M. and S. M. Payne (1995). "Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7." *J Bacteriol* **177**(11): 3004-3009.
- Mills, M. and S. M. Payne (1997). "Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant." *Infect Immun* **65**(12): 5358-5363.
- Mirus, O., S. Strauss, K. Nicolaisen, A. von Haeseler and E. Schleiff (2009). "TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria." *BMC Biol* **7**: 68.
- Mislin, G. L., F. Hoegy, D. Cobessi, K. Poole, D. Rognan and I. J. Schalk (2006). "Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Mol Biol* **357**(5): 1437-1448.
- Missiakas, D. and S. Raina (1998). "The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation." *Mol Microbiol* **28**(6): 1059-1066.
- Mokdad, A., D. Z. Herrick, A. K. Kahn, E. Andrews, M. Kim and D. S. Cafiso (2012). "Ligand-Induced Structural Changes in the *Escherichia coli* Ferric Citrate Transporter Reveal Modes for Regulating Protein-Protein Interactions." *J Mol Biol* **423**(5): 818-830.
- Morton, D. J., T. W. Seale, L. L. Madore, T. M. VanWagoner, P. W. Whitby and T. L. Stull (2007). "The haem-haemopexin utilization gene cluster (*hxCBA*) as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*." *Microbiology* **153**(Pt 1): 215-224.
- Muller, G. (2000). "Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach." *Curr Med Chem* **7**(9): 861-888.
- Nader, M., W. Dobbelaere, M. Vincent, L. Journet, H. Adams, D. Cobessi, J. Gallay and I. J. Schalk (2007). "Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **46**(42): 11707-11717.
- Neilands, J. B. (1957). "Some aspects of microbial iron metabolism." *Bacteriol Rev* **2**: 101-111.
- Neilands, J. B. (1981). "Microbial iron compounds." *Annu Rev Biochem* **50**: 715-731.
- Neilands, J. B. (1995). "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds." *J Biol Chem* **270**(45): 26723-26726.
- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 593-656.
- Noel, S., L. Guillon, I. J. Schalk and G. L. Mislin (2011). "Synthesis of fluorescent probes based on the pyochelin siderophore scaffold." *Org Lett* **13**(5): 844-847.
- Noinaj, N., S. K. Buchanan and C. N. Cornelissen (2012b). "The transferrin-iron import system from pathogenic *Neisseria* species." *Mol Microbiol*.
- Noinaj, N., N. C. Easley, M. Oke, N. Mizuno, J. Gumbart, E. Boura, A. N. Steere, O. Zak, P. Aisen, E. Tajkhorshid, R. W. Evans, A. R. Gorringer, A. B. Mason, A. C. Steven and S. K. Buchanan (2012a). "Structural basis for iron piracy by pathogenic *Neisseria*." *Nature* **483**(7387): 53-58.
- Noinaj, N., M. Guillier, T. J. Barnard and S. K. Buchanan (2010). "TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function." *Annu Rev Microbiol* **64**: 43-60.

- Noto, J. M. and C. N. Cornelissen (2008). "Identification of TbpA residues required for transferrin-iron utilization by *Neisseria gonorrhoeae*." *Infect Immun* **76**(5): 1960-1969.
- O'Brien-Simpson, N. M., P. D. Veith, S. G. Dashper and E. C. Reynolds (2003). "Porphyromonas gingivalis gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire." *Curr Protein Pept Sci* **4**(6): 409-426.
- O'Neill, M. J., M. N. Bhakta, K. G. Fleming and A. Wilks (2012). "Induced fit on heme binding to the *Pseudomonas aeruginosa* cytoplasmic protein (PhuS) drives interaction with heme oxygenase (HemO)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(15): 5639-5644.
- Ochsner, U. A., Z. Johnson and M. L. Vasil (2000). "Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **146** (Pt 1): 185-198.
- Ochsner, U. A., A. I. Vasil and M. L. Vasil (1995). "Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters." *J Bacteriol* **177**(24): 7194-7201.
- Ogierman, M. and V. Braun (2003). "Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box." *J Bacteriol* **185**(6): 1870-1885.
- Okamura, M. Y., R. A. Isaacson and G. Feher (1975). "Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3491-3495.
- Ollis, A. A., A. Kumar and K. Postle (2012c). "The ExbD periplasmic domain contains distinct functional regions for two stages in TonB energization." *J Bacteriol* **194**(12): 3069-3077.
- Ollis, A. A. and K. Postle (2012a). "ExbD mutants define initial stages in TonB energization." *J Mol Biol* **415**(2): 237-247.
- Ollis, A. A. and K. Postle (2012b). "Identification of functionally important TonB-ExbD periplasmic domain interactions in vivo." *J Bacteriol* **194**(12): 3078-3087.
- Paoli, M., B. F. Anderson, H. M. Baker, W. T. Morgan, A. Smith and E. N. Baker (1999). "Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains." *Nat Struct Biol* **6**(10): 926-931.
- Parker Siburt, C. J., T. A. Mietzner and A. L. Crumbliss (2012). "FbpA--a bacterial transferrin with more to offer." *Biochim Biophys Acta* **1820**(3): 379-392.
- Patzer, S. I., R. Albrecht, V. Braun and K. Zeth (2012). "Structural and mechanistic studies of pesticin, a bacterial homolog of phage lysozymes." *J Biol Chem* **287**(28): 23381-23396.
- Paustian, M. L., B. J. May, D. Cao, D. Boley and V. Kapur (2002). "Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources." *J Bacteriol* **184**(23): 6714-6720.
- Pawelek, P. D., N. Croteau, C. Ng-Thow-Hing, C. M. Khursigara, N. Moiseeva, M. Allaire and J. W. Coulton (2006). "Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor." *Science* **312**(5778): 1399-1402.
- Payne, M. A., J. D. Igo, Z. Cao, S. B. Foster, S. M. Newton and P. E. Klebba (1997). "Biphasic binding kinetics between FepA and its ligands." *J Biol Chem* **272**(35): 21950-21955.
- Peacock, R. S., A. M. Weljie, S. Peter Howard, F. D. Price and H. J. Vogel (2005). "The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides." *J Mol Biol* **345**(5): 1185-1197.
- Pereira, A. S., W. Small, C. Krebs, P. Tavares, D. E. Edmondson, E. C. Theil and B. H. Huynh (1998). "Direct spectroscopic and kinetic evidence for the involvement of a peroxodiferric intermediate during the ferroxidase reaction in fast ferritin mineralization." *Biochemistry* **37**(28): 9871-9876.
- Perkins-Balding, D., M. Ratliff-Griffin and I. Stojiljkovic (2004). "Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(1): 154-171.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nat Methods* **8**(10): 785-786.

- Pitt, T. L. (1986). "Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis." *J R Soc Med* **79 Suppl 12**: 13-18.
- Poole, K. and G. A. McKay (2003). "Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome." *Front Biosci* **8**: d661-686.
- Poole, K., S. Neshat, K. Krebs and D. E. Heinrichs (1993). "Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **175**(15): 4597-4604.
- Posey, J. E. and F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen." *Science* **288**(5471): 1651-1653.
- Posey, J. E., J. M. Hardham, S. J. Norris and F. C. Gherardini (1999). "Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, *TroR*, from *Treponema pallidum*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10887-10892.
- Postle, K. (2007). "TonB system, in vivo assays and characterization." *Methods Enzymol* **422**: 245-269.
- Postle, K. and R. J. Kadner (2003). "Touch and go: tying TonB to transport." *Mol Microbiol* **49**(4): 869-882.
- Pra, D., S. I. Franke, J. A. Henriques and M. Fenech (2012). "Iron and genome stability: An update." *Mutat Res* **733**(1-2): 92-99.
- Pramanik, A., W. Hauf, J. Hoffmann, M. Cernescu, B. Brutschy and V. Braun (2011). "Oligomeric structure of ExbB and ExbB-ExbD isolated from *Escherichia coli* as revealed by LILBID mass spectrometry." *Biochemistry* **50**(41): 8950-8956.
- Pressler, U., H. Staudenmaier, L. Zimmermann and V. Braun (1988). "Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **170**(6): 2716-2724.
- Ratledge, C. and L. G. Dover (2000). "Iron metabolism in pathogenic bacteria." *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Rauscher, L., D. Expert, B. F. Matzanke and A. X. Trautwein (2002). "Chrysobactin-dependent iron acquisition in *Erwinia chrysanthemi*. Functional study of a homolog of the *Escherichia coli* ferric enterobactin esterase." *J Biol Chem* **277**(4): 2385-2395.
- Raymond-Bouchard, I., C. S. Carroll, J. R. Nesbitt, K. A. Henry, L. J. Pinto, M. Moinzadeh, J. K. Scott and M. M. Moore (2012). "The Mirb Ferrisiderophore Transporter of *Aspergillus Fumigatus*: Structural Requirements for Activity." *Eukaryot Cell*.
- Redly, G. A. and K. Poole (2003). "Pyoverdine-mediated regulation of *FpvA* synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a probable extracytoplasmic-function sigma factor, *Fpvl*." *J Bacteriol* **185**(4): 1261-1265.
- Redly, G. A. and K. Poole (2005). "FpvIR control of *fpvA* ferric pyoverdine receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of an interaction between *Fpvl* and *FpvR* and identification of mutations in each compromising this interaction." *J Bacteriol* **187**(16): 5648-5657.
- Rees, D. C., E. Johnson and O. Lewinson (2009). "ABC transporters: the power to change." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(3): 218-227.
- Reimann, C. (2012). "Inner-membrane transporters for the siderophores pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* and enantio-pyochelin in *Pseudomonas fluorescens* display different enantioselectivities." *Microbiology* **158**(Pt 5): 1317-1324.
- Reimann, C., H. M. Patel, L. Serino, M. Barone, C. T. Walsh and D. Haas (2001). "Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **183**(3): 813-820.
- Reimann, C., H. M. Patel, C. T. Walsh and D. Haas (2004). "PchC thioesterase optimizes nonribosomal biosynthesis of the peptide siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **186**(19): 6367-6373.
- Rohde, K. H. and D. W. Dyer (2004). "Analysis of haptoglobin and hemoglobin-haptoglobin interactions with the *Neisseria meningitidis* TonB-dependent receptor HpuAB by flow cytometry." *Infect Immun* **72**(5): 2494-2506.
- Rohde, K. H., A. F. Gillaspay, M. D. Hatfield, L. A. Lewis and D. W. Dyer (2002). "Interactions of haemoglobin with the *Neisseria meningitidis* receptor HpuAB: the role of TonB and an intact proton motive force." *Mol Microbiol* **43**(2): 335-354.

- Rui, H., M. Rivera and W. Im (2012). "Protein Dynamics and Ion Traffic in Bacterioferritin." Biochemistry.
- Saha, R., N. Saha, R. S. Donofrio and L. L. Bestervelt (2012). "Microbial siderophores: a mini review." J Basic Microbiol.
- Saleem, M., S. M. Prince, H. Patel, H. Chan, I. M. Feavers and J. P. Derrick (2012). "Refolding, purification and crystallization of the FrpB outer membrane iron transporter from *Neisseria meningitidis*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **68**(Pt 2): 231-235.
- Sansonetti, P. J. (2006). "The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*." Ann N Y Acad Sci **1072**: 307-312.
- Sauter, A. and V. Braun (2004). "Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **186**(16): 5303-5310.
- Schafer, G., W. G. Purschke, M. Gleissner and C. L. Schmidt (1996). "Respiratory chains of archaea and extremophiles." Biochim Biophys Acta **1275**(1-2): 16-20.
- Schalk, I. J., M. A. Abdallah and F. Pattus (2002). "Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*." Biochemistry **41**(5): 1663-1671.
- Schalk, I. J., M. Hannauer and A. Braud (2011). "New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance." Environ Microbiol **13**(11): 2844-2854.
- Schalk, I. J., C. Hennard, C. Dugave, K. Poole, M. A. Abdallah and F. Pattus (2001). "Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport." Mol Microbiol **39**(2): 351-360.
- Schalk, I. J., P. Kyslik, D. Prome, A. van Dorsselaer, K. Poole, M. A. Abdallah and F. Pattus (1999). "Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport." Biochemistry **38**(29): 9357-9365.
- Schalk, I. J., I. L. Lamont and D. Cobessi (2009). "Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*." Biometals **22**(4): 671-678.
- Schalk, I. J. and Guillon, L (2012b). "Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis." Environ Microbiol.
- Schalk, I. J., G. L. Mislin and K. Brillet (2012a). "Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters." Curr Top Membr **69**: 37-66.
- Schalk, I. J., W. W. Yue and S. K. Buchanan (2004). "Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters." Mol Microbiol **54**(1): 14-22.
- Schauer, K., B. Gouget, M. Carriere, A. Labigne and H. de Reuse (2007). "Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery." Mol Microbiol **63**(4): 1054-1068.
- Schauer, K., D. A. Rodionov and H. de Reuse (2008). "New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'?" Trends Biochem Sci **33**(7): 330-338.
- Schneider, S., K. H. Sharp, P. D. Barker and M. Paoli (2006). "An induced fit conformational change underlies the binding mechanism of the heme transport proteobacteria-protein HemS." J Biol Chem **281**(43): 32606-32610.
- Schons, V., R. A. Atkinson, C. Dugave, R. Graff, G. L. Mislin, L. Rochet, C. Hennard, B. Kieffer, M. A. Abdallah and I. J. Schalk (2005). "The structure-activity relationship of ferric pyoverdine bound to its outer membrane transporter: implications for the mechanism of iron uptake." Biochemistry **44**(43): 14069-14079.
- Schroeder, G. N. and H. Hilbi (2008). "Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion." Clin Microbiol Rev **21**(1): 134-156.
- Sean Peacock, R., A. M. Weljie, S. Peter Howard, F. D. Price and H. J. Vogel (2005). "The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides." J Mol Biol **345**(5): 1185-1197.

- Sebastian, S. and C. A. Genco (1999). "FbpC is not essential for iron acquisition in *Neisseria gonorrhoeae*." *Infect Immun* **67**(6): 3141-3145.
- Sharma, O., E. Yamashita, M. V. Zhaltina, S. D. Zakharov, K. A. Datsenko, B. L. Wanner and W. A. Cramer (2007). "Structure of the complex of the colicin E2 R-domain and its BtuB receptor. The outer membrane colicin translocon." *J Biol Chem* **282**(32): 23163-23170.
- Shen, J., A. Meldrum and K. Poole (2002). "FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **184**(12): 3268-3275.
- Shen, J. S., V. Geoffroy, S. Neshat, Z. Jia, A. Meldrum, J. M. Meyer and K. Poole (2005). "FpvA-mediated ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of aromatic residues in FpvA implicated in ferric pyoverdine binding and transport." *J Bacteriol* **187**(24): 8511-8515.
- Shirley, M. and I. L. Lamont (2009). "Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **191**(18): 5634-5640.
- Shultis, D. D., M. D. Purdy, C. N. Banchs and M. C. Wiener (2006). "Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex." *Science* **312**(5778): 1396-1399.
- Siburt, C. J., P. L. Roulhac, K. D. Weaver, J. M. Noto, T. A. Mietzner, C. N. Cornelissen, M. C. Fitzgerald and A. L. Crumbliss (2009). "Hijacking transferrin bound iron: protein-receptor interactions involved in iron transport in *N. gonorrhoeae*." *Metallomics* **1**(3): 249-255.
- Smith, A. and A. Wilks (2012). "Extracellular heme uptake and the challenges of bacterial cell membranes." *Curr Top Membr* **69**: 359-392.
- Smith, J. L. (2004). "The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria." *Crit Rev Microbiol* **30**(3): 173-185.
- Stojiljkovic, I. and K. Hantke (1992). "Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria." *EMBO J* **11**(12): 4359-4367.
- Stojiljkovic, I. and D. Perkins-Balding (2002). "Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria." *DNA Cell Biol* **21**(4): 281-295.
- Storz, G. and J. A. Imlay (1999). "Oxidative stress." *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 188-194.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory and M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-964.
- Struyve, M., M. Moons and J. Tommassen (1991). "Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein." *J Mol Biol* **218**(1): 141-148.
- Su, Y. C., K. H. Chin, H. C. Hung, G. H. Shen, A. H. Wang and S. H. Chou (2010). "Structure of *Stenotrophomonas maltophilia* FeoA complexed with zinc: a unique prokaryotic SH3-domain protein that possibly acts as a bacterial ferrous iron-transport activating factor." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**(Pt 6): 636-642.
- Takase, H., H. Nitanai, K. Hoshino and T. Otani (2000). "Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice." *Infect Immun* **68**(4): 1834-1839.
- Teintze, M., M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong and D. van der Helm (1981). "Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*." *Biochemistry* **20**(22): 6446-6457.
- Thomas, C. E. and P. F. Sparling (1996). "Isolation and analysis of a fur mutant of *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* **178**(14): 4224-4232.
- Tong, Y. and M. Guo (2009). "Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes." *Arch Biochem Biophys* **481**(1): 1-15.

- Tseng, C. F., A. Burger, G. L. Mislin, I. J. Schalk, S. S. Yu, S. I. Chan and M. A. Abdallah (2006). "Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds." *J Biol Inorg Chem* **11**(4): 419-432.
- Udho, E., K. S. Jakes, S. K. Buchanan, K. J. James, X. Jiang, P. E. Klebba and A. Finkelstein (2009). "Reconstitution of bacterial outer membrane TonB-dependent transporters in planar lipid bilayer membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21990-21995.
- Udho, E., K. S. Jakes and A. Finkelstein (2012). "TonB-Dependent Transporter FhuA in Planar Lipid Bilayers: Partial Exit of Its Plug from the Barrel." *Biochemistry*.
- Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews and D. J. Kelly (2000). "Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter." *Mol Microbiol* **37**(2): 274-286.
- Visca, P., F. Imperi and I. L. Lamont (2007). "Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance." *Trends Microbiol* **15**(1): 22-30.
- Visca, P., L. Leoni, M. J. Wilson and I. L. Lamont (2002). "Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*." *Mol Microbiol* **45**(5): 1177-1190.
- Vogel, H. J. (2012). "Lactoferrin, a bird's eye view." *Biochem Cell Biol* **90**(3): 233-244.
- Wally, J. and S. K. Buchanan (2007). "A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin." *Biometals* **20**(3-4): 249-262.
- Wandersman, C. and P. Delepelaire (2004). "Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores." *Annu Rev Microbiol* **58**: 611-647.
- Wandersman, C. and P. Delepelaire (2012). "Haemophore functions revisited." *Mol Microbiol* **85**(4): 618-631.
- Wandersman, C. and I. Stojiljkovic (2000). "Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores." *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 215-220.
- Wardman, P. and L. P. Candeias (1996). "Fenton chemistry: an introduction." *Radiat Res* **145**(5): 523-531.
- Wideback, K. and G. Kronvall (1982). "Surface receptors for serum albumin in group C and G streptococci show three different types of albumin specificity." *Infect Immun* **38**(3): 1154-1163.
- Wiener, M. C. (2005). "TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque?" *Curr Opin Struct Biol* **15**(4): 394-400.
- Wilks, A. (2001). "The ShuS protein of *Shigella dysenteriae* is a heme-sequestering protein that also binds DNA." *Arch Biochem Biophys* **387**(1): 137-142.
- Wilks, A. (2002). "Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism." *Antioxid Redox Signal* **4**(4): 603-614.
- Winkelmann, G. (2002). "Microbial siderophore-mediated transport." *Biochem Soc Trans* **30**(4): 691-696.
- Wirth, C., F. Hoegy, F. Pattus and D. Cobessi (2006). "Preliminary X-ray investigations of several crystal forms of the ferripyoverdine FpvA outer membrane receptor from *Pseudomonas aeruginosa* bound to ferripyoverdine." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**(Pt 5): 460-463.
- Wirth, C., W. Meyer-Klaucke, F. Pattus and D. Cobessi (2007). "From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor." *J Mol Biol* **368**(2): 398-406.
- Wong, J. C., R. Patel, D. Kendall, P. W. Whitby, A. Smith, J. Holland and P. Williams (1995). "Affinity, conservation, and surface exposure of hemopexin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*." *Infect Immun* **63**(6): 2327-2333.
- Woo, J. S., A. Zeltina, B. A. Goetz and K. P. Locher (2012). "X-ray structure of the *Yersinia pestis* heme transporter HmuUV." *Nat Struct Mol Biol*.

- Wyckoff, E. E., D. Duncan, A. G. Torres, M. Mills, K. Maase and S. M. Payne (1998). "Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria." *Mol Microbiol* **28**(6): 1139-1152.
- Yang, X., R. H. Yu, C. Calmettes, T. F. Moraes and A. B. Schryvers (2011). "Anchor peptide of transferrin-binding protein B is required for interaction with transferrin-binding protein A." *J Biol Chem* **286**(52): 45165-45173.
- Yeterian, E., L. W. Martin, L. Guillon, L. Journet, I. L. Lamont and I. J. Schalk (2010). "Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation." *Amino Acids* **38**(5): 1447-1459.
- Youard, Z. A., G. L. Mislin, P. A. Majcherczyk, I. J. Schalk and C. Reimann (2007). "*Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin." *J Biol Chem* **282**(49): 35546-35553.
- Youard, Z. A. and C. Reimann (2010). "Stereospecific recognition of pyochelin and enantio-pyochelin by the PchR proteins in fluorescent pseudomonads." *Microbiology* **156**(Pt 6): 1772-1782.
- Youard, Z. A., N. Wenner and C. Reimann (2011). "Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species." *Biometals* **24**(3): 513-522.
- Yue, W. W., S. Grizot and S. K. Buchanan (2003). "Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA." *J Mol Biol* **332**(2): 353-368.
- Yukl, E. T., G. Jekporir, A. Y. Alontaga, L. Pautsch, J. C. Rodriguez, M. Rivera and P. Moenne-Loccoz (2010). "Kinetic and spectroscopic studies of hemin acquisition in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **49**(31): 6646-6654.
- Zheng, T., J. L. Bullock and E. M. Nolan (2012). "Siderophore-Mediated Cargo Delivery to the Cytoplasm of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: Syntheses of Monofunctionalized Enterobactin Scaffolds and Evaluation of Enterobactin-Cargo Conjugate Uptake." *J Am Chem Soc*.
- Zunszain, P. A., J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida and S. Curry (2003). "Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid." *BMC Struct Biol* **3**: 6.

Études structurales et fonctionnelles de protéines impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négatives

Le Fer est un élément essentiel à la vie car il possède un rôle clé dans de nombreux processus biologiques. Malgré son abondance, le fer est faiblement biodisponible. Ainsi, la majorité des micro-organismes a développé des systèmes particulièrement efficaces pour l'acquisition de cet élément. Le mécanisme le plus répandu implique la production de petites molécules chélatrices ayant une forte affinité pour le fer. Après sécrétion dans le milieu extracellulaire, ces composés lient et transportent le Fe^{3+} au travers de la membrane externe *via* des transporteurs TonB-dépendants (TBDT). Durant cette thèse, nous avons mis en place un protocole efficace permettant d'aller rapidement du clonage à la cristallisation de ces cibles afin d'étudier la structure tridimensionnelle de cette famille de protéines. Nous avons pu résoudre et étudier la structure de plusieurs TBDT de pathogènes bactériens. En parallèle, nous avons étudié un transporteur ABC ayant la particularité de posséder deux protéines périplasmiques associées capables d'interagir avec le sidérophore, chez *P. aeruginosa*.

Mots clés : Transport du fer, Transporteur TonB-dépendant, Études structurales, Cristallographie, Pyoverdine, Pyochéline, Protéines membranaires.

Iron is essential for life because it has a key role in many biological processes. Despite its abundance, iron is poorly bioavailable. Thus, the majority of micro-organisms have developed effective and specific systems for the acquisition of this element. The most common mechanism involves the production of small chelating molecules with high affinity for iron. After secretion into the extracellular medium, these compounds bind and transport iron across the outer membrane through Ton-dependent transporters (TBDT). In this thesis, we have developed an efficient protocol to easily go from cloning to the crystallization of these targets to study the three-dimensional structure of this protein family. Here, we solved and studied the structure of several TBDTs express in pathogenic bacteria. In parallel, we studied an ABC transporter FpvCDEF with the particularity of having two periplasmic proteins associated, able to interact with the siderophore, in *P.aeruginosa*.

Key words: Iron transport, TonB-dependent transporter, Structural studies, Crystallography, Pyoverdin, Pyochelin, Membrane proteins.