



HAL
open science

Etude biochimique de trois nouvelles protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie chez *Escherichia coli*: UbiT, UbiU et UbiV

Chau Duy Tam Vo

► **To cite this version:**

Chau Duy Tam Vo. Etude biochimique de trois nouvelles protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie chez *Escherichia coli*: UbiT, UbiU et UbiV. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT: 2019SORUS401 . tel-03418306

HAL Id: tel-03418306

<https://theses.hal.science/tel-03418306>

Submitted on 7 Nov 2021

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.



**SORBONNE
UNIVERSITÉ**

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité: **Biochimie**

Présentée par

Chau Duy Tam VO

Thèse dirigée par **Pr. Marc Fontecave**

et co-dirigée par **Dr. Murielle Lombard**

préparée au sein du **Laboratoire de la Chimie des Processus Biologiques
UMR 8829 (Collège de France)**

dans l'École Doctorale 406 Chimie moléculaire de Paris-Centre

Etude biochimique de trois nouvelles protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobiose chez *Escherichia coli* : UbiT, UbiU et UbiV

Thèse soutenue publiquement le 05 novembre 2019, devant le jury composé de :

Dr. Christine CAVAZZA

Chercheur CEA, Université Grenoble-Alpes, rapportrice

Dr. Yasmina MEKMOUCHE

Chargée de Recherche, CNRS, Aix-Marseille Université, rapportrice

Dr. Ludovic PELOSI

Maître de Conférences, Université Grenoble-Alpes, examinateur

Pr. Chahrazade EL AMRI

Professeur, Sorbonne Université, examinatrice

Pr. Marc FONTECAVE

Professeur, Collège de France, Directeur de thèse

Dr. Murielle LOMBARD

Chargée de Recherche, CNRS, Collège de France, Co-directrice de thèse

Remerciements

Une thèse est loin d'être le résultat d'un travail solitaire. Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

J'ai été honoré que le directeur du Laboratoire des Processus Biologiques (Collège de France), Monsieur le Professeur Marc Fontecave, soit le directeur de ma thèse. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans le laboratoire et permis de travailler dans d'excellentes conditions. Je vous remercie également pour votre suivi attentif et l'intérêt que vous avez manifestés dans mes travaux ainsi que pour les réunions de travail très motivantes et les discussions scientifiques très enrichissantes.

Un merci tout particulier revient à ma co-directrice de thèse, Madame le Docteur Murielle Lombard pour la qualité de son encadrement, ses conseils avisés et son enthousiasme communicatif. Ton suivi régulier tout au long de ma thèse m'a permis d'avancer sur un sujet qui n'était pas facile. Je te remercie également pour la confiance que tu m'as accordée, ta disponibilité et ta rigueur lors de la rédaction de ce manuscrit (et aussi lors de la préparation de la soutenance) et pour tes conseils judicieux. J'aimerais te dire, Murielle, c'est grâce à ta gentillesse, ton bon cœur que j'ai envie de travailler encore, encore et encore.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ma thèse : Mme. Christine Cavazza, Mme. Yasmina Mekmouche, M. Chahrazade El Amri et M. Ludovic Pelosi.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Mme. Fabienne Burlina et M. Stéphane Mann pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont faites sur mon projet de thèse.

Un merci particulier à l'équipe du Dr. Fabien Pierrel et celle du Pr. Frédéric Barras pour leur aide et leur contribution dans ce sujet de thèse, à Nadia Touati pour l'enregistrement des spectres RPE et à David Cornu pour toutes les analyses de spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier particulièrement Bruno Faivre pour toutes les discussions scientifiques concernant la biologie moléculaire et la purification des protéines. Je te remercie pour tes explications et ta patience, et plus particulièrement durant les premiers mois pendant lesquels tu m'as formé au clonage et à utiliser l'AKTA... « Bruno, j'ai une question !!! ». Les moments difficiles pendant mes trois années de thèse, les discussions non-scientifiques, en particulier le jour où tu m'as accompagné à l'hôpital, ... je n'oublierai jamais !! Je me suis rendu compte que j'étais très chanceux de travailler à tes côtés.

Coucou Johnny, et oui... Je te remercie non seulement pour une quantité incommensurable du LB que tu m'as préparée, mais aussi pour les plaisanteries, les blagues et

les bons moments que nous avons partagés. Je te remercie également d'avoir remonté mon moral plusieurs fois.

J'exprime mes profonds remerciements aux chercheurs permanents du LCPB, particulièrement Philippe Simon, Ludovic Pecqueur et Djemel Hamdane. Merci pour votre aide, vos conseils ainsi que pour les bons moments passés en votre compagnie. Un grand merci aux collègues du labo, les non permanents : Ornella, Pierre, Charles, Cécilia, Nisha, Yifan et Cameron...

Je remercie chaleureusement Anhkiet, un ami très cher qui ne sait jamais dire non. Je te remercie de m'avoir écouté, d'avoir partagé avec moi les moments qui ne sont pas faciles dans la vie, de m'avoir fait comprendre des choses de manière très simple. Merci beaucoup pour ta gentillesse, pour ton bon cœur et de m'avoir attendu devant le labo même à 23h, après une très longue répétition ou après avoir conduit plus de 300 km juste pour les pré-cultures... «Tu poses trop de questions », «Trop de films dans ta tête » ... je n'oublierai jamais les moments que je partage avec toi et la chorale.

Pour terminer je voudrais remercier ma famille, Vincent-Henri, Hélène, Lily-Jade, Célestin et tout particulièrement mes parents qui m'ont donné des ailes grâce à leur amour inconditionnel. Et enfin, « merci d'un cœur reconnaissant, merci au Seigneur trois fois saint » «Tout ce que vous faites, faites-le de bon cœur, comme pour le Seigneur et non pour des hommes »(Colossiens 3 :27)

Table des matières

Abbréviation	1
--------------------	---

Introduction générale.....	5
----------------------------	---

Chapitre I – Introduction bibliographique

I. Ubiquinone	13
I.1 Occurrence, localisation et structure	14
I.2 Propriétés redox	15
I.3 Fonctions	16
I.3.1 Transport d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale	16
I.3.2 Anti-oxydant membranaire	21
I.3.3 Autres fonctions proposées	23
II. Biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie.....	24
II.1 Biosynthèse des métabolites.....	25
II.1.1 Précurseurs du noyau aromatique	25
II.1.2 Biosynthèse et assemblage des précurseurs de la queue de polyprényle	26
II.2 Voie de biosynthèse de l'ubiquinone.....	28
II.2.1 Biosynthèse de l'acide octaprénylhydroxybenzoïque (OHB).....	31
II.2.2 Modifications du noyau aromatique et deux protéines structurales.....	33
III. Biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie.....	38
III.1 Généralités.....	38
III.2 La protéine UbiT	39
III.3 Les deux protéines UbiU et UbiV	42
IV. Famille des protéases U32 et les autres membres de la famille U32	43
IV.1 Généralité.....	43
IV.2 Deux autres protéines de la famille U32 : RlhA (YdcP) et TrhP (YegQ).....	45
V. Protéines à centre Fe-S : Structures et fonctions.....	48
V.1 Structures.....	48
V.2 Fonctions	49
VI. Exemple d'une enzyme impliquée dans la réaction d'hydroxylation en anaérobie.....	52
VII. Objectif de la thèse.....	54

Chapitre II – Matériels et méthodes

I. Matériels biologiques	59
I.1 Souches bactériennes	59

I.2	Vecteurs plasmidiques	60
I.3	Milieu de culture.....	72
II.	Biologie moléculaire	72
II.1	Préparations des bactéries compétentes.....	72
II.2	Transformation des bactéries par choc thermique.....	72
II.3	Extraction et purification des plasmides.....	73
II.4	Mutagenèse.....	73
III.	Méthodes biochimiques.....	74
III.1	Analyses des protéines et électrophorèse	74
III.1.1	Dosage des protéines.....	74
III.1.2	Électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes.....	74
III.2	Surexpression et purification des protéines	76
III.2.1	UbiV d' <i>E. coli</i> sauvage et ses mutants cystéine en alanine (33.6 kDa).....	76
III.2.2	UbiU d' <i>E. coli</i> sauvage (38.1 kDa).....	78
III.2.3	Complexe UbiU-UbiV d' <i>E. coli</i> sauvage et ses mutants cystéine en alanine d'UbiU (70.6 kDa)	79
III.2.4	UbiV de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sauvage et ses mutants cystéine en alanine (33.7 kDa).....	79
III.2.5	UbiU de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sauvage (37.1 kDa).....	79
III.2.6	Trx-UbiT de <i>P. aeruginosa</i> (37.2 kDa).....	79
III.2.7	UbiK d' <i>E. coli</i> (13.8 kDa).....	80
III.2.8	Complexe UbiJ-UbiK d' <i>E. coli</i> (37.4 kDa).....	82
III.2.9	Domaine SCP2 d'UbiJ d' <i>E. coli</i> (14.7 kDa)	82
III.2.10	TrhP d' <i>E. coli</i> (52.3 kDa).....	83
III.3	Evaluation des cofacteurs	83
III.3.1	Dosage du fer	83
III.3.2	Dosage de soufre	84
III.3.3	Reconstitution de centre [4Fe-4S].....	84
III.4	Méthodes structurales	85
III.5	Méthodes biophysiques	86
III.5.1	Spectroscopie d'absorption UV-visible	86
III.5.2	Résonance paramagnétique électronique (RPE)	86

Chapitre III – Méga complexe Ubi d'*E. coli*

I.	Introduction	91
II.	Résultats	94

II.1	La biosynthèse de l'ubiquinone UQ8 se fait dans le cytosol chez <i>E.coli</i>	94
II.2	Un ensemble de 7 protéines Ubi forment un complexe de ~ 1 MDa	96
II.3	Le complexe multi-protéique Ubi contient des intermédiaires de biosynthèse de l'ubiquinone UbiV.....	99
II.4	Structure du domaine SCP2 de UbiJ liant les lipides isoprényles.....	101
II.5	Rôle essentiel de UbiJ dans la stabilisation du complexe Ubi	103
III.	Conclusion.....	104

Chapitre IV – UbiT, UbiU et UbiV d'*E. coli*

I.	Introduction	109
II.	Résultats	109
II.1	Découverte et caractérisations génétiques des gènes <i>ubiT</i> , <i>ubiU</i> et <i>ubiV</i> d' <i>E.coli</i> ..	109
II.1.1	4-Hydroxybenzoate (4-HB) - le précurseur de la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie	110
II.1.2	Les enzymes Ubi, à l'exception des hydroxylases, sont communes aux voies de biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie et en anaérobie.....	111
II.1.3	Identification de trois gènes nécessaires à la biosynthèse d'ubiquinone en anaérobie	112
II.1.4	La suppression de <i>yhbT</i> , <i>yhbU</i> ou <i>yhbV</i> résulte d'un déficit en ubiquinone spécifiquement dans des conditions anaérobiques	114
II.1.5	Absence totale de biosynthèse d'ubiquinone dans les mutants $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ cultivés dans les conditions anaérobiques strictes.....	114
II.1.6	Les gènes <i>ubiT</i> , <i>ubiU</i> et <i>ubiV</i> sont fortement co-occurrents exclusivement dans les génomes portant des signes de leur capacité à synthétiser l'ubiquinone.....	116
II.1.7	UbiU-UbiV sont nécessaires pour l'hydroxylation de DMQ ₈ de manière indépendante de l'oxygène	118
II.2	Caractérisations biochimiques des protéines UbiT, UbiU, UbiV et le complexe UbiU-UbiV.....	119
II.2.1	UbiT d' <i>E.coli</i>	119
II.2.2	UbiU, UbiV et le complexe UbiU-UbiV	122
II.2.3	UbiU d' <i>E.coli</i>	130
II.2.4	Complexe UbiU-UbiV	133
II.3	La présence des centres Fe-S dans la plupart des membres de la famille peptidase U32.....	137
III.	Conclusion.....	138

Chapitre IV – UbiT, UbiU et UbiV de *P. aéruginosa*

I.	Introduction	147
II.	Résultats	148

II.1	Découverte et caractérisation génétique des gènes <i>ubiT</i> , <i>ubiU</i> et <i>ubiV</i>	148
II.1.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 possède uniquement une quinone prédominante correspondant à l'ubiquinone (UQ ₉)	148
II.1.2	Identification des gènes <i>ubi</i> dans le génome de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	149
II.1.3	Les mutants transposables des gènes <i>ubiV_{Pa}</i> et <i>ubiU_{Pa}</i> présentent un défaut de croissance en dénitrification en accord avec une altération du contenu en UQ ₉	150
II.1.4	La dénitrification dépend des gènes <i>ubiT_{Pa}</i> , <i>ubiV_{Pa}</i> et <i>ubiU_{Pa}</i> via leur implication dans la biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène	151
II.1.5	UbiT _{PA} , UbiU _{PA} et UbiV _{PA} sont probablement essentiels pour le processus complet de dénitrification.....	153
II.1.6	Les cofacteurs à molybdoptéine ne sont pas impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie.....	154
II.2	Expression et purifications des protéines UbiT _{PA} , UbiU _{PA} , UbiV _{PA}	155
II.2.1	UbiV _{PA}	155
II.2.2	UbiU _{PA}	156
II.2.3	Complexe UbiU _{PA} -UbiV _{PA}	157
II.2.4	UbiT _{PA}	158
II.2.5	Thioredoxine (Trx).....	160
II.3	Caractérisations biochimiques des protéines UbiT _{PA} , UbiU _{PA} , UbiV _{PA}	160
II.3.1	UbiV _{PA} contient un centre [4Fe-4S].....	160
II.3.2	Capacité de liaison des lipides par UbiT _{PA} et UbiU _{PA}	162
III.	Discussion	163
Chapitre IV – RlhA et TrhP d'<i>E. coli</i>		
I.	Introduction	169
II.	Résultats	170
II.1	Purification et caractérisation biochimique d'RlhA	170
II.2	Purification et caractérisation biochimique de TrhP	173
III.	Discussion	175
Conclusion générale		179
Références bibliographiques		185

Abbr éviations

ΔCoQ	mutant par d é étion du g ène <i>COQ</i>
Δubi	mutant par d é étion du g ène <i>ubi</i>
4-AB	Acide 4-AminoBenzo ïque
4-HB	Acide 4-HydroxyBenzo ïque
APS	Ammonium PerSulfate
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
DMPD	N,N-DiMéthyl-p-PhénylèneDiamine
DMK	D é n éthylm énaquinone
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylène Diamine TétraAcétique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
pHBH	para-HydroxyBenzoate Hydroxylase
FMN	Flavine MonoNucléotide
FPP	FarnésylPyroPhosphate
GST	Glutathion S-Transférase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-ThioGalactoPyranoside
kDa	kilo Dalton
BN-PAGE	Blue native polyacrylamid gel electrophoresis
DDMQ	Déméthyl-DéMéthoxyQuinone
DMAP	DiM éthylAllyl monoPhosphate
DMAPP	DiM éthylAllyl PyroPhosphate
FNR	Ferredoxine - NADP ⁺ Réductase
FPP	Farn ésyl PyroPhosphate
G3P	Glyc érald éhyde-3-Phosphate
HPLC-ECD	High Performance Liquid Chromatography Coupled to ElectroChemical Detection
HPP	3- Hexaprényle-4-HydroxyBenzoate
IPP	Isopent ényl diphosphate

LB	Lysogeny Broth
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme réduite
NADP ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme oxydée
MEP	Méthyl Erythritol Phosphate
MK	Ménaquinone
MoCo	Cofacteur à Molybdène MoCo
MS	Spectrométrie de masse
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
OHB	3-Octaprenyl-4-HydroxyBenzoate
OPP	3-OctaprenylPhénol
pAB	Acide para-AminoBenzoïque
PDB	Protein Data Bank
pHB	Acide para-HydroxyBenzoïque
pHBH	para-HydroxyBenzoate Hydroxylase
ppm	partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotation par minute
SAM	S-AdénosyleMéthionine
SDS	DodécylSulfate de Sodium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SCP2	<u>S</u> terol <u>C</u> arrier <u>P</u> rotein 2
TEMED	NNN'N'-TetraMéthylEthylèneDiamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
PQ	Plastoquinone
UQ	Coenzyme Q ou ubiquinone
UV	Ultra-violet
WT	souche sauvage

INTRODUCTION GENERALE

L'ubiquinone (UQ chez les procaryotes) ou Coenzyme Q (CoQ chez les eucaryotes) est une petite molécule lipidique qui a un rôle de transporteur d'électrons et d'antioxydant dans la chaîne respiratoire. UQ se trouve dans la membrane plasmique des bactéries, et CoQ dans la membrane mitochondriale interne des eucaryotes. La production de cette molécule qui est essentielle à toutes les cellules est réalisée par une voie de biosynthèse très conservée chez tous les êtres vivants, des bactéries jusqu'à l'homme. Cette voie de biosynthèse comporte plus d'une dizaine de protéines. Cependant, en raison de l'interdépendance de toutes ces protéines, l'attribution d'un substrat spécifique à une enzyme précise n'est pas entièrement établie, de même que l'ordre des réactions qui ont lieu au cours de la voie de biosynthèse.

L'objectif général des études biochimiques sur la biosynthèse de l'ubiquinone est d'avoir une meilleure connaissance au niveau fondamental de cette voie, tant au niveau génétique (identification de nouveaux gènes *ubi*) qu'au niveau fonctionnel, biochimique et structural. Les buts principaux sont de : (i) identifier le rôle biologique et la fonction précise de chacune des protéines appartenant à la voie de biosynthèse ; (ii) caractériser biochimiquement et structuralement les protéines Ubi de façon isolées ou en sous-complexe ; (iii) déterminer leur mode d'organisation en un plus large complexe (composition exacte du complexe, stœchiométrie, localisation cellulaire). Pour cela, une combinaison d'approches multidisciplinaires présentes au sein du laboratoire sont utilisées : biologie moléculaire, biochimie, biophysique moléculaire (fluorescence, dichroïsme circulaire, stopped-flow) et biologie structurale (cristallographie de RX, et modélisation et dynamique moléculaire).

Ma thèse s'inscrit dans ce projet de recherche et est réalisée en collaboration avec deux groupes : celui du Dr. F. Pierrel et L. Pelosi (UMR5163, TIMC-IMAG, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UJF-Grenoble) pour ce qui concerne les études de génétique et de physiologie, et celui du Pr. F. Barras, L. Loiseau et L. Aussel (UMR7283, Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille, puis Institut Pasteur, Département de Microbiologie, Paris) pour ce qui concerne les études génétiques chez la bactérie *E. coli*.

Au début de ma thèse en octobre 2016, le groupe du Dr. Pierrel s'est intéressé à la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobiose et a pour cela mis en place un test de criblage conséquent qui a permis d'identifier 3 gènes, appelés *ubiU*, *ubiV* et *ubiT*, impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone en absence d'oxygène.

Mes objectifs de thèse ont alors été d'étudier biochimiquement et structuralement ces protéines afin de comprendre leur fonctionnement. Un aspect particulièrement intéressant dans ce système est le fait que ces protéines sont impliquées dans des réactions d'hydroxylation anaérobiose, donc sans dioxygène O₂. Les questions qui se posent alors sont :

i) quelle est la source d'oxygène introduite par le système UbiU/UbiV/UbiT ? ii) est ce que ces trois protéines fonctionnent ensemble ou séparément ? iii) quelle est leur lien avec les autres protéines Ubi dites aérobies ? Pour répondre à toutes ces questions, j'ai démarré un travail d'expression, purification et caractérisation biochimique de ces trois protéines UbiU, UbiV et UbiT. C'est ce travail que je vais présenter dans ce manuscrit de thèse.

Chapitre I
INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Ubiquinone

L'ubiquinone, ou coenzyme Q (abréviation : UQ), fait partie de la famille des quinones isoprénoides. Ces dernières sont présentes dans la plupart des membranes des organismes vivants, à l'exception de certaines bactéries à métabolisme fermentatif exclusif, comme les *Lactobacillus* ou les *Streptococcus*, qui ont perdu leur capacité à synthétiser des quinones isoprénoides (Collins and Jones 1981, Meganathan 2001, Nowicka and Kruk 2010) ainsi que les organismes à métabolisme méthanogène appartenant aux *Methanosarcinales* (Beifuss and Tietze 2005). Les quinones isoprénoides sont composées d'une tête aromatique hydrophile et d'une queue hydrophobe constituée d'unités terpéniques (5 atomes de carbone). La partie apolaire les rend liposolubles et les attache à la membrane lipidique, alors que celle hydrophile leur permet d'interagir avec les parties hydrophiles des protéines.

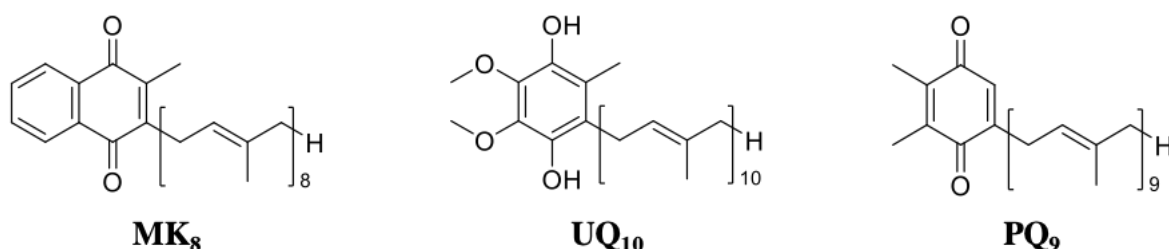


Figure 1. Exemples de naphthoquinone et de benzoquinones. Napthoquinone : MK8 (Ménaquinone 8) présente chez *E. coli*. Benzoquinones : UQ10 (Coenzyme Q 10) présent chez l'homme ; PQ9 (Plastoquinone 9) présente chez les cyanobactéries et les plantes.

L'ubiquinone joue principalement le rôle de transporteur des électrons et des protons dans les chaînes respiratoires et photosynthétiques afin de créer une force proton-motrice à travers ces membranes. Cette force proton-motrice permet ensuite de synthétiser l'ATP qui est la forme de stockage chimique de l'énergie dans la cellule. Ces quinones possèdent également d'autres fonctions, notamment celle d'anti-oxydant membranaire. Une grande majorité des quinones isoprénoides biologique fait partie de la famille des naphthoquinones ou des benzoquinones (Fig. 1). Dans la famille des naphthoquinones, les ménaquinones (MK) jouent un rôle de transporteur des électrons dans les chaînes respiratoire et photosynthétique des bactéries. Parmi les benzoquinones, les ubiquinones participent au transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale des eucaryotes et dans la membrane plasmique des bactéries (dont *E. coli*) ; et les plastoquinones (PQ) transfèrent des électrons dans la chaîne photosynthétique au sein des chloroplastes chez les plantes et les archées (Nowicka and Kruk 2010).

I.1 Occurrence, localisation et structure

L'ubiquinone est apparue probablement après les ménaquinones au cours de l'évolution. Dans le domaine des Eubactéries, l'ubiquinone n'est présente que chez les α -, β -, et γ -protéobactéries, alors que les autres groupes auxquels appartiennent les firmicutes, les actinobactéries ou les bactéries vertes sulfureuses, possèdent plutôt des ménaquinones (Nowicka and Kruk 2010). L'ubiquinone est également présente dans les organismes eucaryotes, ce qui est conforme à la théorie endosymbiotique, selon laquelle les protéobactéries étaient des ancêtres des mitochondries.

Chez les procaryotes, l'ubiquinone se trouve dans la membrane plasmique. Bien que l'ubiquinone ait été découverte lors des études sur les mitochondries, il a été démontré par la suite que toutes les endomembranes des cellules animales contiennent ces quinones isoprényles. Ainsi, on en trouve dans les membranes du reticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des lysosomes, des peroxisomes et de l'enveloppe nucléaire. Chez les mammifères, elle est présente dans les membranes biologiques de tous les tissus ainsi que dans le sang, au sein de lipoprotéines (Ernster and Dallner 1995). L'ubiquinone est présente dans la membrane interne des mitochondries chez *S. cerevisiae*. Chez les plantes, l'ubiquinone est présente majoritairement dans les mitochondries ; cependant on en trouve quand même des traces dans la plupart des membranes, excepté au sein des chloroplastes (Swiezewska, Dallner et al. 1993).

L'ubiquinone est composée d'un noyau benzoquinone substitué par deux groupes méthoxy en position C5 et C6, un groupe méthyle en position C2 et une chaîne polyisoprényle en position C3 (Fig. 2). Son noyau aromatique qui est très hydrophile lui permet d'interagir avec les protéines : c'est le siège de sa réactivité, liée à ses propriétés redox. Du fait de sa longue chaîne carbonée hydrophobe, l'ubiquinone est parfaitement soluble et mobile dans les bicouches lipidiques mais forme des agrégats micellaires lorsqu'il se trouve en milieu aqueux.

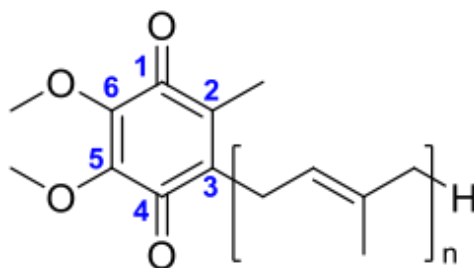


Figure 2. Ubiquinone ou coenzyme Q. n=6 chez *S. cerevisiae*, n=8 chez *E. coli*, n=10 chez l'homme.

Le nombre d'unités isoprényles de la partie lipophile de l'ubiquinone varie selon les organismes (Tableau 1). Le plus souvent, il existe une forme majoritaire qui coexiste avec des formes à chaînes plus courtes en faibles quantités.

Organismes	Forme(s) détectée(s)
Homme et grands vertébrés	UQ ₁₀ (UQ ₉)
Rongeurs	UQ ₉
Invertébrés	UQ ₈ à UQ ₁₀
Champignon	UQ ₆ à UQ ₁₀
<i>S. cerevisiae</i>	UQ ₆
Bactéries	UQ ₈ à UQ ₁₀ (UQ ₁ à UQ ₇)
<i>E. coli</i>	UQ ₈
Plantes supérieures	UQ ₉ ou UQ ₁₀
Plantes inférieures	UQ ₇ ou UQ ₈

Tableau 1. Formes de l'ubiquinone détectées chez divers organismes. Entre parenthèse, forme(s) minoritaire(s). (Nowicka and Kruk 2010)

I.2 Propriétés redox

Le noyau benzoquinone de l'ubiquinone lui confère des propriétés redox et acidobasiques, ces dernières lui permettent de jouer un rôle comme transporteur d'électrons et de protons mais aussi comme anti-oxydant. L'ubiquinone existe sous trois états d'oxydoréduction : entièrement oxydée (ubiquinone, Q), semi-oxydée (semiquinone, Q^{•-} ou QH^{•-}) et réduite (ubiquinol, QH₂) (Fig. 3). La forme réduite forme avec la forme oxydée un couple Q/QH₂ dont le potentiel standard est de 112 mV : il y a échange de deux protons et deux électrons.

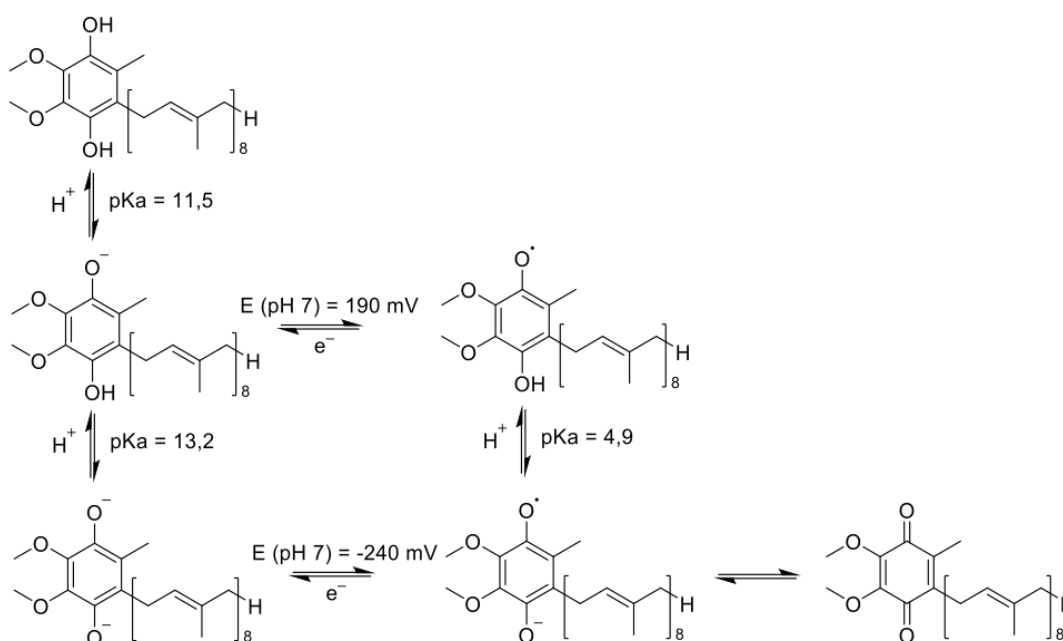


Figure 3. Constantes physiques associées à l'ubiquinone déterminées dans 80% éthanol. (Rich 1984)

I.3 Fonctions

L'ubiquinone exerce plusieurs fonctions biologiques très importantes dans différents domaines (Nohl, Staniek et al. 2003) : transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, rôle anti-oxydant, fonction de signalisation cellulaire et expression des gènes et rôle de régulateur de l'apoptose.

La chaîne respiratoire mitochondriale, également appelée chaîne de transport d'électrons (ETC, Electron Transport Chain en anglais), est cruciale pour la vie et la production d'énergie, sous forme d'ATP, et est la fonction principale de la mitochondrie. Cette chaîne respiratoire est formée de quatre complexes protéiques structurellement indépendants (Fig. 4). Ces composants peuvent être tour à tour accepteurs et donneurs d'électrons, et forment ainsi une chaîne d'oxydo-réduction. Trois complexes enzymatiques qui sont impliqués dans la translocation de protons de l'ETC (complexes I, III et IV), génèrent une force motrice des protons (Δp), constitué de deux composantes : i) un gradient de pH (ΔpH) du fait de l'acidification de l'espace intermembranaire, tandis que la matrice devient alcaline ; ii) une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\Psi$), l'intérieur devenant négatif et l'extérieur positif. Cette force protomotrice sert à fournir l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe V). Il s'agit de la théorie chimio-osmotique, établie par Peter Mitchell dans les années 1960 (Mitchell 1961).

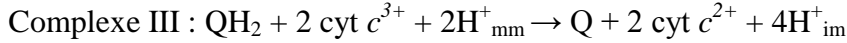
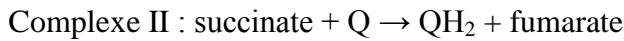
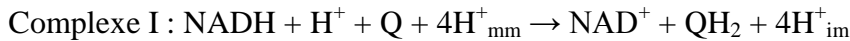
Parmi les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (FAD, FMN, centres Fe-S, hème, cytochrome b, cytochrome c), l'ubiquinone est le seul composant lipidique. Grâce à sa structure amphipolaire (le noyau quinone hydrophile et la longue chaîne carbonée hydrophobe), l'ubiquinone joue un rôle essentiel dans le transfert des électrons à travers ces complexes de l'ETC, dans la membrane plasmique chez les procaryotes et dans la membrane interne de la mitochondrie chez les eucaryotes.

I.3.1 Transport d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale

Les complexes enzymatiques de l'ETC contiennent de multiples cofacteurs rédox qui facilitent le transfert d'électrons intra-protéique, alors que le transport d'électrons inter-protéique entre les complexes I, II, III et IV est assuré par l'ubiquinone et le cytochrome c soluble, qui sont mobiles dans l'ETC.

Le complexe I et le complexe II utilisent le NADH et le succinate respectivement pour réduire l'ubiquinone Q en ubiquinol QH_2 . L'ubiquinol va transmettre ses électrons au complexe III, ce qui permettra de réduire le cytochrome c. Le cytochrome c va lui-même transférer ses électrons au complexe IV, ce qui aboutit à la réduction à quatre électrons du

dioxygène moléculaire O_2 , l'accepteur d'électrons final, en eau H_2O (Fig. 4). Les réactions catalysées par ces complexes sont présentées ci-dessous :



Q désigne ubiquinone et QH_2 ubiquinol, cyt *c* désigne cytochrome c, « mm » désigne la matrice mitochondriale et « im » l'espace inter-membranaire.

L'ensemble de ces réactions va permettre de générer un gradient de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice de la mitochondrie. Le flux de protons résultant pour rétablir l'équilibre permet à l'ATP synthase de fonctionner et de stocker l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP.

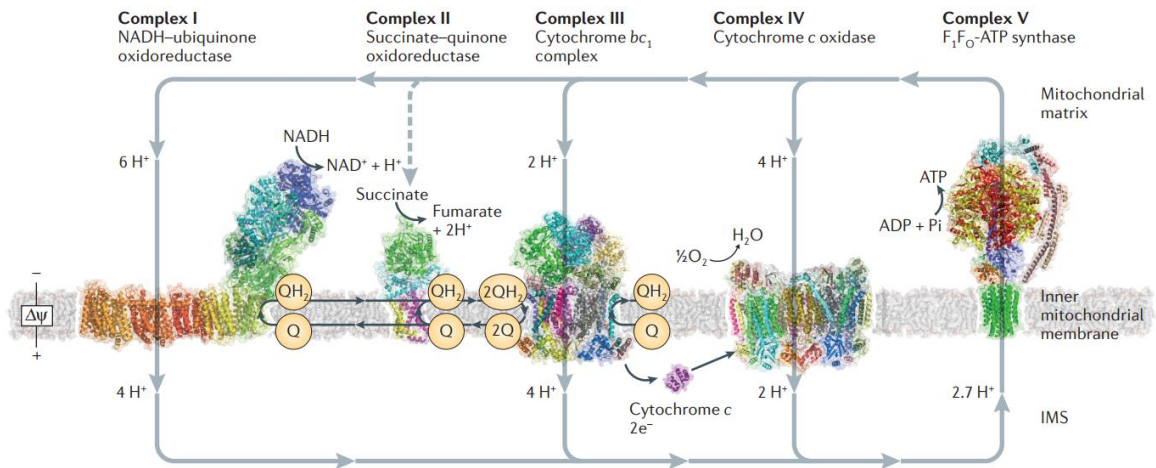


Figure 4. La chaîne de transport d'électrons. Les structures présentées sont : complexe I de *Thermus thermophilus* (code PDB 1BGY), complexe II du cochon sauvage *Sus scrofa* (code PDB 1ZOY), complexe III de *Bos taurus* (code PDB 1BGY) et complexe IV de *Bos taurus* (code PDB 1OCC). La structure de l'ATP synthase est issue de l'assemblage au sein d'une structure d'ensemble obtenue par cryomicroscopie électronique (résolue à 18 Å) de plusieurs structures de sous-complexes cristallisés séparément ; certaines unités non encore cristallisées ne sont pas représentées. IMS : espace inter-membranaire, $\Delta\Psi$: potentiel membranaire. (Sazanov 2015).

I.3.1.1 Des complexes I (NADH-ubiquinone Q-oxydoréductase) et II (succinate-coenzyme Q- oxydoréductase) ...

L'ubiquinone est réduite soit par le complexe I, également appelé NADH-coenzyme Q oxydoréductase, soit par le complexe II, également nommé succinate-coenzyme Q oxydoréductase. Le complexe I (Fig. 5), a été cristallisé dans son intégralité pour la première fois par Baradaran et ses collègues (Baradaran, Berrisford et al. 2013) (*Thermus thermophilus*). Il est composé de 2 grands domaines : périphérique et membranaire. Ces deux domaines ont des fonctions indépendantes : le domaine périphérique catalyse les réactions

d'oxydo-réduction, et le domaine membranaire favorise le transport des protons. Le domaine périphérique, situé dans la matrice chez les eucaryotes, et dans le cytoplasme chez les bactéries, est composé d'un module N (NADH-oxydase) et d'un module Q (contenant le coenzyme Q). Le module N transfère les électrons depuis le NADH jusqu'au coenzyme Q via un FMN et plusieurs centres Fe-S. Le FMN peut transférer deux électrons à la fois sous forme d'hydrure H^- et les centres Fe-S transfèrent les électrons un par un. Le domaine transmembranaire, ou module P est composé d'hélices α qui forment des demi-canaux de transport de protons. En fonction de l'état redox de l'ubiquinone, ces demi-canaux s'ouvrent et se ferment, permettant la translocation de protons depuis la matrice ou le cytoplasme jusqu'à l'espace intermembranaire.

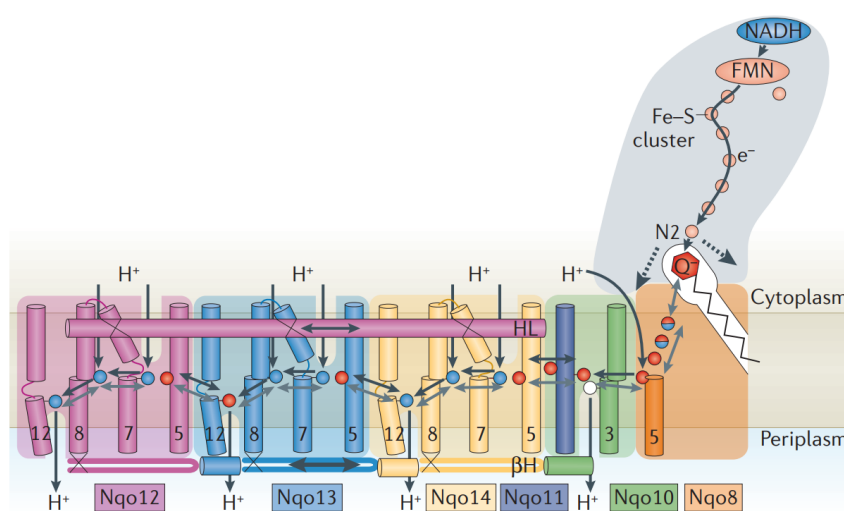


Figure 5. Proposition de fonctionnement pour le complexe I. Les modules N et Q sont en gris, le module P en couleur. Les changements conformationnels du module NADH-oxydase N_2 sont indiqués en pointillés et ceux affectant le module P en gris. Les transferts de protons possibles sont indiqués par des flèches noires et les résidus participant au transfert des protons sont représentés par des disques (rouges pour les glutamates, bleu pour les lysines et les histidines, blanc pour la tyrosine). (Sazanov 2015).

La première structure complète du complexe II, également appelé succinate-coenzyme Q-oxydoréductase, d'un organisme eucaryote a été obtenue en 2005 (Sun, Huo et al. 2005) (Fig. 6). La structure générale du complexe II a la forme d'une lettre « q », avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe qui est ancrée à la membrane. Il est composé de quatre protéines, dont deux sont hydrophiles et situées dans la matrice mitochondriale : une flavoprotéine (Fp) et une protéine à centres Fe-S (Ip). Les deux autres (CybL et CybS), en contact avec la protéine à centres Fe-S, lient un hème. La flavoprotéine à FAD oxyde le succinate en fumarate et transfère les électrons récupérés à la protéine à centres Fe-S. Cette dernière transfère alors ses électrons à l'hème, permettant ainsi la réduction de l'ubiquinone en l'ubiquinol dans la membrane mitochondriale interne.

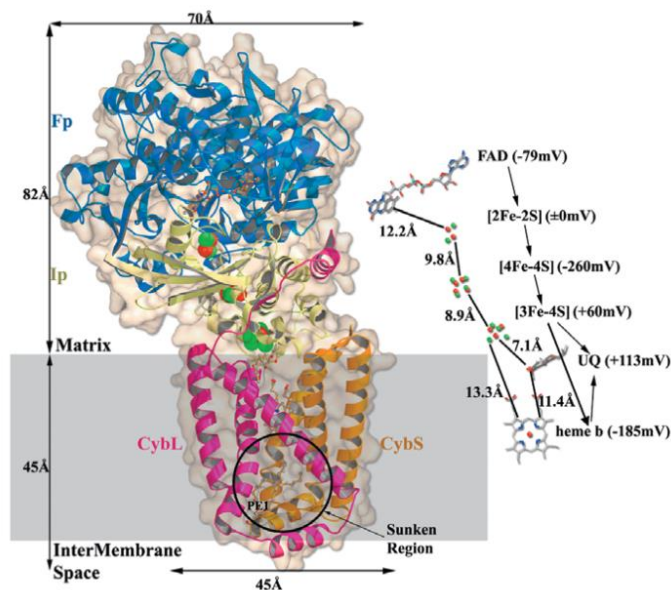


Figure 6. Structure du complexe II de *Sus scrofa* (cochon sauvage) et schéma du transfert d'électrons. Les différents groupes prosthétiques participant au transfert d'électrons sont représentés ainsi que l'ubiquinone (UQ) avec leurs distances centre à centre et leurs potentiels rédox, le sens du transfert d'électrons est indiqué par des flèches (Sun, Huo et al. 2005).

I.3.1.2 ...au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase)

Une fois réduit par le complexe I ou le complexe II, l'ubiquinone transfère ensuite ses électrons au complexe III, également appelé coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase ou cytochrome bc_1 . Le transfert de QH_2 des complexes I et II au complexe III se fait par libre diffusion dans la membrane interne mitochondriale. Il a toutefois été montré par microscopie électronique que les complexes I et III pouvaient s'assembler en un supercomplexe : l'ubiquinone peut alors passer directement d'un complexe à l'autre (Lenaz and Genova 2009).

La première structure complète du complexe III d'un organisme eucaryote (*bos taurus*), a été obtenue en 1998 (Iwata, Lee et al. 1998) (Fig. 7A). Le complexe III est composé de 11 sous-unités réparties dans trois domaines : un domaine intermembranaire, un domaine transmembranaire et un domaine matriciel. Le domaine inter-membranaire est formé de la protéine de Rieske contenant un centre $[2Fe-2S]$, du cytochrome c1 porteur d'un hème et d'une sous-unité (SU8) qui joue un rôle de protéine charnière. Le domaine transmembranaire comporte le cytochrome b, porteur de deux hèmes (bL et bH) et trois sous-unités SU7, SU9 et SU10. Ces dernières maintiennent le contact avec le cytochrome c1, le cytochrome b et la protéine de Rieske, et elles sont impliquées dans l'assemblage du complexe III. Le domaine matriciel est composé des 3 protéines « cores » ayant un rôle d'assemblage structural (sous-unités SU1, SU2 et SU6).

En 1975, Mitchell a proposé l'hypothèse d'un transfert d'électron cyclique, appelé cycle Q, en deux étapes, impliquant plusieurs formes de l'ubiquinone et permettant la translocation des protons à travers la membrane et la réduction du cytochrome c (Mitchell 1975) (Fig. 7B).

Ce cycle Q, appelé aussi cycle des quinones, fait l'hypothèse de l'existence de deux sites de fixation des quinones sur le complexe III, dont l'un (Q_0), situé près de la face externe, fixe préférentiellement QH_2 , tandis que l'autre (Q_i), situé près de la face interne, fixe préférentiellement Q.

Lors de la première étape, on a fixation et oxydation d'une molécule d'ubiquinol QH_2 en Q au site Q_0 . Deux protons sont alors injectés dans l'espace intermembranaire et deux électrons récupérés puis séparés :

- un des deux électrons est transféré le long d'une chaîne à haut potentiel au centre $[2Fe-2S]$ de la protéine de Rieske puis à l'hème du cytochrome c_1 et enfin au cytochrome c, transporteur soluble dans l'espace intermembranaire ;

- l'autre électron suit une chaîne de bas potentiel via les deux hèmes de type b jusqu'au site Q_i où il va réduire une molécule d'ubiquinone Q en ubi semiquinone $Q^{\cdot-}$.

Lors de la deuxième étape, la réduction d'une deuxième molécule d'ubiquinone Q en QH_2 permet l'injection de deux protons supplémentaires dans l'espace intermembranaire ainsi que la réduction d'un deuxième cytochrome c et le transfert d'un électron à l'ubisemiquinone $Q^{\cdot-}$. Deux protons récupérés de la matrice permettent alors de former l'ubiquinol QH_2 au site Q_i .

Tout se passe donc comme si les quinones jouaient le rôle de transporteurs de protons H^+ . Cette hypothèse de Mitchell a été confirmée depuis par la structure cristallographique du complexe III qui a révélé deux sites de fixation pour Q/ QH_2 , ainsi que deux chemins électroniques possibles à partir de Q_0 .

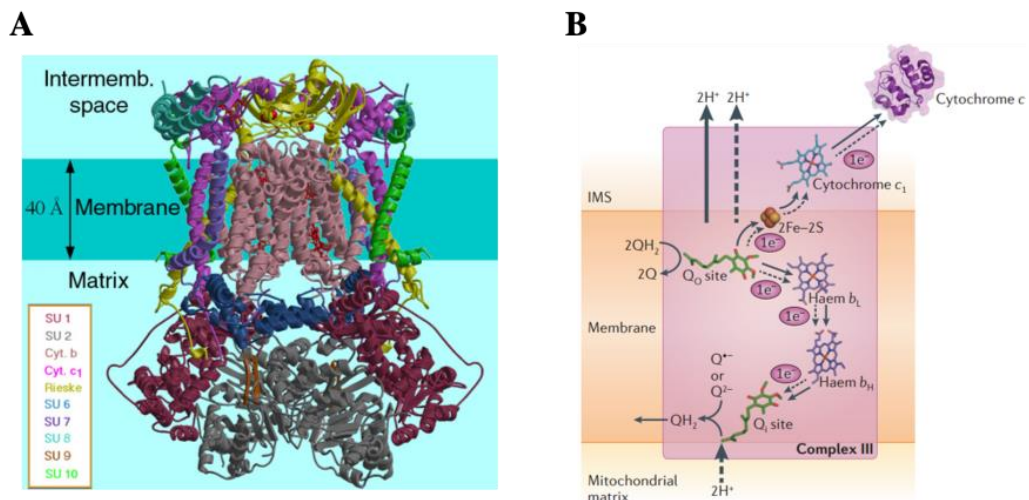


Figure 7. Le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase). (A) Structure du complexe III d'une mitochondrie de Bos taurus (code PDB 1NTZ1) (Iwata, Lee et al. 1998). (B) Schéma de fonctionnement du complexe III. Première étape indiquée par les flèches continues, deuxième étape indiquée par les flèches en pointillés. (Sazanov 2015).

I.3.2 Anti-oxydant membranaire

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) sont très réactives chimiquement, car elles possèdent des électrons de valence non appariés : elles peuvent dès lors réagir avec toutes les molécules rencontrées, lipides, protéines, ADN et causer des dégâts plus ou moins conséquents. Les anti-oxydants ont un rôle clef dans le bon fonctionnement cellulaire car ils permettent de limiter les dégâts causés par ces ROS.

Dans un certain nombre de processus enzymatiques, l'oxygène est réduit par un transfert d'électrons en radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (Cadenas, Hochstein et al. 1992). Les enzymes appartenant à ce groupe sont la monoamine oxydase dans la membrane mitochondriale externe, l'acyl-CoA oxydase, la xanthine oxydase, le cytochrome b5 ainsi que la cytochrome-P450 réductases microsomales et la NADPH oxydase dans les neutrophiles. Le transport d'électrons mitochondrial explique la majorité de la consommation d'oxygène cellulaire et la fuite d'électrons observée, 1–2%, est la contribution la plus importante à la production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Cadenas, Hochstein et al. 1992). Par conséquent, la concentration à l'état d'équilibre de radicaux superoxydes dans la matrice mitochondriale est plus importante que celle des autres compartiments cellulaires. L'activité fonctionnelle de la mitochondrie influence grandement la formation de ROS : moins l'ATP est produit et plus le potentiel de la membrane mitochondriale est élevé, plus les ROS sont produits et *vice versa*.

Plusieurs voies non enzymatiques sont aussi connues pour la production des ROS, par exemple l'oxydation dépendante de H_2O_2 des métaux de transition libres ou liés aux protéines, notamment le fer et le cuivre (Halliwell and Gutteridge 1984). Il s'agit de la réaction de Fenton : $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$

Différents peroxydes et radicaux peroxydes sont également produits lors de l'oxydation des lipides et des protéines. Ils interagissent avec de l'oxyde nitrique, donnant le peroxyde nitrite, un composé hautement cytotoxique qui réagit avec des groupements sur des protéines, par exemple les thiols, les centres de métaux de transition et certains acides aminés, comme la tyrosine en particulier. Une autre réaction courante dans les systèmes biologiques est celle avec le dioxyde de carbone, conduisant à la formation de dioxyde d'azote NO_2 et de radical carbonate $CO_3^{\cdot-}$ (Stamler, Singel et al. 1992, Pacher, Beckman et al. 2007).

L'ubiquinone est un anti-oxydant très important : c'est le seul anti-oxydant membranaire produit directement au sein de toutes les cellules. Pour que l'effet anti-oxydant soit optimal, il faut que la quinone soit majoritairement sous sa forme réduite QH_2 . Il existe de nombreuses

enzymes qui peuvent garder l'ubiquinone sous forme réduite, telles que la NADH cytochrome b5 réductase (Buffinton, Ollinger et al. 1989) ou la NADH coenzyme Q réductase (complexe I de la chaîne respiratoire) (Takahashi, Okamoto et al. 1996). L'ubiquinol QH₂ étant localisé dans les membranes à proximité de lipides insaturés, elle agit comme piègeur de radicaux libres, dans toutes les membranes de tous les tissus dans lesquels elle est présente dans des proportions 5 à 10 fois plus élevées que celles de la vitamine E (également appelé α -tocophérol, c'est un anti-oxydant présent dans l'alimentation). De nombreuses études ont montré que l'ubiquinol permet d'empêcher l'oxydation des lipides. L'oxydation des lipides est une réaction en chaîne qui est initiée par l'action d'un radical O₂^{•-} ou OH[•] sur un acide gras polyinsaturé d'où résulte la formation d'un radical centré sur un carbone (LH → L[•]). S'ensuit la phase de propagation où le radical formé réagit avec l'oxygène moléculaire O₂ en formant un radical peroxyde (LOO[•]) qui peut réagir avec un nouveau lipide et propager la réaction. Les anti-oxydants membranaires comme la vitamine E agissent durant cette phase de propagation en éliminant LOO[•]. La vitamine E est alors régénérée par l'action de l'ascorbate (Fig. 8). L'ubiquinol agit en amont de la formation de LOO[•] en limitant la réaction dès la phase d'initiation : en effet, QH₂ peut réagir avec le radical perferryle Fe³⁺-O₂^{•-} pour former l'ubisemiquinone QH[•] et H₂O₂. Il est même possible que l'ubisemiquinone réagisse avec L[•] pour former l'ubiquinone qui sera réduite par la suite sous l'action du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). L'ubiquinol est également capable de limiter la phase de propagation et est plus efficace que l'ascorbate pour régénérer la vitamine E. L'ubiquinol est donc un anti-oxydant particulièrement efficace en ce qui concerne les lipides. L'effet anti-oxydant des ubiquinones a été démontré directement chez une levure déficiente en coenzyme Q subissant une forte peroxydation lipidique (Poon, Do et al. 1997).

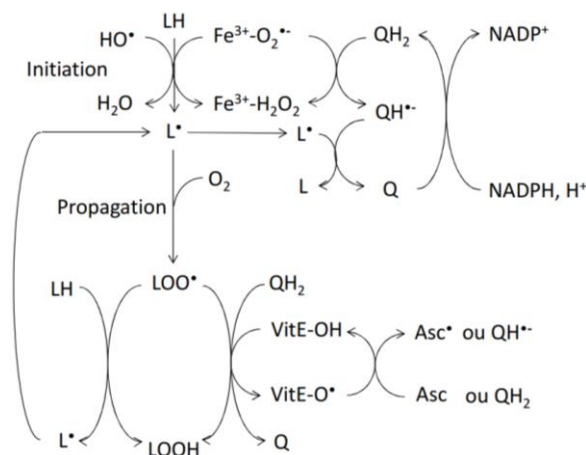


Figure 8. Sites d'action de l'ubiquinone sur la peroxydation des lipides. LH, acide gras polyinsaturé ; L[•], radical centré sur un carbone ; LOO[•], radical lipo-peroxyde ; LOOH, peroxyde de lipide ; HO[•], radical hydroxyle ; Fe³⁺-O₂^{•-}, radical perferryle ; QH₂, ubiquinol ; QH[•], ubisemiquinone ; VitE-O[•], radical α -tocophérol ; Asc[•], radical ascorbyle. (Bentinger, Brismar et al. 2007)

L'ubiquinol possède également une action antioxydante concernant les protéines et l'ADN. Il est aussi très actif dans le sang même s'il est dix fois moins présent que la vitamine E dans les lipoprotéines du sérum. En effet, son efficacité dans la régénération de la vitamine E et son mécanisme d'action en amont de la propagation des radicaux font de lui un excellent anti-oxydant, même en proportions réduites, d'autant plus que les mécanismes de réduction étant très efficaces dans le sang, l'ubiquinol peut facilement y être régénéré.

L'activité anti-oxydante de l'ubiquinol n'est pas uniquement intracellulaire. En effet, sa diffusion dans les membranes lui permet également de régénérer l'ascorbate extracellulaire par transfert d'électrons à travers la membrane (Weber, Sejersgard Jakobsen et al. 1994).

L'ubiquinone est donc un anti-oxydant liposoluble extrêmement efficace en raison de sa présence à de fortes concentrations dans toutes les membranes plasmiques et de sa capacité à être régénéré dans sa forme active très rapidement.

I.3.3 Autres fonctions proposées

En plus d'être un élément important de la chaîne respiratoire et un anti-oxydant très efficace, l'ubiquinone participe également à plusieurs autres processus biologiques.

Tout d'abord, il intervient dans la régulation du rapport NADH/NAD⁺ dans le cytosol, dans la réduction de l'ascorbate ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaire en tant que cofacteur de la NADH-oxydase Q-dépendante (Gomez-Diaz, Rodriguez-Aguilera et al. 1997). L'ubiquinone contribue également à empêcher l'apoptose cellulaire : avec d'autres molécules, elle permet d'éviter la création de pores de transition. En effet, l'ouverture des pores de transition, qui permettent la translocation de molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 Da, peut conduire à divers événements apoptotiques comme une chute de l'ATP, une fuite de cytochrome c hors de la mitochondrie, une activation de la caspase-9 (protéase à cystéine), une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une fragmentation de l'ADN (Papucci, Schiavone et al. 2003).

L'ubiquinone est par ailleurs impliquée dans le découplage du fonctionnement de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP. En effet, les protéines découplantes, présentes à la membrane interne de la mitochondrie, ont besoin de l'assistance de l'ubiquinone pour transférer des protons (fournis par des acides gras) depuis l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale. Le gradient de protons produit par la chaîne respiratoire est alors découplé de la synthèse d'ATP et de la chaleur est produite à la place (Echtay, Winkler et al. 2001).

L'ubiquinone possède aussi des effets anti-inflammatoires en jouant sur l'expression du facteur de transcription NFκB1. L'incorporation d'ubiquinone dans les lymphocytes et les

monocytes conduirait à la libération de médiateurs dans le sang influençant l'expression de NFκB1 dans différents tissus (Schmelzer, Lindner et al. 2007).

II. Biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone ont fait l'objet de nombreuses études au cours des cinquante dernières années, depuis les travaux pionniers de Cox et Gibson en 1964 (Cox and Gibson 1964). La biosynthèse de l'ubiquinone se fait à partir de métabolites indépendamment synthétisés et également utilisés dans d'autres voies de biosynthèse : il s'agit du 4-hydroxybenzoïque (4-HB), du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) (Fig. 9).

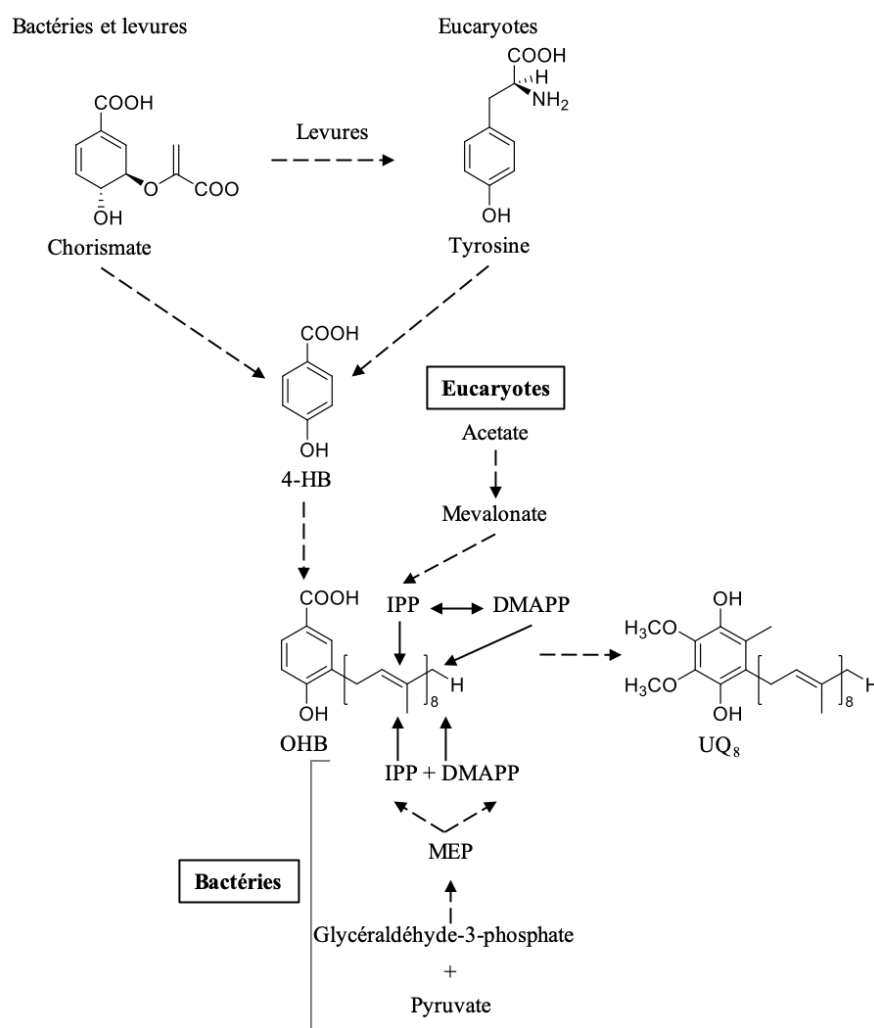


Figure 9. Différents précurseurs biosynthétisés de l'ubiquinone. Les flèches en pointillés désignent l'intervention de plusieurs enzymes, les flèches en continu indiquent l'origine de différents précurseurs de l'ubiquinone. Abréviations utilisées pour diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), isopentényl-pyrophosphate (IPP), 4-hydroxybenzoate (4-HB), 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate (OHB) et ubiquinone (UQ₈) (Adapté de Meganathan 2001).

Le noyau quinone est dérivé de la voie du shikimate *via* le chorismate chez les bactéries ou de la tyrosine chez les eucaryotes supérieurs (Bentley 1990). La levure *S. cerevisiae*,

micro-organisme eucaryote, est capable de synthétiser l'ubiquinone à partir du chorismate ou de la tyrosine (Olson and Rudney 1983). Chez les eucaryotes, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), qui est nécessaire pour la formation de la chaîne latérale polyprényle, est dérivé de l'acétate via la voie du mévalonate ; alors que chez les bactéries, il est formé à partir de la voie du méthylérythritol phosphate, dite aussi voie MEP/DOXP (pour 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate/1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate), également appelé « voie non-mévalonate » (Rohmer 1999) (Fig. 9).

Chez les bactéries, ces différents métabolites (4-HB, DMAPP et IPP) sont assemblés par des enzymes spécifiques de la biosynthèse de l'ubiquinone pour former l'acide 3-octaprényl-4-hydroxybenzoïque (OHB) dont elles modifient ensuite le noyau aromatique afin d'obtenir l'ubiquinone (Meganathan 2001) (Fig. 9 et Fig. 12).

Selon des hypothèses basées sur des expériences de génétiques (expériences de knock-out essentiellement), la partie terminale de la biosynthèse de l'ubiquinone bactérienne différerait de la levure dans l'ordre des événements synthétiques : chez les procaryotes, les modifications du noyau après la fixation de la queue lipidique commencerait par la décarboxylation, juste avant l'hydroxylation et la méthylation alors que chez les eucaryotes, la décarboxylation se produirait après l'hydroxylation et la méthylation (Turunen, Olsson et al. 2004). Néanmoins, aucune preuve biochimique *in vitro* n'a parvenu encore à confirmer ces hypothèses génétiques.

II.1 Biosynthèse des métabolites

II.1.1 Précurseurs du noyau aromatique

Le précurseur du noyau aromatique de l'ubiquinone chez les procaryotes et chez les eucaryotes est connu depuis les années 80 pour être l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) (Olson and Rudney 1983).

Dans les années 70, une grande partie des premiers travaux sur la voie de la biosynthèse du noyau quinone était le résultat d'études sur *E. coli* menées par Gibson, Young et ses collègues (Gibson 1973, Gibson and Young 1978) utilisant la méthodologie du traceur isotopique. Il a été démontré que le [G-¹⁴C] -shikimate était incorporé à l'ubiquinone, établissant que la quinone est un produit de la voie de shikimate (Fig. 10).

Le micro-organisme eucaryote, *S. cerevisiae*, peut synthétiser l'ubiquinone à partir de chorismate ou de la tyrosine (Fig. 10). La voie préférentielle est celle du chorismate : la synthèse à partir de la tyrosine ne se fait que si les voies du shikimate et du chorismate sont bloquées (Marbois, Gin et al. 2009). Chez les eucaryotes supérieurs, comme l'homme, la synthèse de l'ubiquinone se fait exclusivement à partir de la tyrosine.

Récemment, suite à la détection d'intermédiaires aminés dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, l'acide 4-aminobenzoïque (4-AB) a été également proposé comme précurseur du noyau aromatique de l'ubiquinone chez *S. cerevisiae* (Pierrel, Hamelin et al. 2010). Le 4-AB est un précurseur dont la synthèse découle également de la voie du chorismate et dont les étapes de synthèse sont connues. Des études complémentaires, réalisées avec des composés marqués, confirment que le 4-AB est bien précurseur de l'ubiquinone chez la levure *S. cerevisiae* mais pas chez les mammifères (souris, homme) ni chez *E. coli* (Xie, Williams et al. 2015). Ces études, en utilisant du $^{13}\text{C}_6$ -resveratrol et du $^{13}\text{C}_6$ -coumarate, ont également permis de montrer que le coumarate et le resveratrol pouvaient également être précurseurs du noyau benzénique de l'ubiquinone chez *S. cerevisiae*, *E. coli*, la souris et l'homme (Fig. 10).

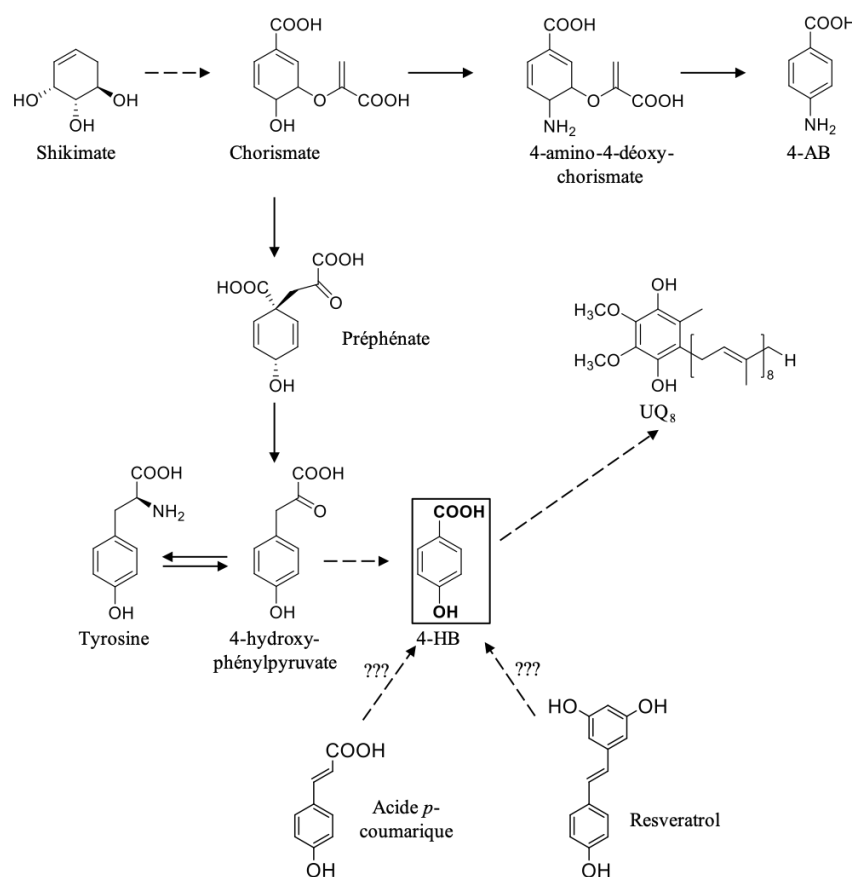


Figure 10. Origine du noyau aromatique de l'ubiquinone chez les procaryotes et les eucaryotes. Les flèches ne comportant pas de points d'interrogation désignent les étapes dont les enzymes sont connues. Les flèches en continu indiquent l'intervention d'une seule enzyme et les flèches en pointillées de plusieurs. Abréviations utilisées pour 4-hydroxybenzoate (4-HB), acide 4-aminobenzoïque (4-AB) et ubiquinone (UQ₈) (Adapté de Meganathan 2001).

II.1.2 Biosynthèse et assemblage des précurseurs de la queue de polyprényle

L'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) sont les précurseurs biosynthétiques du farnésylpyrophosphate (FPP), qui constitue lui-même la brique de base de la synthèse de la chaîne polyisoprénylepyrophosphate de l'ubiquinone.

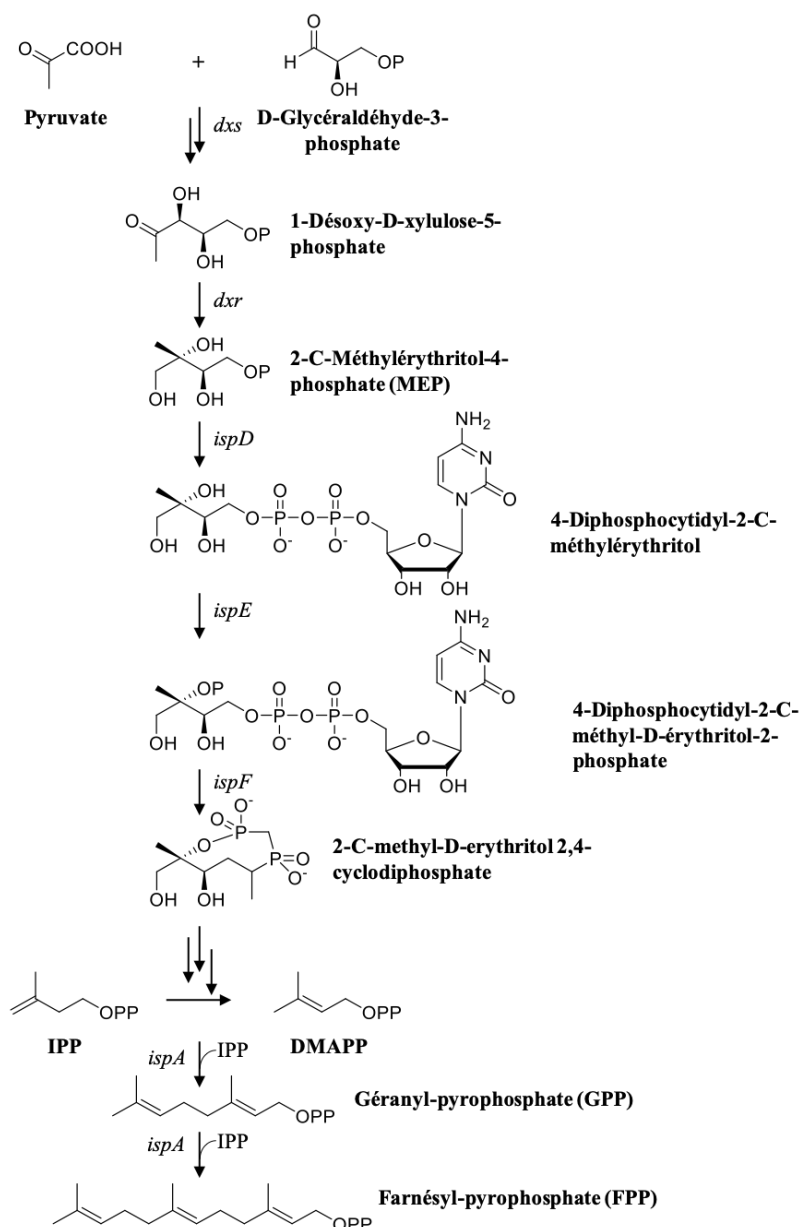


Figure 11. Biosynthèse de l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate par la voie non-mévalonate (la voie du MEP) et la formation du farnésyl-pyrophosphate (FPP) chez *E. coli*. Chaque flèche correspond à l'intervention d'une enzyme. Abréviations utilisées pour isopentényl diphosphate (IPP) et diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP). (Adapté de Meganathan 2001).

Il existe deux voies différentes pour la biosynthèse de ces précurseurs. Les bactéries utilisent la voie du MEP (Méthyl Erythritol Phosphate) (Fig. 11), tandis que les micro-organismes eucaryotes (champignons, algues, protozoaires) utilisent la voie du mévalonate (Disch and Rohmer 1998, Rohmer 1999). Cependant, il y a des exceptions : chez certains organismes eucaryotes, comme les algues vertes et le parasite *Plasmodium falciparum*, IPP et DMAPP sont synthétisés via la voie du MEP, tandis que quelques bactéries utilisent la voie du mévalonate (Eisenreich, Rohdich et al. 2001). Globalement, la voie du MEP utilisé par la

majorité des procaryotes, se sert de deux produits de la glycolyse, le pyruvate, et le glyceraldéhyde-3-Phosphate (G3P).

Pour la construction de la chaîne polyisoprénylpyrophosphate de l'ubiquinone, une fois que le DMAPP (5 atomes de carbone) est synthétisé, il sert d'amorce sur laquelle un IPP est ajouté par « condensation tête-à-queue », ce qui donne du géranyl-pyrophosphate (GPP, 10 atomes de carbone). Ensuite, le GPP subit une condensation avec une autre molécule d'IPP qui donne du farnésyl-pyrophosphate (FPP, 15 atomes de carbone).

II.2 Voie de biosynthèse de l'ubiquinone

A ce jour, la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* nécessite douze gènes, appelés les gènes *ubi* (*ubiA*, *ubiB*, *ubiC*, *ubiD*, *ubiE*, *ubiF*, *ubiG*, *ubiH*, *ubiI*, *ubiJ*, *ubiK* et *ubiX*) ; dont la plupart code pour des enzymes qui sont impliqués dans la décoration du noyau quinone du 4-HB (Fig. 12).

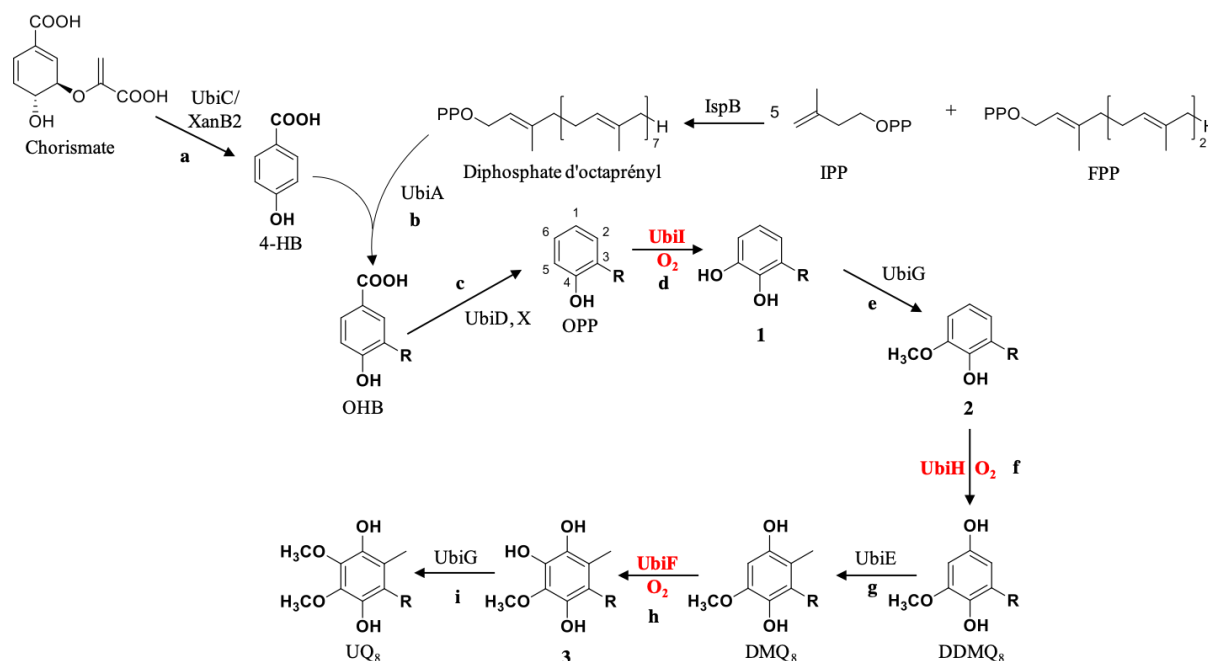


Figure 12. La voie de biosynthèse de l'ubiquinone en aérobiose chez *E. coli*. La numérotation des atomes de carbone aromatiques est indiquée sur l'OPP et la queue octaprényle est représentée par R en position C3 des différents intermédiaires de biosynthèse. Le nom des enzymes catalysant les réactions (chacune identifiée par une lettre minuscule) est indiqué. Abréviations utilisés : isoprényl diphosphate (IPP), farnésyl diphosphate (FPP), 4-hydroxybenzoate (4-HB), 3-octaprényle-4-hydroxybenzoate (OHB), 3-octaprénylephénol (OPP), ubiquinone (UQ_8), C1-déméthyl-C6-déméthoxy- Q_8 (DDMQ $_8$) et C6-déméthoxy- Q_8 (DMQ $_8$). La protéine XanB2, présente chez certains procaryotes mais pas chez *E. coli*, catalyse la production de 4-HB à partir de chorismate. (Pelosi, Vo et al. 2019)

Un gène, le gène *ubiB*, serait impliqué dans des processus de régulation de la biosynthèse de l'ubiquinone. Mais son rôle est encore mal connu.

Dans certains cas, la mutation des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* conduit à l'accumulation de 3-octaprénylphénol (OPP), un intermédiaire précoce de la voie de biosynthèse et à une croissance bactérienne anormale (Fig. 12 et Tableau 2).

Gene affecté par la mutation	Réaction déficiente	Intermédiaires de l'ubiquinone accumulés	Croissance	Références
<i>ubiC</i>	a	Aucun ^a	Capable de pousser sur succinate	(Lawrence, Cox et al. 1974)
<i>ubiD</i>	c	OHB ^a	Croissance réduite sur succinate en aérobie	(Gulmezian, Hyman et al. 2007)
<i>ubiX</i>	c	OHB ^a	Croissance réduite sur succinate en aérobie	(Gulmezian, Hyman et al. 2007)
<i>ubiI</i>	d	4-HP ₈ ^{a, b}	Incapable de pousser sur succinate et glucose en aérobie	(Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013)
<i>ubiG</i>	i	OPP et composés 3 (Fig. 12)	Incapable de pousser sur succinate en aérobie	(Stroobant, Young et al. 1972)
<i>ubiE</i>	g	DDMQ ₈	Incapable de pousser sur succinate en aérobie	(Lee, Hsu et al. 1997)
<i>ubiF</i>	h	DMQ ₈	Croissance réduite sur glucose et incapable de pousser sur succinate	(Kwon, Kotsakis et al. 2000)
<i>ubiA</i>	b	Absence de produits prénylés formés	Incapable de pousser sur des sources de carbone non fermentables en aérobie	(Wu, Williams et al. 1993)
<i>ubiH</i>	f	OPP, composés 1 et 2 (Fig. 12)	Capable de pousser sur succinate en aérobie	(Young, Stroobant et al. 1973, Nakahigashi, Miyamoto et al. 1992, Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013)
<i>ubiJ</i>	Rôle structural	Absence des intermédiaires caractérisés	Croissance réduite en LB en conditions aérobies	(Aussel, Loiseau et al. 2014)
<i>ubiK</i>	Rôle structural	OPP	Capable de pousser en LB en conditions aérobies	(Loiseau, Fyfe et al. 2017)

Tableau 2. Différents intermédiaires accumulés de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez les mutants d'*E. coli* et leur croissance. ^aUn faible niveau de l'ubiquinone est observé dans ces souches ; ^b3-octaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP₈), un intermédiaire qui résulte d'un défaut d'hydroxylation en C5. En fait, le 4-HP₈ est formé par l'hydroxylation de l'OPP sur C1 par UbiH sans réaction d et e.

A la vue des connaissances résumées dans ce tableau, on voit que l'ordre des 2 premières hydroxylations et méthylation catalysés par les enzymes UbiI et UbiH d'une part et UbiG d'autre part, n'est pas entièrement établi. De façon consensuel, les voies décrites dans la littérature (Fig. 12) font intervenir d'abord l'hydroxylation en C5 par UbiI puis la méthylation sur la fonction -OH nouvellement créé par UbiG, et enfin l'hydroxylation en C1 par UbiH. Néanmoins, le fait d'accumuler l'intermédiaire 4-HP₈ dans un mutant $\Delta ubiI$ fait penser qu'UbiH pourrait intervenir avant UbiG. Ce débat n'est pas tranché à l'heure actuelle, et attend que des tests enzymatiques *in vitro* soient réalisés avec les enzymes concernées et les différents substrats postulés, substrats non commerciaux et très peu solubles en milieu aqueux, ce qui complique la tâche. Il n'est pas non plus à exclure que les enzymes puissent

avoir un ordre indéterminé et soit capables d’avoir une relative promiscuité dans la nature chimique de leur(s) substrat(s). Il est ainsi intéressant de noter qu’UbiF, qui normalement catalyse l’hydroxylation en C6, est capable de compléter partiellement (15 %) l’absence d’UbiI et de catalyser une réaction d’hydroxylation en C5 (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013).

La voie de biosynthèse de l’ubiquinone étant essentielle à toutes les cellules eucaryotes, des maladies génétiques lourdes associées à une espérance de vie courte sont liées à des mutations sur certains gènes codant pour les enzymes entrant directement en jeu dans cette biosynthèse. Des phénotypes relativement divers sont associés à ces mutations : de troubles multi-systémiques mortels chez les nouveau-nés à des encéphalopathies développées à l’âge adulte. La plupart des symptômes sont communs à ceux observés dans les maladies liées à la déficience de la chaîne respiratoire : encéphalomyopathie, ataxie, acidose lactique, surdité neurosensorielle, dépigmentation rétinienne et cardiomyopathie hypertrophique. D’autres, comme le syndrome néphrotique cortico-résistant lié à des mutations dans le gène *coq6*, sont spécifiques de la déficience en ubiquinone. La liste des gènes *coq* dont des mutations sont impliqués dans diverses pathologies est présentée dans le Tableau 3 :

Gène	Homologues chez <i>E. coli</i>	Symptômes	Age de développement des symptômes
<i>PDSS1</i>	<i>IspB</i>	Léger retard mental, macrocéphalie, légère acidose lactique, neuropathie périphérique, livedo reticularis, atrophie optique, valvulopathie cardiaque	Petite enfance
<i>PDSS2</i>	<i>IspB</i>	Syndrome néphrotique cortico-résistant, hypotonie, syndrome de Leigh, épilepsie, encéphalomyopathie et ataxie, surdité, dépigmentation réticulaire	Néonatal à petite enfance
<i>coq2</i>	<i>ubiA</i>	Trouble multisystémique néonatal mortel, acidose lactique, syndrome de Leigh, épilepsie, cardiomyopathie hypertrophique, nystagmus, syndrome néphrotique cortico-résistant, encéphalomyopathie, épisodes ressemblant à des ictus, surdité, dépigmentation rétinienne, atrophie multisystème déclenchée à l’âge adulte	Néonatal à la soixante-dizaine
<i>coq4</i>		Encéphalomyopathie	Néonatal
<i>coq6</i>	<i>ubiF</i>	Syndrome néphrotique cortico-résistant, surdité, épilepsie	Néonatal
<i>ADCK3</i>	<i>ubiB</i>	Ataxie cérébelleuse, encéphalopathie, épilepsie, dystonie, spasticité	Néonatal à la vingtaine
<i>ADCK4</i>	<i>ubiB</i>	Syndrome néphrotique cortico-résistant, léger retard mental	Néonatal à la vingtaine
<i>coq9</i>		Trouble multisystémique néonatal mortel, acidose lactique, encéphalomyopathie	Néonatal

Tableau 3. Maladies génétiques associées à des mutations ponctuelles dans les gènes de la biosynthèse de l’ubiquinone chez l’homme, ainsi que leurs homologues chez *E. coli*.

L’étude biochimique et structurale de la voie de biosynthèse de l’ubiquinone pourrait donc servir à mieux comprendre les bases moléculaires des maladies génétiques associées à une déficience en CoQ chez l’homme.

II.2.1 Biosynthèse de l'acide octaprénylhydroxybenzoïque (OHB)

II.2.1.1 Biosynthèse de la chaîne octaprényle

La formation de la queue octaprényle chez *E. coli* est catalysée par l'octaprénylpyrophosphate synthase (appelée IspB) à partir d'isopentényl diphosphate (IPP) et de farnésyl diphosphate (FPP) (Fig. 12). Comme indiqué précédemment (Tableau 1), la longueur précise de la chaîne latérale du polyprényle présent dans un organisme est une constante et est déterminée par la nature de cette enzyme. En effet, une souche mutante KO de la levure *S. cerevisiae*, rendue incapable de produire l'hexaprényl diphosphate, complétée par IspB d'*E. coli* permet la synthèse d'ubiquinone avec huit unités isoprényles et non six comme dans la levure (Okada, Suzuki et al. 1996). D'un point de vue structural, les isoprénylpyrophosphate synthases de *S. pombe*, du rat et de l'homme sont des hétérotétramères de deux sous-unités protéiques, Pdss1 et Pdss2, tandis que IspB d'*E. coli* est un homo-dimère et la protéine est soluble. En 2015, l'octaprénylpyrophosphate synthase IspB d'*E. coli* a été cristallisée avec l'IPP (structure résolue à 2,45 Å, code PDB 3WJO) et avec un analogue sulfaté du FPP (FsPP) (structure résolue à 2,6 Å, code PDB 3WJN) (Fig.13A) (Han, Chen et al. 2015). C'est la première fois qu'une enzyme de la famille des transprényltransférases à longue chaîne est cristallisée avec des ligands. La structure obtenue a permis d'identifier deux méthionines situées en bas du tunnel du site actif et responsables de la longueur finale de la chaîne isoprényle (Fig.13B). Ces deux méthionines fermentaient le site actif et imposeraient ainsi une longueur de chaîne dans *E. coli*.

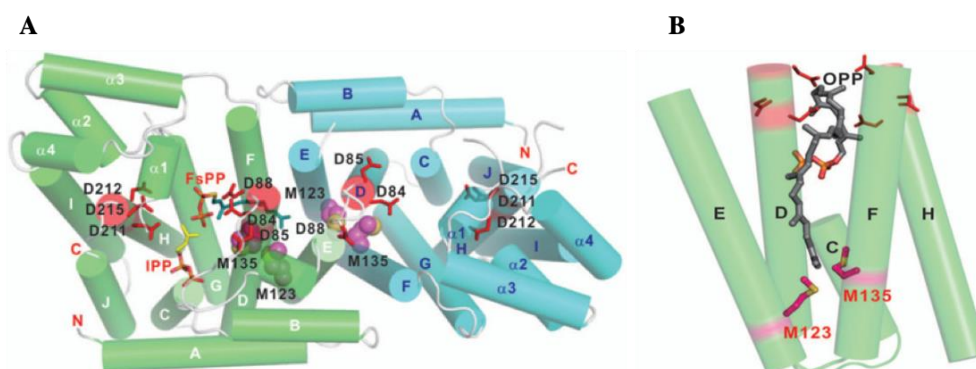


Figure 13. Structure de l'octaprénylpyrophosphate synthase IspB chez *E. coli*. (A) Vue de profil illustrée à l'aide d'un diagramme à cylindres. Deux sous-unités identiques sont représentées en vert et en cyan, respectivement. Deux motifs conservés DDXXD sont représentés en rouge. Les FsPP et IPP observés dans la structure de l'octaprénylpyrophosphate synthase sont présentés en bâton, colorés en bleu et jaune, respectivement. Deux résidus méthionines 123 et 135 situés à la partie inférieure du tunnel de site actif sont représentés en sphère et colorés en magenta. (B) Deux Méthionines 123 et 135, présentés en bâton et colorés en magenta, sont importants pour la détermination de la longueur de l'octaprénylpyrophosphate (OPP). (Han, Chen et al. 2015).

Des études de fractionnement submitochondrial ont démontré que la polyprénylpyrophosphate synthase de *S. cerevisiae*, Coq1, qui présente 34% d'identité de séquence avec IspB d'*E. coli*, est une protéine matricielle périphérique associée à la membrane interne mitochondriale (Gin and Clarke 2005).

II.2.1.2 Couplage de la chaîne octaprényle

Chez *E. coli*, la prénylation du 4-hydroxybenzoate (4-HB) en 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate (OHB) est catalysé par UbiA (Fig. 12 et Fig. 14A). UbiA libère le pyrophosphate du substrat IPP (isoprényl phosphate) pour générer un intermédiaire de type carbocation à la fin de la chaîne isoprényle, qui réagit en position méta (C3) du 4-HB pour former une liaison C-C (Fig. 14A).

Bien que la prénylation du 4-HB soit régiospécifique, UbiA reconnaît avec une certaine promiscuité des IPPs de différentes longueurs de chaîne pour générer l'ubiquinone UQ₆₋₁₀ chez différentes espèces (Suzuki, Ueda et al. 1994). UbiA est une protéine transmembranaire qui contient deux motifs conservés riches en aspartate, qui sont importants pour la reconnaissance du substrat IPP, et un atome de magnésium (Mg²⁺) qui est important pour la catalyse (Melzer and Heide 1994).

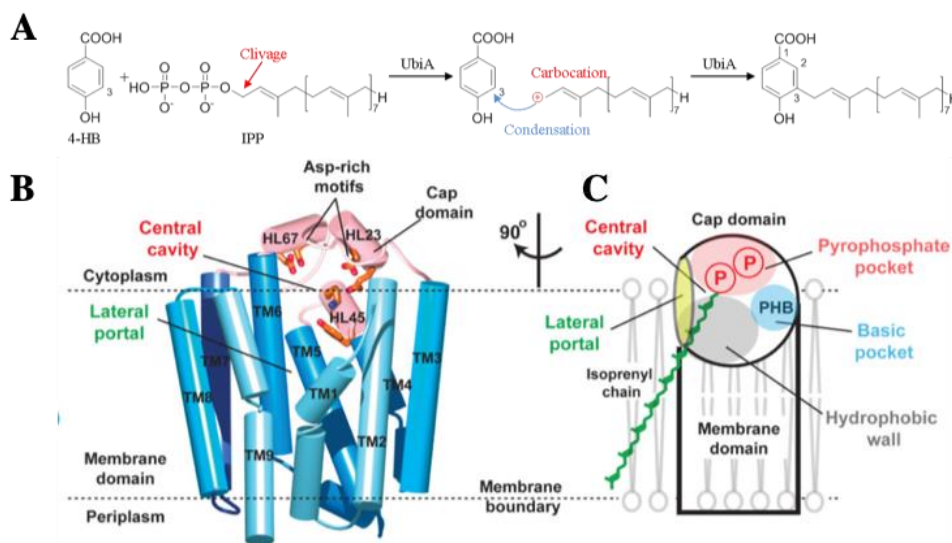


Figure 14. Schéma de la catalyse d'UbiA et structure cristallographique d'UbiA de l'archéobactérie *Aeropyrum pernix*. (A) Mécanisme réactionnel proposé pour UbiA. (B) Vue de profil d'UbiA d'*Aeropyrum pernix* (code PDB 4OD4) : Domaine transmembranaire en bleu, « chapeau » en rose. (C) Vue schématique de la protéine. Présence d'une grande cavité centrale munie d'une unique ouverture sur la membrane. La poche polaire de liaison du pyrophosphate est représentée en rose, la zone de liaison à la chaîne polyisoprényle en gris et la poche de liaison au 4-HB en bleu (Cheng et Li 2014).

La structure d'UbiA de l'archéobactérie halophile *Aeropyrum pernix*, qui possède 52% de similarité de séquence avec UbiA d'*E. coli*, a été obtenue en 2014 en présence de 4-HB, d'un analogue sulfaté non clivable du géranylpyrophosphate et d'ions Mg²⁺ (code PDB 4OD5, Fig. 14B) (Cheng and Li 2014). Il a ainsi été possible d'émettre des hypothèses concernant le

fonctionnement de la protéine. Une partie de la chaîne hydrophile du polyisoprénylpyrophosphate resterait ancrée dans la membrane, tandis que l'autre partie et sa tête pyrophosphate accéderait au site actif par une ouverture latérale donnant en partie sur la bicouche lipidique. Des motifs riches en aspartates maintiendraient, via des ions Mg^{2+} , la tête pyrophosphate en place, permettant son clivage de la chaîne grasse. Le carbocation ainsi formé serait alors couplé au 4-HB, maintenu dans une poche basique (Cheng and Li 2014).

II.2.2 Modifications du noyau aromatique et deux protéines structurales

II.2.2.1 Modifications du noyau aromatique

Une fois l'acide 3-octaprényl-4-hydroxybenzoïque (OHB) formé, un complexe multiprotéique continue la biosynthèse en modifiant différentes positions du noyau aromatique afin d'aboutir à l'ubiquinone (Fig. 12 et Tableau 4).

Protéine	Rôle	Famille protéique (cofacteur)	Taille (kDa)	Structure éventuelle		
				Protéine	Identifié avec <i>E. coli</i>	Code PDB
UbiD	Décarboxylation	Décarboxylase à flavine (FMN prénylé)	55.6	UbiD (prFMN), <i>E. coli</i>	100%	5M1D (Marshall, Fisher et al. 2017)
UbiX	Biosynthèse de la FMN prénylé, cofacteur d'UbiD	Prényl-transférase à flavine (FMN)	22.4	UbiX, (FMNpr), <i>P. aeruginosa</i>	42.4%	6QLK (Marshall, Payne et al. 2019)
UbiI	Hydroxylation en C5	Mono-oxygénase à flavine (FAD)	44.2	UbiI (apo), <i>E. coli</i>	100%	4K22 (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013)
UbiG	O-méthylation en C5 et C6	SAM-méthyl-transférase (SAM)	26.6	UbiG (apo), <i>E. coli</i>	100%	4KDC (Zhu, Wu et al. 2015)
UbiH	Hydroxylation en C1	Mono-oxygénase à flavine (FAD)	42.3	Alr8543 (apo), <i>Nostoc punctiform</i>	19.8%	6E12 (Forouhar et al. Non publié)
UbiE	C-méthylation en C2	SAM-méthyl-transférase (SAM)	28	Coq5 (SAM), <i>S. cerevisiae</i>	43.2%	4OBW (Dai, Zhou et al. 2014)
UbiF	Hydroxylation en C6	Mono-oxygénase à flavine (FAD)	43	UbiF (apo), <i>E. coli</i>	100%	(Notre laboratoire C. Fyfe, M. Lombard, 2018)
UbiJ	Liaison des lipides, stabilisation du complexe multiprotéique	SCP2 (Sterol Carrier Protein 2)	22.2	UbiJ, <i>E. coli</i>	100%	6H6N (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019)
UbiK	Facteur accessoire		11.3	Brick 1, <i>homo sapiens</i>	30.7%	3P8C (Chen, Borek et al. 2010)

Tableau 4. Description des enzymes participant à la biosynthèse de l'ubiquinone, structures obtenues des protéines d'*E. coli* ou d'un homologue.

- D écarboxylation : Chez *E. coli*, la premi ère étape des modifications du noyau quinone est la d écarboxylation d'OHB en OPP (Fig.12), qui est catalys ée par le syst ème UbiD-UbiX. UbiD est une d écarboxylase d épendante de la FMN pr ényl ée (prFMN) pour son activit é enzymatique (Payne, White et al. 2015). Ce dernier est synth ésis é par UbiX à partir de FMNH₂ et de dim éthylallyl monophosphate (DMAP), produisant un FMN hautement modifi é avec des liaisons via les positions N5 et C6 avec le DMAP (prFMNH₂) (White, Payne et al. 2015) (Fig. 15). Le prFMNH₂ est ensuite transf éré au partenaire UbiD, qui catalyse à son tour la maturation oxydative en une forme active prFMNiminium, qui est nécessaire pour l'activit é enzymatique de UbiD.

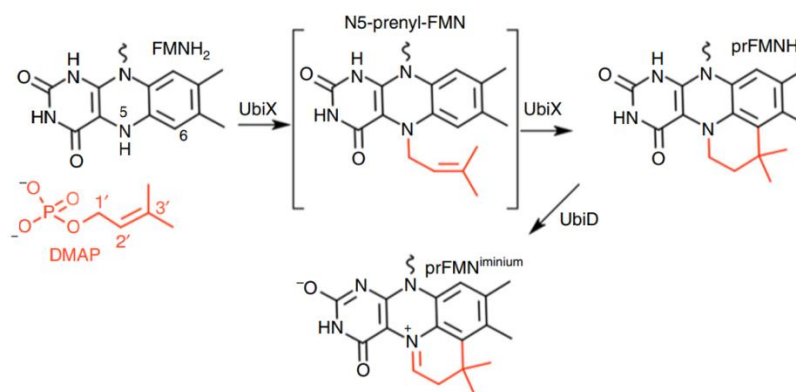


Figure 15. UbiX et UbiD agissent de concert pour produire le prFMNiminium. M écanisme propos é pour l'activit é de la pr ényltransférase à la flavine FMN par UbiX, suivi du transfert de prFMNH₂ à UbiD et maturation oxydative ult érieure en le cofacteur actif prFMNiminium. (Marshall, Payne et al. 2019)

- Hydroxylations et méthylations : Le 2-octapr énylph énéol (OPP) subit ensuite trois hydroxylations en alternance avec trois réactions de méthylation conduisant à la formation d'ubiquinol de l'ubiquinone.

Trois réactions de méthylation, dont deux sur un groupement hydroxyle et une sur un groupement méthyle ont lieu dans la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli*. Ces réactions sont :

Méthylation en O5 : 3-octapr ényl-5-hydroxyphénol → 3-octapr ényl-5- méthoxyphénol (r éaction e, Fig. 12)

Méthylation en C2 : 3-octapr ényl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol → 3- octapr ényl-2-méthyl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (r éaction g, Fig. 12)

Méthylation en O6 : 3-octapr ényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxy-1,4-benzoquinol → ubiquinol (ubiquinone) (r éaction i, Fig. 12)

Les réactions d'O-m éthylation sont catalys ées par UbiG et celle de C-m éthylation est catalys ée par UbiE (Lee, Hsu et al. 1997, Poon, Barkovich et al. 1999). Ces deux derni ères

sont toutes les deux des méthyltransférases utilisant la S-adenosylméthionine (SAM) comme source de méthyle.

Les trois réactions d'hydroxylation en C5, C1 et C6 sont catalysées par UbiI, UbiH et UbiF, respectivement (Alexander and Young 1978, Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013). Ces réactions sont :

Hydroxylation en C5 : 3-octaprénylphénol \rightarrow 3-octaprényl-5-hydroxyphénol (réaction d, Fig. 12)

Hydroxylation en C1 : 3-octaprényl-5-méthoxyphénol \rightarrow 3-octaprényl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (réaction f, Fig. 12)

Hydroxylation en C6 : 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-1,4-benzoquinol \rightarrow 3-octaprényl-2-méthyl-6-hydroxy-5-méthoxy-1,4-benzoquinol (réaction h, Fig. 12)

Au laboratoire, Murielle Lombard et Ludovic Pecqueur ont résolu en 2013, la structure d'une forme très légèrement tronquée et apo d'UbiI d'*E.coli*, appelé UbiI Δ 366-400 (Fig. 16) (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013)

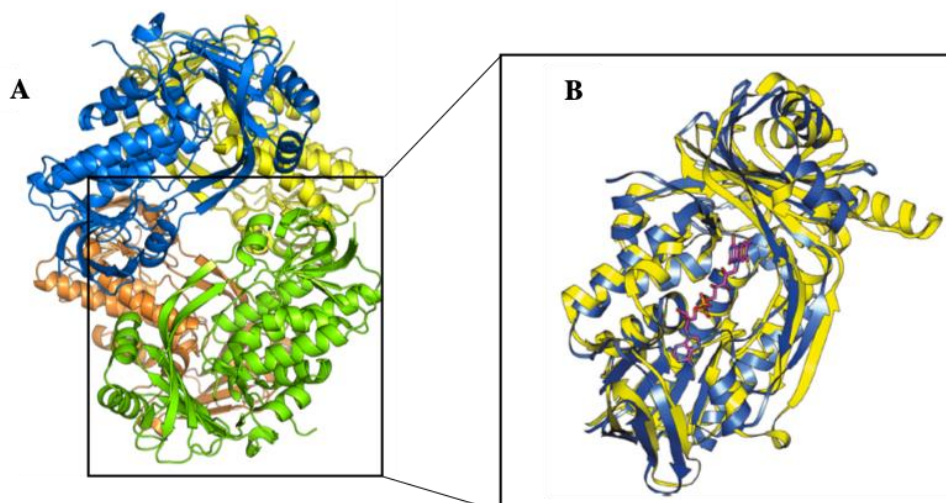


Figure 16. (A) Structure tridimensionnelle aux rayons X du tétramère d'UbiI tronquée et apo d'*E.coli* (code PDB 4K22). (B) Superposition d'un monomère d'UbiI (bleue) avec un monomère de pHBH de *P. fluorescens* (jaune), FAD en violet (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013).

Cette structure d'UbiI d'*E.coli* constitue le premier exemple de la structure d'une hydroxylase Ubi. Depuis, d'autres groupes ont réussi à cristalliser UbiI d'*Erwinia carotovora*, (code PDB 4N9X), qui est très proche structurellement d'UbiI d'*E.coli* et qui ne contient pas non plus de FAD. En 2018, Cameron Fyfe et Murielle Lombard ont purifié et cristallisé une forme tronquée et apo d'UbiF qui présente de très forte similarité avec UbiI d'*E.coli*. L'alignement de séquences d'UbiI, d'UbiF, d'UbiH et de PHHY (pHBH de *Pseudomonas aeruginosa* ; p-hydroxybenzoate hydroxylase, l'enzyme prototype des hydroxylases à flavine) révèle une identité de séquence entre ces 4 protéines (Fig. 17). Le motif DG (en rouge, Fig.

17) a été proposé pour lier les groupements pyrophosphate du FAD et du NADPH chez pHBH (Eppink, Boeren et al. 1997) alors que les résidus G298 et N300 (en rouge, Fig. 17) de pHBH sont en contact avec l'anneau isoalloxazine du FAD.

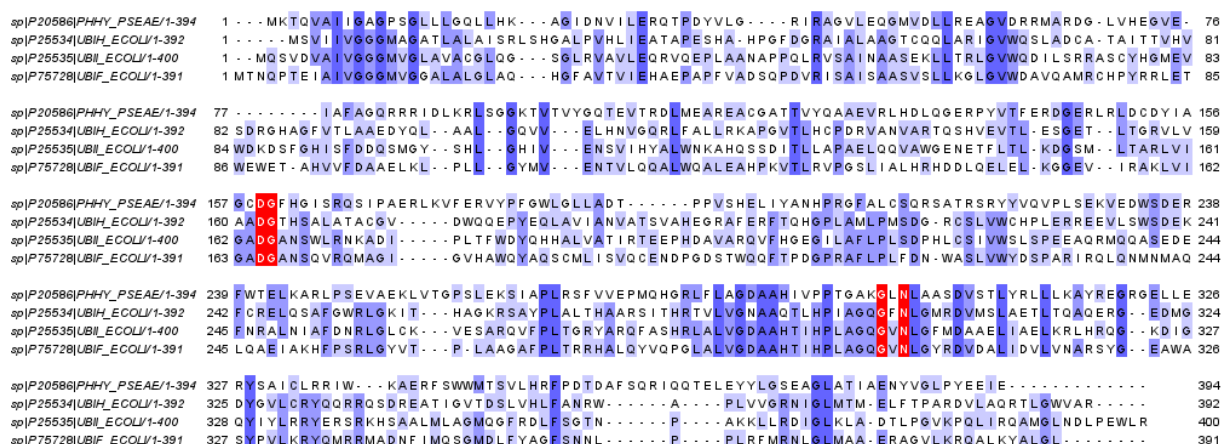


Figure 17. Alignement de séquences de différentes monoxygénases à flavine. L'alignement a été généré avec ClustalW2. Les monoxygénases sont : pHBH (PHHY) de *Pseudomonas aeruginosa*, UbiH, -I et -F d'*E. coli*. Les acides aminés strictement conservés sont représentés en bleu, ceux impliqués à la liaison avec la FAD sont en rouge.

Les trois enzymes UbiI, -F, et -H montrent une similarité de séquences avec les monoxygénases à la flavine. Elles font partie du groupe A de monoxygénases à flavine ayant comme prototype la pHBH (para-hydroxybenzoate hydroxylase) de *P. fluorescens* qui a été abondamment étudiée d'un point de vue mécanistique (Huijbers, Montersino et al. 2014). L'activité enzymatique des monoxygénases du groupe A dépend directement du FAD et du NAD(P)H comme co-substrat. Le cycle catalytique de pHBH, composée de deux parties réductrice et oxydative, a été étudié par stopped-flow couplé à l'absorption UV-visible et par fluorescence et est résumé dans la figure 18 (Husain, Schopfer et al. 1978).

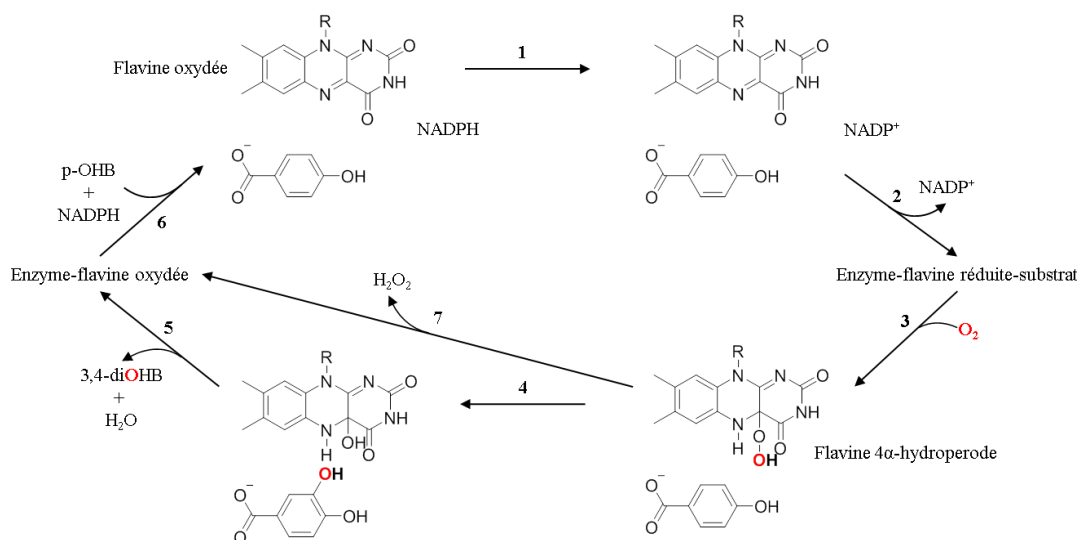


Figure 18. Mécanisme d'action des monoxygénases à flavine – groupe A. Adaptée de (Palfey and McDonald 2010).

Dans la partie réductrice du cycle catalytique, le substrat p-OHB (p-hydroxybenzoate) est accueilli dans l'enzyme et interagit avec le FAD oxydé et le NADPH pour former un complexe tertiaire (réaction 1, Fig. 18). Ce dernier accélère et contrôle la réduction du FAD par le NADPH puisque la réduction du FAD est 100 000 fois moins rapide dans le complexe binaire formé par l'enzyme et le NADPH uniquement (Entsch, Ballou et al. 1976). De plus, la présence du substrat (p-OHB) est importante afin de limiter la réaction du FAD réduit avec le dioxygène qui conduit à la formation d' H_2O_2 en absence de substrat (réaction 7, Fig. 18) (Entsch, Ballou et al. 1976). Le FAD oxydé est d'abord réduit en FADH_2 par un transfert d'hydrure provenant du NADPH, et le NADP^+ se dissocie du complexe enzyme-p-OHB (réaction 1 et 2, Fig. 18). Dans la deuxième partie oxydative, FADH_2 accepte une molécule d'oxygène sur la position $\text{C4}\alpha$ de l'anneau isoalloxazine et devient la flavine 4 α -hydroperoxyde, FAD-OOH (réaction 3, Fig. 18). Le substrat est ensuite oxydé par le groupement -OOH en produit 3,4-diOHB (3,4-dihydroxybenzoate ; réaction 4 et 5, Fig. 18).

Dans la dernière phase du cycle catalytique, une molécule d'eau est libérée du FAD et le produit final (substrat oxydé) est libéré (réaction 6, Fig. 18), aboutissant ainsi à l'enzyme oxydée FAD, point de départ d'un nouveau cycle.

II.2.2.2 Origine des atomes d'oxygènes

Basé sur le cycle catalytique de pHBH et sur l'identité de séquence entre cette dernière et UbiI, -F, et -H, il est clair que le dioxygène O_2 est le donneur de l'atome d'oxygène pour l'activité enzymatique, autrement dit les groupements hydroxyles ajoutés en C1 et C6 sont de l'origine du dioxygène. Cependant, Alexander et Young ont déterminé l'origine des groupements hydroxyles de l'ubiquinone bien avant la connaissance des séquences protéiques des hydroxylases (Alexander and Young 1978). Les auteurs ont incubé une souche sauvage d'*E. coli* dans un milieu respiratoire strictement aérobie contenant du succinate, en présence de dioxygène marqué $^{18}\text{O}_2$. L'analyse par spectrométrie de masse de l'ubiquinone biosynthétisée dans ces conditions a révélé une augmentation de la masse m/z de +6 par rapport à l'ubiquinone produite par des cellules cultivées en $^{16}\text{O}_2$, indiquant que trois atomes $^{18}\text{O}_2$ sont incorporés dans la molécule de l'ubiquinone. Afin de déterminer la localisation des atomes d'oxygène marqués dans la molécule de l'ubiquinone, les auteurs ont effectué des expériences d'échange d'atomes d'oxygène dans des conditions acides. Dans ces conditions, seul l'oxygène du groupement carbonyle est échangé mais l'oxygène du groupement méthoxyle ne l'est pas. Les résultats de cette expérience montrent que l'incorporation de $^{18}\text{O}_2$ a lieu aux positions 1, 5 et 6 (Alexander and Young 1978). L'ensemble de ces résultats

montrent que c'est l'oxygène moléculaire qui est la source des groupements hydroxyles ajoutés lors des réactions d'hydroxylation.

II.2.2.3 Deux protéines structurales : UbiJ et UbiK

Récemment, UbiJ et UbiK ont été identifiées comme deux nouveaux facteurs importants de la biosynthèse de l'ubiquinone en conditions aérobies (Aussel, Loiseau et al. 2014, Loiseau, Fyfe et al. 2017). UbiK présente 31% d'identité de séquence avec Brick1, une protéine d'assemblage du complexe Wave du cytosquelette. Des études antérieures ont montré qu'UbiK de *Salmonella typhimurium* permet l'agrégation de liposomes *in vitro*, suggérant une activité fusogénique de membrane (Carrica, Craig et al. 2011). Des études antérieures à ma thèse et menées au laboratoire ont montré qu'UbiK formait un complexe hétéroprotéique avec UbiJ, une protéine présentant des homologies de séquence avec les protéines de la famille SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) qui sont capables de lier des lipides (Fig. 19A) (Loiseau, Fyfe et al. 2017). Il a également été montré par spectrométrie de masse que le domaine SCP2 d'UbiJ est capable de lier l'acide palmitoléique et de petites quantités d'ubiquinone (Fig. 19B).

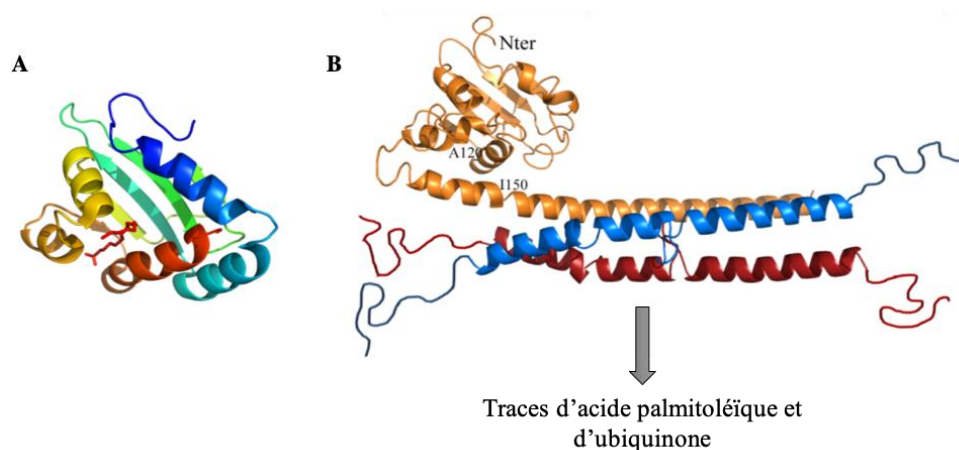


Figure 19. Modèle structural du complexe UbiJ-UbiK. (A) La structure d'une protéine de la famille SCP2 chez *Y. lipolytica* avec un tapis de feuillet β et des hélices α au-dessus, qui permettent la formation d'un tunnel hydrophobe au sein duquel on trouve un acide palmitique. (B) Notre modèle structural de l'hétérocomplexe UbiJ-UbiK. UbiJ est un monomère, présenté en orange et il contient le même tunnel hydrophobe que SCP2 d'*Y. lipolytica* et UbiK est un dimère, présenté en bleu et rouge, et principalement constitué d'hélices. Le tout forme un motif « helical triple coil » (Loiseau, Fyfe et al. 2017).

III. Biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie

III.1 Généralités

Comme évoqué dans le 1^e chapitre de l'introduction, *E. coli* et de nombreuses protéobactéries (*Providencia rettgeri*, *Rhodospirillum rubrum*, ...) possèdent deux types de quinones isoprénoides : l'ubiquinone (UQ₈) et la (d'énéthyl) ménaquinone (D)MK8 (Fig. 1). Il est admis de façon générale que l'ubiquinone est une quinone « aérobique » alors que la

(d'énéthyl)ménaquinone est une quinone « anaérobie ». En 1977, Wallace et Young ont montré le rôle de l'ubiquinone dans la chaîne de transport d'électrons en présence de nitrate chez *E. coli* (Wallace and Young 1977). Les souches utilisées dans cette étude ont produit 10-20% du niveau l'ubiquinone aérobie lorsqu'elles ont été cultivées en conditions anaérobiques avec du nitrate. Ainsi, l'ubiquinone est un composant essentiel dans les systèmes respiratoires aérobie et, de plus, dans le système anaérobie nitrate réductase. La biosynthèse de l'ubiquinone nécessite trois réactions d'hydroxylation au niveau des positions 1, 5 et 6. Ces réactions sont catalysées en aérobie par UbiI, UbiH et UbiF, respectivement (réactions d, f et h, Fig. 12) qui seront nommées « hydroxylases aérobie » dans cette thèse. Les souches $\Delta ubiI$, $\Delta ubiF$, $\Delta ubiH$ cultivées dans des conditions aérobie sont déficiente en ubiquinone alors qu'elles sont capables d'en produire à un niveau équivalent à la souche sauvage dans des conditions anaérobies (Alexander and Young 1978, Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013). Cette capacité de biosynthèse de l'ubiquinone en conditions anaérobies est caractéristique de ces mutants de monooxygénases puisque l'ubiquinone n'est pas produite dans les autres mutants de biosynthèse de l'ubiquinone (*ubiE*⁻, *ubiG*⁻ et *ubiA*⁻) dans les deux conditions aérobie et anaérobies. Ainsi, *E. coli* devrait posséder des mécanismes spéciaux pour la biosynthèse de l'ubiquinone en conditions anaérobies, autrement dit un système d'hydroxylation alternatif indépendant de ces trois protéines pour catalyser les réactions d'hydroxylation en absence d'oxygène.

Actuellement les seules enzymes connues pour catalyser des réactions d'hydroxylation en absence de dioxygène appartiennent à la famille des enzymes à cofacteur à Molybdène (MoCo) (Hille, Retey et al. 1998) (pour un exemple, voir section VI de ce chapitre). Contrairement aux monooxygénases à flavine (Fig. 17), les hydroxylases contenant du MoCo catalysent les réactions d'hydroxylation en utilisant l'oxygène contenu dans la molécule d'eau H₂O, plutôt que l'oxygène moléculaire O₂, en tant que source de l'atome d'oxygène incorporé dans le produit. Nous avons identifié récemment trois gènes *yhbT*, *yhbU* et *YhbV* (renommés *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*, respectivement) qui sont essentiels à la biosynthèse de l'ubiquinone en conditions anaérobies chez *E. coli*. La découverte de ces trois gènes ainsi que la caractérisation de ces trois protéines UbiT, UbiU et UbiV seront détaillées dans le chapitre VI.

III.2 La protéine UbiT

Les analyses phylogénétiques du gène *ubiT* ont clairement indiqué qu'il est présent dans les α -, β -, γ -protéobactéries alors qu'il n'est pas conservé chez les Gram-positifs, les archées, les champignons, les plantes et les mammifères (Groenewold, Massmig et al. 2018). Chez *E.*

coli, le gène *ubiT* code pour la protéine UbiT de 174 acides aminés, soit 19.7 kDa. La partie centrale (acides aminés 45-133) de la protéine correspond à un domaine SCP2 (Sterol Carrier Protein 2). Les domaines SCP2 forment généralement une cavité hydrophobe qui lie divers lipides, tels que l'acide palmitique, le cholestérol, les acyl-CoA, et certains phospholipides (Burgardt, Gianotti et al. 2017) (voir chapitre III pour plus de détails).

UbiT est actuellement très peu étudié dans la littérature. En 2011, Ogasawara et ses collègues ont proposé que le gène *ubiT* avait un lien avec la formation de biofilm chez *E. coli* et qu'elle était négativement contrôlée par le facteur de transcription CsgD (Ogasawara, Yamamoto et al. 2011). En effet, lorsque les bactéries changent leur mode de vie dite « planctonique » (culture libre) en mode « biofilm », la formation des flagelles (impliqués dans la motilité des cellules) est désactivée et la production des fibres amyloïdes de type curli et de polysaccharides extracellulaires pour l'adhérence cellule-cellule est activée (Barnhart and Chapman 2006). Ces deux procédures sont contrôlées par CsgD, le régulateur principal de la formation de biofilm (Fig. 20).

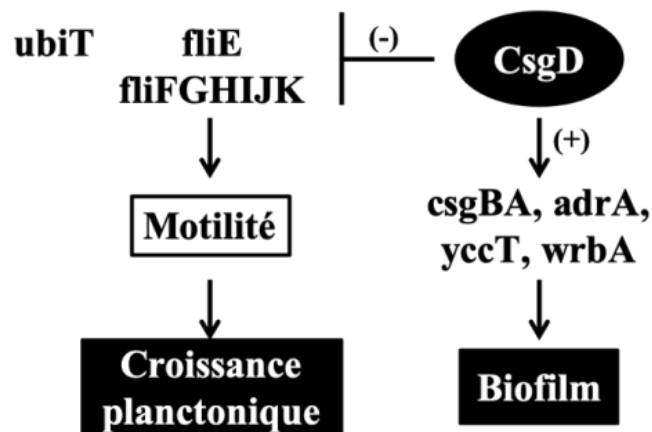


Figure 20. La régulation de CsgD dans la formation de biofilms et la motilité des cellules. CsgD régulerait négativement les gènes *ubiT*, *fliE* et *fliFGHIJK* ; les gènes *fli* sont impliqués dans la formation des flagelles et la motilité et cela change ainsi le mode de vie des bactéries en mode « biofilm » (Adapté de Ogasawara, Yamamoto et al. 2011).

Dans ce modèle d'action, CsgD est un répresseur des gènes *ubiT*, *fliE* et *fliEFGH* ; les gènes *fli* sont impliqués dans la formation des flagelles dans le mode planctonique. Bien que les auteurs n'aient pas clarifié le rôle physiologique de la régulation du gène *ubiT* par CsgD, ces résultats nous laissent à penser qu'UbiT est impliquée dans la croissance bactérienne en anaérobiose, car l'oxygène est présent à très faible quantité dans les biofilms.

UbiT est démontré, en 2011 par Arends et ses collègues, comme un nouveau substrat de FtsH (Arends, Thomanek et al. 2016). La protéine FtsH appartient à la famille des protéases AAA+ (ATPases Associées à diverses Activités cellulaires - ATPases Associated with diverse cellular Activities). Selon ces travaux, UbiT est une protéine cytosolique (Fig. 21A) dont le

niveau d'expression est très instable dans les souches sauvages : elle est rapidement dégradée tout au long de la phase de croissance bactérienne (Fig. 21B et 21C) ; au contraire, son niveau d'expression reste constant dans la souche \DeltaftsH (Fig. 21C).

Parmi les protéases de la famille des protéases AAA+ que possèdent *E. coli* (Lon, ClpAP, ClpXP, HslUV), FtsH est la seule protéase ancrée à la membrane en raison de son emplacement unique dans la membrane interne (Tomoyasu, Yamanaka et al. 1993). Outre les protéines membranaires, FtsH est capable de dégrader les protéines cytosoliques. Plus important encore, FtsH dégrade LpxC, une enzyme clé de la biosynthèse des lipopolysaccharide (LPS), principal élément constitutif de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Ogura, Inoue et al. 1999). Dans les cellules, la quantité de LPS doit être strictement contrôlée et équilibrée en phospholipides. La régulation d'UbiT par FtsH nous laisse penser à une relation entre l'homéostasie des LPS et des phospholipides, qui serait dépendante de FtsH, et de la capacité d'UbiT de lier des lipides. De plus, FtsH est également impliqué dans l'adaptation aux conditions anaérobies et au stress superoxyde en dégradant FdoH et SoxS, respectivement (Westphal, Langklotz et al. 2012). Tous ces résultats semblent cohérents avec le fait qu'UbiT possède un domaine de liaison aux lipides et qu'elle serait impliquée dans la croissance bactérienne en anaérobie.

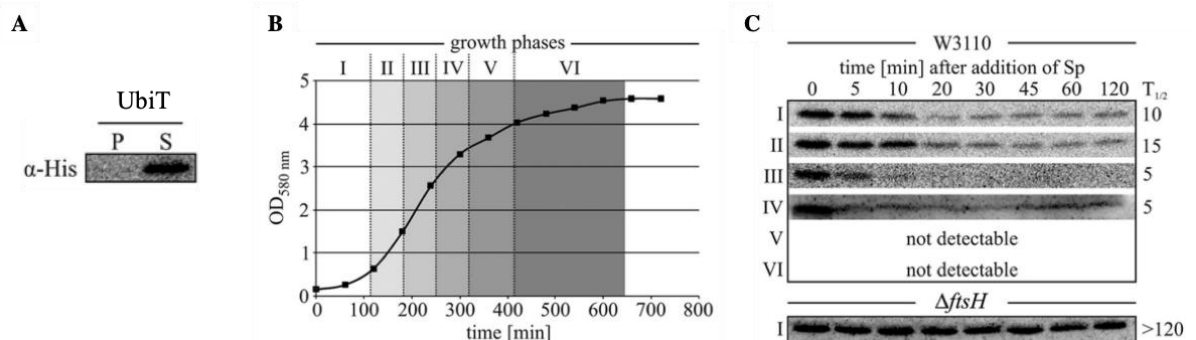


Figure 21. Dégradation d'UbiT de manière dépendante de FtsH in vivo. (A) Les cellules *E. coli* sont transformées par le plasmide codant pour His₆-UbiT. Le niveau d'expression d'UbiT a été détecté par Western blot essentiellement dans le cytosol (S) et très peu dans le culot (P). (B) Pour étudier la demi-vie de His₆-YhbT, la stabilité a été analysée dans différentes phases de croissance d'*E. coli*. (C) Pour déterminer la stabilité dépendante de la phase de croissance, des sous-cultures ont été prélevées à la phase de latence (I), exponentielle (II et III), de ralentissement (IV et V) et stationnaire (VI). Après l'induction de l'expression de la protéine, la traduction a été bloquée par addition de spectinomycine et des échantillons ont été prélevés aux moments indiqués. Les demi-vies d'UbiT ont été déterminées par SDS-PAGE, Western blot et immunodétection. (Arends, Thomanek et al. 2016).

Chez *P. aeruginosa*, le niveau d'expression d'UbiT augmente 8.4 fois lorsque les cellules sont cultivées dans les conditions anaérobies (Groenewold, Massmig et al. 2018). Ce résultat est en cohérence avec des travaux précédant qui ont montrés que le gène *ubiT* était régulé positivement dans les conditions à faible concentration en oxygène et en anaérobie

(Wu, Guina et al. 2005, Filiatrault, Picardo et al. 2006, Alvarez-Ortega and Harwood 2007). De plus, une souche mutante d'*ubiT* a montré une sensibilité importante aux antimicrobiens (minocycline, nafcilline, oxacilline, chloramphénicol, thiamphénicol), une amélioration de la motilité cellulaire et une réduction de la capacité de formation de biofilm (Groenewold, Massmig et al. 2018), ce qui est cohérent avec la virulence et la régulation négative de CsgD dans le changement entre biofilms et mode planctonique des bactéries. UbiT de *P. aeruginosa* est, encore une fois, cytosolique et fait très intéressant, elle est capable de lier spécifiquement à l'acide phosphatidique (AP) *in vitro* via certains résidus hydrophobes conservés (Leucine et Valine) (Groenewold, Massmig et al. 2018). L'AP est un précurseur clé de la synthèse des glycérophospholipides polaires qui sont les briques de la membrane plasmique bactérienne (par exemple, phosphatidylglycérol (PG), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), diphosphatidylglycérol (DPG, également appelé cardiolipine), phosphatidylcholine (PC)). De plus, l'homéostasie lipidique chez la souche mutante est déséquilibrée au niveau du lysophosphatidylcholine, de la phosphatidylcholine et du diacylglycérol dans les deux conditions aérobie et anaérobie (Groenewold, Massmig et al. 2018). Tous ces résultats, encore une fois, mettent en évidence le rôle d'UbiT, avec sa capacité de lier aux lipides, dans l'homéostasie lipidiques des cellules en aérobie et anaérobie.

III.3 Les deux protéines UbiU et UbiV

Chez *E. coli*, les gènes *ubiU* et *ubiV* forment un opéron codant pour deux protéines de 330 et 300 acides aminés, respectivement, soit 37 kDa et 32.5 kDa. UbiU et UbiV contiennent dans leur séquence peptidique un motif appelé U32, qui appartient, selon la base de données MEROPS, à une famille de protéases dont le mécanisme catalytique est inconnu. La fonction protéase de cette famille protéique reste discutable et sera présentée en détail dans la section IV.

Les protéines UbiU et UbiV sont à ce jour très peu étudiées. En 2006, Filiatrault et ses collègues ont montré que les deux gènes *ubiU* et *ubiV* étaient impliqués dans la croissance de *P. aeruginosae* dans les conditions anaérobies, car les mutants de ces gènes ne sont pas capables de croître en anaérobie en milieu liquide et en présence des substrats nécessaires pour la croissance anaérobie (KNO_3 , KNO_2) (Filiatrault, Picardo et al. 2006). *P. aeruginosae* est une pathogène opportuniste à Gram-négatif qui réside dans les biofilms chez l'hôte infecté, où la concentration en oxygène est très faible, voire nulle. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de Groenewold et ses collègues, qui ont montré que l'expression d'UbiU et UbiV augmentaient 8.7 et 9.3 fois dans les biofilms de *P. aeruginosae* (Groenewold, Massmig et al. 2018) ; mais aussi avec ceux de Navais et ses collègues, qui ont également

montré que l'expression des gènes *ubiU* et *ubiV* d'*Yersinia ruckeri* était régulés positivement dans les conditions microaérobiques (Navais, Mendez et al. 2014). *Y. ruckeri*, une bactérie à Gram négatif, est responsable de la maladie entérique de la bouche rouge, qui est répandue dans le monde entier et qui affecte principalement les salmonidés. Cette étude a mis en évidence la participation de deux gènes *ubiU* et *ubiV* dans le processus d'infection d'*Y. Rucker*, car un mutant a atténué sa virulence. De plus, le gène *ubiU* a été montré comme un facteur de virulence chez *Proteus mirabilis* - une entérobactérie à Gram négatif qui est l'une des principales causes d'infections des voies urinaires chez les patients présentant des anomalies fonctionnelles ou anatomiques des voies urinaires ou ceux ayant un cathéter urinaire en place (Zhao, Li et al. 1999).

IV. Famille des protéases U32 et les autres membres de la famille U32

IV.1 Généralité

La famille U32 est une collection d'environ 2700 peptidases annotées de la base de données MEROPS avec un mécanisme catalytique inconnu. La base de données MEROPS utilise une classification hiérarchique, basé sur la structure des peptidases. Celles-ci sont généralement classées en fonction de leur mécanisme catalytique et de leurs résidus clés comme les peptidases à sérine (S), cystéine (C), aspartique (A), métallo- (M) et nucléophile / thréonine (T), ainsi que quelques autres. Parmi plus de 490 000 entrées dans la base de données MEROPS (Rawlings, Barrett et al. 2012), plus de 478 000 appartiennent à ces cinq classes. Pour plus de 7 000 entrées, le mécanisme catalytique n'est pas connu et ces protéines sont appelées « U », dont la famille U32. Les protéines de la famille U32 sont d'origine essentiellement bactérienne et archéenne, même si quelques membres sont présents chez les eucaryotes, tels que les protozoaires, les plantes et les animaux, et deux homologues de peptidase U32 se trouvent même dans les bactériophages. Elles contiennent toutes le domaine dit peptidase U32 qui peut être attribué à diverses sous-familles U32 et fréquemment à d'autres domaines de fonction inconnue.

PrtC de *Porphyromonas gingivalis* est le prototype de peptidase U32 dont l'activité protéolytique du collagène de type I et de l'azocoll a été rapportée (Kato, Takahashi et al. 1992). Une activité protéolytique d'HP0169 chez *Helicobacter pylori* vis-à-vis du collagène et une fonction essentielle de la colonisation gastrique ont été également rapportées (Kavermann, Burns et al. 2003). De plus, une activité spécifique du collagène I a été rapportée pour la protéine A0A098L2Q3 de *Geobacillus thermoleovorans* (Jasilionis, Kaupinis et al. 2012). Dans les deux premiers cas, il a été rapporté que les activités protéolytiques des deux protéines étaient sensibles au traitement à l'EDTA, conduisant ainsi à

la conclusion d'une activité de type métalloprotéase, tandis que dans le dernier cas, les ions Zn^{2+} augmentaient la thermostabilité. Cependant, aucune des motifs qui sont typiques des métalloprotéases, comme par exemple le motif de liaison du zinc H-E-X-X-H (Fukasawa, Hata et al. 2011), ou des motifs de séquence de liaison au collagène ne sont présents dans les peptidases U32. D'autre part, les identifiants MEROPS U32.001 à U32.003 partagent au moins un motif de séquence ExF-X₂-G-(SA)-(LIVM)-C-X₄-GXCX-(LIVM)-S qui indique ces sous-familles. Cependant, la fonction de ces acides aminés n'a pas été étudiée.

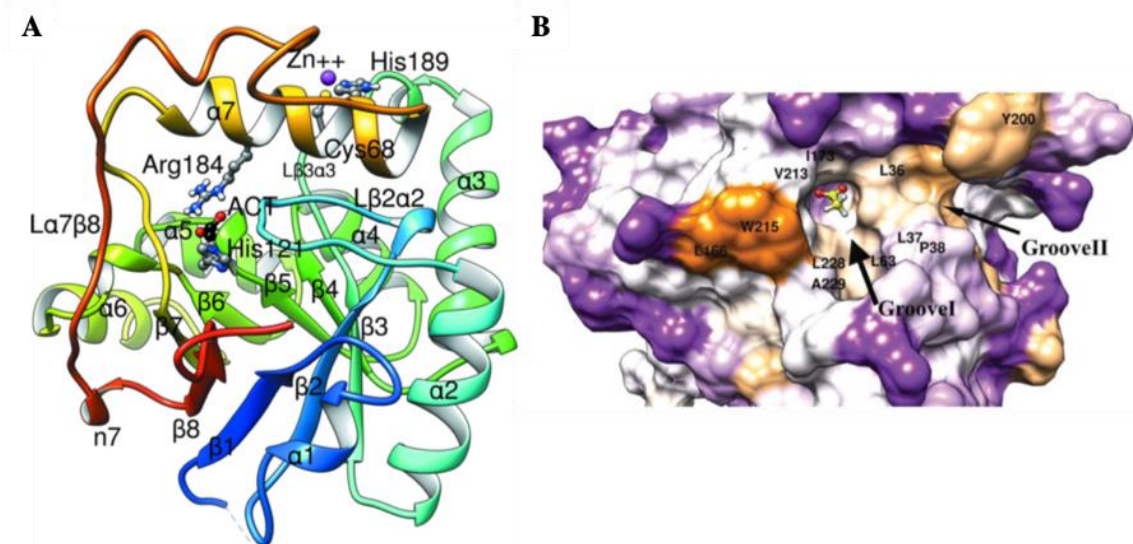


Figure 22. Structure d'un monomère de Mk0906 de *Methanopyrus kandleri*. (A) La structure représentée en couleur arc-en-ciel avec l'extrémité N-terminale en bleu et l'extrémité C-terminale en rouge. Les structures secondaires sont indiquées. L'ion acétate (ACT) et deux de ses résidus en interaction (Arg184 et His121) sont représentés sous forme de billes et de bâtons. L'ion Zn^{2+} (magenta) qui est important pour la structure dimérique quaternaire est représenté avec ses ligands Cys68 et His189. (B) Le site de liaison avec l'ion acétate (atomes de carbone jaunes) est montré. La surface est colorée en fonction de la polarité en appliquant l'échelle d'hydrophobie allant des valeurs les plus négatives (résidus polaires, représentées en violet) à 0 (blanc) aux valeurs les plus positives (résidus apolaires, orange) (Schacherl, Montada et al. 2015).

La première structure d'un domaine catalytique U32 de *Methanopyrus kandleri* (gène *mk0906*) révèle un tonneau TIM ($\beta\alpha$)₈ consistant typiquement en l'alternance de huit hélices α et huit feuillets β (Fig. 22A, code PDB 5D88) (Schacherl, Montada et al. 2015). La protéine présente une structure dimérique quaternaire dans laquelle un ion zinc est lié de manière symétrique par les chaînes latérales d'histidine et de cystéine des deux monomères (Fig. 22A). Ces résidus se situent dans des motifs de séquence conservés. Cependant, aucun motif protéolytique typique n'est visible dans la structure tridimensionnelle, ni des motifs pouvant servir à l'activation de l'eau. Bien que les enzymes de tonneau TIM soient très variées et catalysent de nombreuses réactions diverses, y compris l'hydrolyse, elles n'ont jamais été impliquées en tant qu'enzymes protéolytiques et une catalyse d'hydrolyse de liaison amide n'a pas encore été rapportée. De plus Mk0906 est très éloigné de PrtC de *P. ginigivalis* (avec

une identité de séquence inférieure à 20%) et les analyses biochimiques n'ont démontré aucune activité protéolytique de Mk0906 (Schacherl, Montada et al. 2015).

Ces résultats indiquent donc une hérogénéité parmi les membres de cette famille de protéases U32 et nous pensons, au vu des résultats que nous allons présenter dans ce manuscrit de thèse, que l'annotation d'au moins UbiU et UbiV en tant que peptidases devrait éventuellement être réévaluée. Fait très intéressant, la structure de Mk0906 de *Methanopyrus kandleri* révèle un site de liaison putatif pour une molécule amphiphile avec un groupe carboxylate ou un fragment chargé négativement de manière similaire à une extrémité et une queue principalement hydrophobe. Ce site de liaison se compose de deux rainures délimitées par des acides aminés hydrophobes (Fig. 22B).

PrtC est évolutivement lié à un certain nombre de protéines non caractérisées avec une région bien conservée contenant des cystéines comme UbiU (YhbU), UbiV (YhbV), RlhA (YdcP) et TrhP (YegQ). De nombreux membres de la famille U32 sont impliqués dans la pathogénicité, tels que le gène *rlhA* (*ydcP*) qui est impliqué dans la virulence d'*Aeromonas veronii* (Han, Taki et al. 2008) ; le gène *trhP* (*yegQ*) qui est responsable de la résistance aux antibiotiques dans une souche de *Providencia stuartii* (McGann, Hang et al. 2012) ou la virulence de *Salmonella enterica* (Wu, Carlson et al. 2002, Xiong, Brewer et al. 2011) (une partie de la pathogénicité d'*ubiU* et d'*ubiV* a été représentée dans la section précédente).

IV.2 Deux autres protéines de la famille U32 : RlhA (YdcP) et TrhP (YegQ)

Chez *E. coli*, RlhA est responsable de l'hydroxylation de la cytidine de position 2501 (ho^5C2501) (Fig. 23A) (Kimura, Sakai et al. 2017); à ce jour, la fonction de cette modification reste inconnue. RlhA se lie physiquement aux précurseurs de la sous-unité ribosomique 50S, où la cystéine C2501 de l'ARNr 23S est hydroxylée, d'où vient le nom RlhA (large subunit ribosomal RNA hydroxylation A en anglais). L'activité enzymatique de RlhA dépend de la présence des résidus conservés comme le glutamate E161 et de quatre cystéines conservées C169, C176, C580 et C611 (Fig. 23B), suggérant que RlhA serait une protéine Fe-S. En accord avec cela, il a été montré que la perturbation de la biogenèse des centres Fe-S impactait la formation de ho^5C2501 . En effet, dans les souches KO du système de la biosynthèse des centres Fe-S appelé ISC (Iron-Sulphur Cluster), une réduction importante de la formation de ho^5C2501 a été observée. De plus, RlhA est sensible à la concentration intracellulaire en Fe, car un épuisement de Fe diminue la formation de ho^5C2501 .

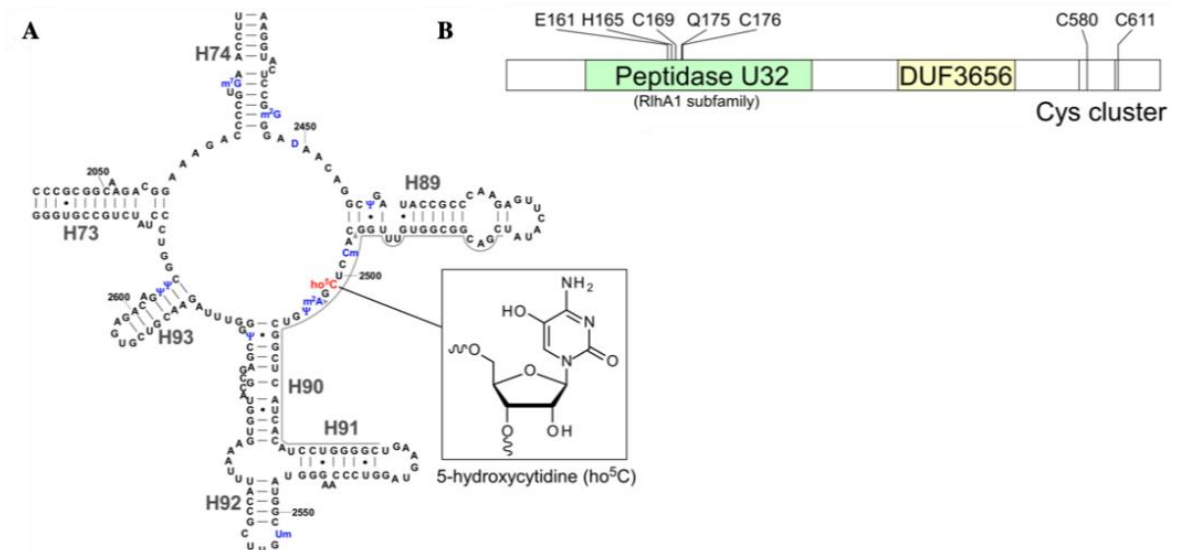


Figure 23. (A) Structure secondaire du domaine V de l'ARNr 23S d'*E. coli* avec les modifications post-transcriptionnelles. L'encadré montre la structure chimique de la 5-hydroxycytidine (ho⁵C). (B) Vue schématique des motifs protéiques de RlhA (Kimura, Sakai et al. 2017).

Dans les ARNt bactériens, la 5-carboxyméthoxyuridine (cmo⁵U) et ses dérivés à la première position de l'anticodon facilitent l'appariement des bases non Watson-Crick avec la guanosine et les pyrimidines aux troisième positions des codons, augmentant ainsi les capacités de décodage (Sakai, Kimura et al. 2019). La modification de l'uridine de position 34 (U34) en cmo⁵U34 se compose en deux étapes : (1) hydroxylation de l'U34 en 5-hydroxyuridine (ho⁵U34) et (2) carboxyméthoxylation de la 5-hydroxyuridine (ho⁵U34) et 5-carboxyméthoxyuridine (cmo⁵U) (Fig. 24A). Chez *E. coli*, TrhP (tRNA hydroxylation P en anglais) est impliqué dans la première étape, autrement dit, TrhP est responsable de l'hydroxylation d'U34 en ho⁵U34. Les résidus conservés tels que le glutamate E162, l'histidine H166 et quatre cystéines C170, C177, C193 et C197 sont importants pour l'activité enzymatique de TrhP (Fig. 24B). Bien que les auteurs n'aient pas mentionné le rôle des centres Fe-S sur l'activité de TrhP (comme le cas de RlhA), le motif de quatre cystéines conservées nous laisse penser à l'implication des centres Fe-S à la formation de ho⁵U34. Les souches d'*E. coli* dépourvues des gènes impliqués dans la formation de ho⁵U34 présentent un phénotype sensible à la température et décodent les codons se terminant par un G (GCG et UCG) moins efficacement que la souche de type sauvage. Ces découvertes confirment que l'hydroxylation de l'ARNt assure un décodage efficace lors de la synthèse des protéines.

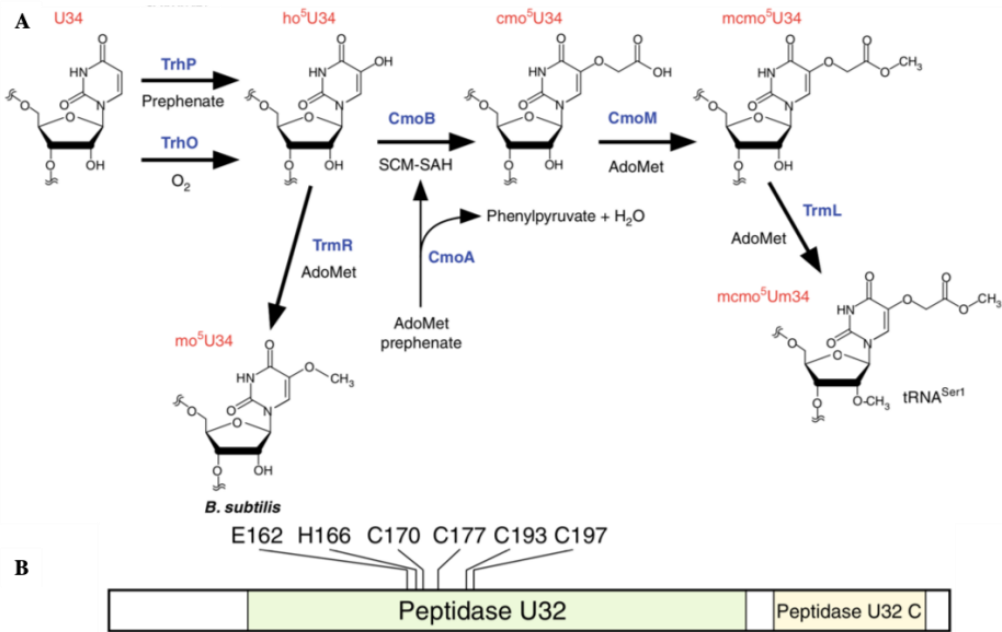


Figure 24. (A) Biogenèse de $mcmo^5U34$ et de ses dérivés. (B) Organisation des domaines de TrpP d'*E. coli*, qui contient les domaines Peptidase_U32 (PF01136) et Peptidase_U32_C (PF16325) (Sakai, Kimura et al. 2019).

Dans les deux cas, les réactions d'hydroxylation catalysées par RlhA et TrhP semblent dépendre du préphénate. Ce dernier est un produit en amont du chorismate, qui est lui-même un produit final de la voie du shikimate et un précurseur commun des acides aminés aromatiques et des vitamines chez des bactéries et des plantes (Kanehisa, Goto et al. 2014) (Fig. 25). Le préphénate est ensuite converti en métabolites en aval via trois voies (Fig. 25).

De plus, il existe une voie alternative de l'hydroxylation d'U34 en ho^5U34 dépendante de l'oxygène catalysée par TrhO (tRNA hydroxylation O en anglais) (Fig. 24A). L'existence de deux voies dépendante et indépendante de l'oxygène de la formation de ho^5U34 ressemble au cas de la biosynthèse de l'ubiquinone où deux voies existent également.

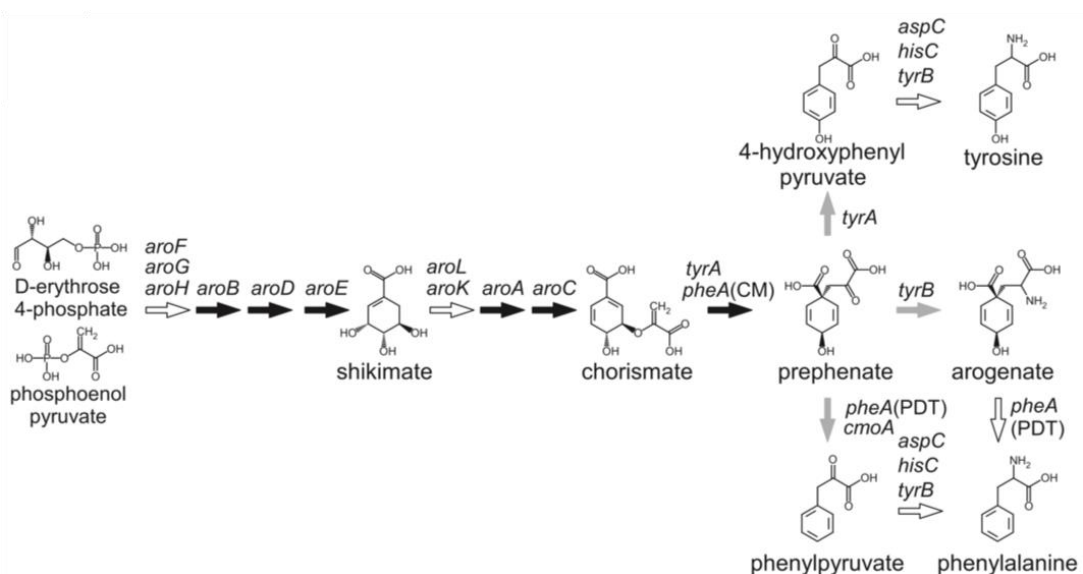


Figure 25. La voie du shikimate et les métabolites associés. (Kimura, Sakai et al. 2017).

Une partie de la caractérisation biochimique de ces deux enzymes, RlhA et TrhP, sera présentée dans le chapitre VI. Même si elles ne sont pas impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone, je me suis intéressé à ces deux protéines car elles présentaient des similitudes avec les protéines UbiU et UbiV.

V. Protéines à centre Fe-S : Structures et fonctions

V.1 Structures

Les centres Fe-S sont des groupements prosthétiques présents dans de très nombreuses protéines chez la plupart des organismes vivants (Beinert, Holm et al. 1997). Plus de 130 types de protéines à centre Fe-S sont présents chez *E. coli* (Py and Barras 2014). Les centres Fe-S résultent de l'assemblage d'atomes de fer dans différents états d'oxydation (fer ferreux Fe^{2+} ou fer ferrique Fe^{3+}) et d'ions sulfures dits soufres inorganiques, en stœchiométrie variable. Les centres Fe-S sont associés à une protéine via des liaisons non covalentes entre les atomes de fer et les chaînes latérales de résidus d'acides aminés, le plus souvent des résidus cystéines, mais d'autres résidus (comme aspartate, histidine, et même arginine) peuvent également servir de ligands (Gurbiel, Ohnishi et al. 1991, Brereton, Duderstadt et al. 1999, Berkovitch, Nicolet et al. 2004). Différents types de centres Fe-S ont été observés au sein des protéines (Beinert 2000) ; les plus communément rencontrés sont présentés ci-après (Tableau 5).

Les centres [1Fe-0S]

Ce type de centre est le plus simple et il est constitué d'un seul atome de fer [1Fe-0S] central coordonné par quatre atomes de soufre organique de la chaîne latérale de cystéines de la protéine. Ces centres existent dans deux états d'oxydation, suivant que l'atome de fer est ferrique (état oxydé) ou ferreux (état réduit).

Les centres [2Fe-2S]

Ce type de centre, le plus simple des systèmes polymétalliques, est constitué de deux atomes de fer reliés par deux atomes de soufre inorganique et coordonnés à deux ligands appartenant à la protéine, le plus souvent des groupements thiols de Cystéine. Quelle que soit la nature des ligands, ces centres existent dans deux états redox. A l'état oxydé $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$, les deux atomes de fer sont sous forme ferrique (Fe^{3+}), tant dit qu'à l'état réduit $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$, la charge est localisée sur un des deux atomes de fer : l'un est sous forme ferrique (Fe^{3+}) et l'autre est sous forme ferreuse (Fe^{2+}).

Les centres [3Fe-4S]

Ce type de centre est constitué de trois atomes de fer reliés deux par deux par trois atomes de soufre, le quatrième atome de soufre reliant les trois atomes de fer. Les états

d'oxydation varie de $[3\text{Fe-4S}]^+$ (tous les cations sous forme ferrique Fe^{3+}) à $[3\text{Fe-4S}]^{2-}$ (tous les cations à l'état Fe^{2+}). Certaines protéines Fe-S peuvent acquérir un ion ferreux pour convertir leur cluster $[3\text{Fe-4S}]$ inactif en cluster $[4\text{Fe-4S}]$: c'est notamment le cas de l'aconitase, inactive lorsque son cluster n'a que trois cations de fer, et activée lorsqu'il acquiert le quatrième. Cette facilité d'interconversion est notamment mise à contribution dans des processus de régulation de gènes où chaque forme présente des propriétés différentes.

Les centres [4Fe-4S]

Le cluster $[4\text{Fe-S}_4]$ à géométrie de type cubane est la structure fer-soufre la plus courante. Chacun des quatre cations de fer est coordonné à trois atomes de soufre labile et un groupement thiolate de cystéine appartenant à la protéine. Ces centres existent sous trois états d'oxydation, constituant alors les deux couples rédox : $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ et $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$. Toutefois, la plupart des protéines $[4\text{Fe-4S}]$ sont isolées dans l'état $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

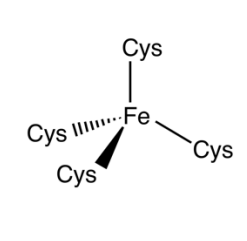
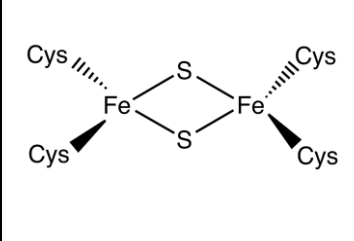
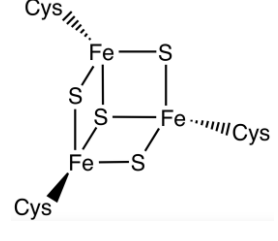
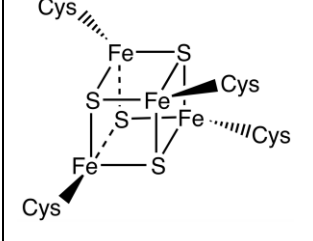
[1Fe-0S]	[2Fe-2S]	[3Fe-4S]	[4Fe-4S]
			
Etats rédox			
Fe^{2+} Fe^{3+}	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [2\text{Fe-2S}]^{2+}$ $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [2\text{Fe-2S}]^{1+}$	$3\text{Fe}^{3+} \rightarrow [3\text{Fe-4S}]^+$ $2\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [3\text{Fe-2S}]^0$	$3\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [4\text{Fe-4S}]^{3+}$ $2\text{Fe}^{3+}/2\text{Fe}^{2+} \rightarrow [4\text{Fe-4S}]^{2+}$ $\text{Fe}^{3+}/3\text{Fe}^{2+} \rightarrow [4\text{Fe-4S}]^{1+}$
Potentils rédox			
+20 à -100 mV	-100 à +400 mV	-60 à -460 mV	-100 à -700 mV

Tableau 5. Les différents centres Fe-S et leurs propriétés. *Par rapport à l'ENH, à pH 7

V.2 Fonctions

Les centres Fe-S peuvent avoir des fonctions très diverses. Ils sont très souvent impliqués dans des transferts d'électrons. Ce fut d'ailleurs la première fonction démontrée pour les centres Fe-S. Cependant, la découverte et l'étude de nombreuses protéines Fe-S ont permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions biologiques, telles que la fonction enzymatique ou encore la régulation de l'expression des gènes (Beinert, Holm et al. 1997).

Le transfert d'électrons

Le rôle le plus connu des centres Fe-S est le transfert d'électron. Cette fonction est à l'origine de la délocalisation de la densité électronique sur des atomes de fer et de soufres, autrement dit, la capacité des atomes de fer à passer d'un état réduit (Fe^{2+}) à un état oxydé (Fe^{3+}) et inversement. Ainsi, les centres Fe-S peuvent facilement accepter des électrons et/ou

les donner à d'autres entités. Les électrons peuvent circuler soit au sein d'une même protéine (on parle de transfert intramoléculaire) soit entre deux ou plusieurs partenaires protéiques (on parle donc de transfert intermoléculaire, celui-ci pouvant s'effectuer sur une longue distance).

Les réactions de transferts d'électrons sont essentielles dans de nombreux processus biologiques incluant par exemple la photosynthèse ou la respiration (Johnson, Dean et al. 2005). En effet, les centres [Fe-S] sont des composants majeurs des chaînes de transport d'électrons photosynthétique et respiratoire. Ils facilitent des voies de transfert d'électrons dans de nombreuses enzymes redox solubles liées à la membrane et constituent les centres d'oxydo-activités des protéines, par exemple la ferrédoxine.

La catalyse enzymatique

L'exemple classique pour ce type de fonction est celui de l'aconitase du cycle de Krebs (Switzer 1989). Cette enzyme catalyse l'isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate via le *cis*-aconitate (Fig. 26A). La réaction d'isomérisation implique une déshydratation suivie d'une réhydratation via son centre [4Fe-4S] dans lequel un des quatre atomes de fer du centre intervient en tant d'acide de Lewis : il possède un site de coordination vacant, l'une de ses orbitales pouvant accepter un doublet électronique ; ainsi ; il peut lier le substrat de la réaction, stabiliser l'état intermédiaire formé ainsi catalyser la réaction d'isomérisation (Fig. 26B).

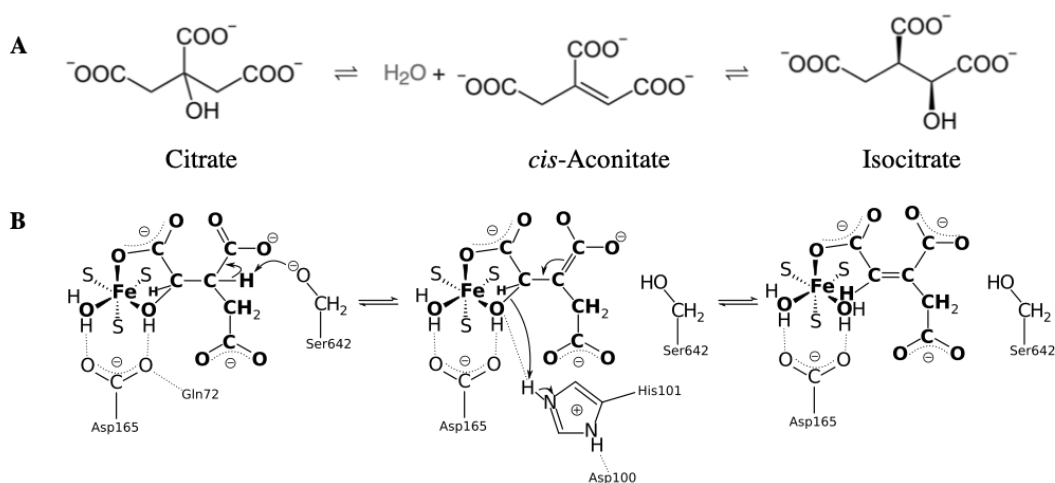


Figure 26. (A) La réaction d'isomérisation du citrate en isocitrate catalysée par le centre [4Fe-4S] de l'aconitase. (B) Mécanisme réactionnel de l'aconitase illustrant la formation et la propagation de la double liaison.

La catalyse redox

Les centres impliqués dans ce type de réaction sont représentés principalement par les protéines de la super-famille des radical-SAM (S-AdénosylMéthionine). Dans ce cas, le centre [4Fe-4S] est coordonné par trois cystéines, tant dit que le quatrième ligand est la SAM, afin de faciliter le clivage réductif et la génération du radical 5'-désoxyadénosyle, permettant

l'activation des substrats à transformer (Fig. 27) (Cheek and Broderick 2001). La superfamille radical-SAM comprend plus de 60 enzymes différentes qui catalysent les réactions radicalaires dans des processus biologiques très variés tels que la biosynthèse et la dégradation des précurseurs de l'ADN, de la vitamine, de l'antibiotique et des herbicides (Sofia, Chen et al. 2001).

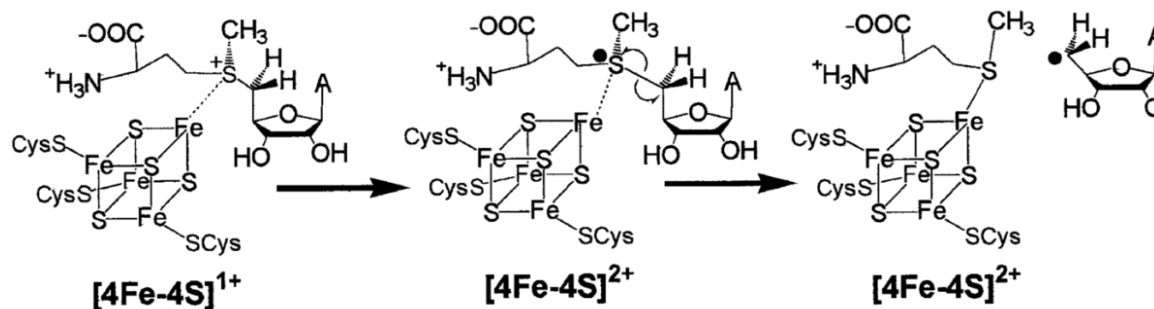


Figure 27. La formation du radical-SAM par les centres Fe-S. A = groupement adéine. (Cheek and Broderick 2001).

On peut citer par exemple la RiboNucléotide Réductase, qui catalyse la formation des quatre déoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides correspondants (Fontecave and Gerez 2002) ; la biotine synthase, une enzyme qui catalyse la conversion de la déthiobiotine en biotine (c'est la dernière étape de la voie de biosynthèse de la biotine) (Fontecave, Ollagnier-de-Choudens et al. 2003).

La régulation des gènes

Les centres Fe-S peuvent être sensibles aux conditions intra cellulaires (la concentration en Fe, en O₂, ...) et ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de certains gènes. Plusieurs régulateurs à centre Fe-S ont été décrits, tels que la FNR, IscR, ... La FNR (Fumarate et Nitrate Reductase en anglais) contrôle l'expression de nombreux gènes dans les conditions anaérobies (Kiley and Beinert 2003). La forme active de FNR, qui est capable de se lier à l'ADN, est un dimère possédant un centre [4Fe-4S]²⁺ par sous-unité. Ce centre [4Fe-4S]²⁺ se convertit rapidement en présence d'oxygène en un centre [2Fe-2S]²⁺ qui rend la protéine inactive, alors incapable de dimériser et de se lier à l'ADN.

IscR (Iron-Sulfur Cluster Regulator en anglais) est un répresseur de l'opéron *isc* qui est responsable de la biosynthèse des centres Fe-S (Kiley and Beinert 2003). Son activité régulatrice dépend de l'état des centres Fe-S dans la cellule. En effet, lorsque le pool des centres Fe-S dans la cellule est suffisant et que toutes les protéines Fe-S sont actives, IscR se trouve sous forme holo, contenant un centre [2Fe-2S]. Sous cette forme, IscR se lie à l'ADN et bloque sa propre transcription ainsi que celle de l'opéron *isc*. Au contraire, dans les conditions de carence en centres Fe-S, la transcription de ces deux derniers sont re-activées par la forme apo d'IscR.

Autres fonctions

Jusqu'à présent, il était admis que certaines protéines Fe-S possédaient un centre n'ayant aucune des fonctions ci-dessus, et servant simplement à structurer la chaîne polypeptidique. Cette classe de protéine était représentée principalement par l'endonucléase III et MutY, qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN (Kuo, McRee et al. 1992, Porello, Cannon et al. 1998). Cependant, des études récentes suggèrent que le centre [4Fe-4S] de ses enzymes ne joue pas seulement le rôle structural mais est impliqué dans un processus redox permettant la détection et la modification des bases de l'ADN endommagées (Yavin, Stemp et al. 2006).

Des polyferrédoxines (chez les Archées uniquement), contenant jusqu'à 12 centres [4Fe-4S], ont été proposés comme jouant un rôle de stockeur de fer (Hedderich, Albracht et al. 1992).

VI. Exemple d'une enzyme impliquée dans la réaction d'hydroxylation en anaérobie

Comme je me suis intéressé à deux protéines UbiU et UbiV dont nous avons fait l'hypothèse qu'elles étaient impliquées dans des processus d'hydroxylation anaérobie dans la biosynthèse de l'ubiquinone, je me suis intéressé à chercher quels étaient les autres exemples d'enzymes capables de réaliser une réaction d'hydroxylation en l'absence de dioxygène O₂. Il existe quelques rares enzymes capables d'opérer des réactions d'hydroxylation en anaérobie. L'une d'entre elles est l'éthylbenzène déshydrogénase (EBDH).

Trois espèces bactériennes capables de dégrader de manière anaérobie l'éthylbenzène sont connues à ce jour (Kniemeyer and Heider 2001). Ce sont toutes des bactéries dénitrifiantes appartenant au genre *Azoarcus* des β -protéobactéries. Pour l'une de ces souches, *Azoarcus* sp. EB1, l'éthylbenzène est le seul hydrocarbure connu utilisé comme substrat de croissance (Ball, Johnson et al. 1996). Les deux autres souches utilisent soit l'éthylbenzène, soit un autre composé hydrocarboné à savoir le toluène (souche EbN1) ou le *n*-propylbenzène (souche PbN1) (Rabus and Widdel 1995).

Ethylbenzène déshydrogénase (EBDH), qui catalyse l'oxydation de l'éthylbenzène en (S)-(-)-1-phényléthanol, la première étape de la minéralisation d'éthylbenzène chez *Azoarcus* sp. EB1 dans les conditions anaérobies, a été démontré comme la première enzyme qui catalysait l'hydroxylation d'un hydrocarbure aromatique en absence de molécule de dioxygène (Johnson and Spormann 1999) (Fig. 28A). Des études de marquage aux isotopes stables ont montré que le groupe hydroxyle du 1-phényléthanol était dérivé de l'eau (Ball, Johnson et al. 1996).

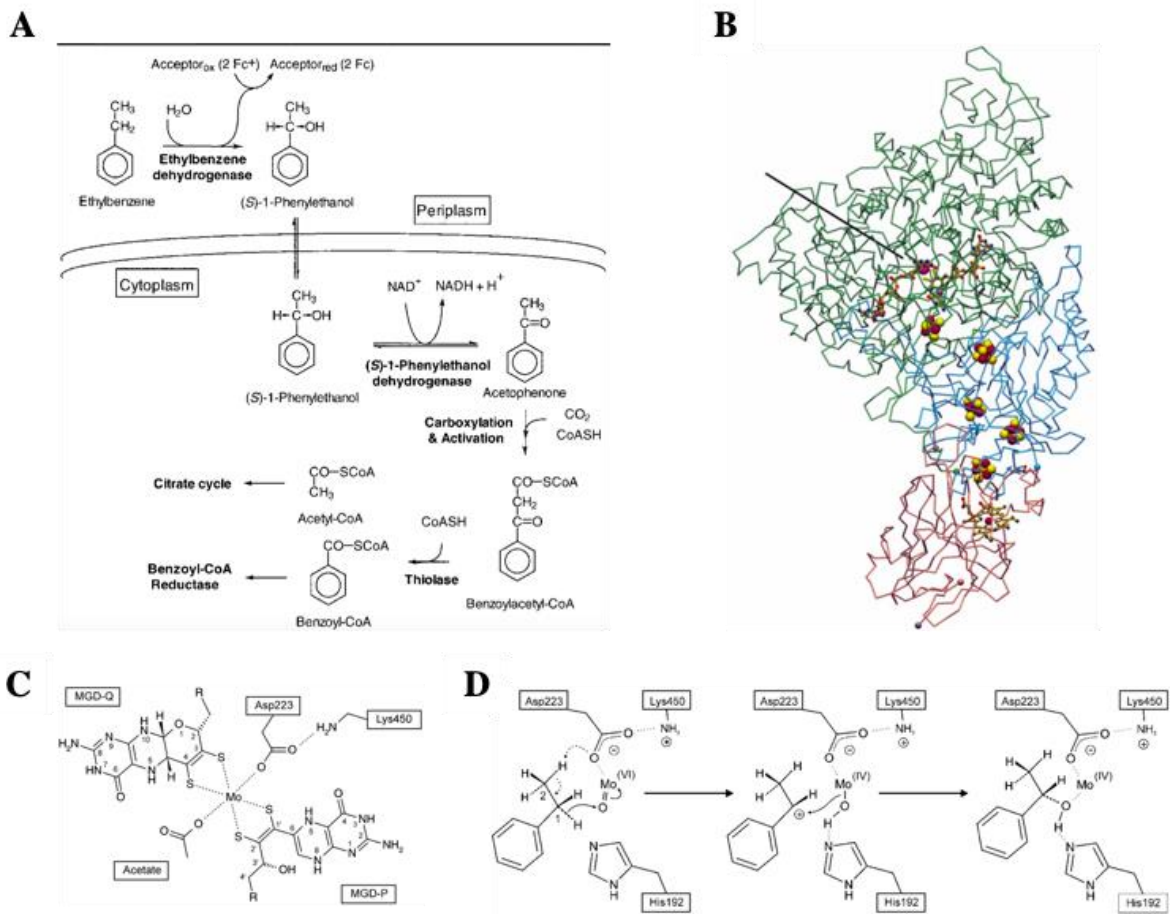


Figure 28. (A) La minéralisation d'éthylbenzène chez *Azoarcus* sp. EB1 dans les conditions anaérobiques. (B) La structure des rayons X d'éthylbenzène déhydrogénase (EDBH) chez *Aromatoleum aromaticum*. Les squelettes des Ca des sous-unités α , β , et γ sont représentés respectivement en vert, en bleu et en orange, respectivement. Les extrémités N-ter sont des sphères de couleur appropriée et les extrémités C-ter sont des sphères grises. Mo-bisMGD, les centres fer-soufre et l'hème sont représentés sous forme de représentation atomique. Tous les cofacteurs font partie d'une chaîne de transport d'électrons traversant les trois sous-unités. La poche en forme de tunnel menant au centre actif est marquéé par une ligne noire. Pendant la catalyse, deux électrons résultant de l'utilisation d'eau pour l'hydroxylation de l'éthylbenzène sont transférés du centre de Mo dans la sous-unité α au fer hémique dans la sous-unité γ , d'où ils sont donnés à un accepteur encore inconnu. (C) La structure chimique du cofacteur Mo-bisMGD observé (D) Le mécanisme de réaction putatif de l'EDBH.

L'enzyme EDBH est un membre de la famille des enzymes diméthylsulfoxyde (DMSO) réductase qui comprend toutes les enzymes connues contenant du molybdène mononucléaire dans le centre actif (Hille 1996). EDBH est soluble et se trouve dans le périplasme. La structure de l'EDBH d'*Aromatoleum aromaticum* a été obtenue en 2006 par Kloer et ses collègues (Kloer, Hagel et al. 2006) (Fig. 28B). EDBH est un hétérotrimère de 160 kDa qui est composé de 3 sous-unités : α (100 kDa), β (35 kDa) et γ (25 kDa). La sous-unité α contient un centre [4Fe-4S] coordonné par trois cystéines et une histidine et un système du cofacteur molybdoptérine guanine dinucléotide (Mo-bisMGD) dans son centre actif (Fig. 28C). La sous-unité β possède quatre centres Fe-S (trois centres [4Fe-4S] et un centre [3Fe-

4S]) ; ces derniers, avec le centre Fe-S de la sous-unité γ , sont arrangés en forme d'un W (Fig. 28B). Les résidus Lys185 et His187 de la sous-unité β se lient directement par des liaisons hydrogènes avec un hème b qui se trouve dans la sous-unité γ .

Le mécanisme de réaction a été proposé dans la figure 28D. La réaction commence par une oxydation de l'ion Mo (IV) en état Mo (VI) par une élimination de deux électrons via la chaîne de transport d'électrons à travers des centres Fe-S jusqu'à l'hème. L'ion Mo (VI) se lie une molécule d'eau et le complexe Mo (VI)-H₂O libère ensuite deux protons via His192 pour former le groupe oxo indiqué comme état initial sur la figure 28D

Après la liaison au substrat, l'atome C2 est polarisé par le groupe carboxyle de Asp223, ce qui facilite le transfert d'une paire d'électrons et d'un proton de l'atome C1 au groupe oxo situé au Mo (VI). Ce transfert conduit à un groupe hydroxyle transitoire lié à Mo (IV) et à un carbocation transitoire en C1. Ensuite, le groupe hydroxyle du Mo (IV) s'ajoute à l'atome C1 du substrat. Après l'hydroxylation de l'éthylbenzène, l'ion molybdène se trouve en état Mo (IV) et il est ensuite réoxydé en état Mo (VI) pour terminer le cycle de réaction. Cela a lieu à travers la chaîne des cofacteurs rédox connectant le molybdène et l'hème.

VII. Objectif de la thèse

Ma thèse a eu pour but de participer à une description plus complète de la biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie et en anaérobie chez *E. coli* et une évaluation de l'implication physiologique de l'ubiquinone dans diverses fonctions cellulaires dans des environnements de laboratoire et dans la colonisation de différents hôtes. Pour atteindre cet objectif, les trois laboratoires (CPB, UMR8229, Collège de France, Paris ; UMR5163, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UJF-Grenoble ; UMR7283, Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille, puis Institut Pasteur, Département de Microbiologie, Paris) combinent des approches multidisciplinaires : (i) génétique et physiologie microbienne, (ii) biologie moléculaire et imagerie cellulaire, (iii) chimie des protéines biologie structurale et synthèse organique des intermédiaires de l'ubiquinone qui ne sont pas disponibles dans le commerce.

Ma thèse se concentre sur la troisième partie de ce projet, c.à.d les études biochimiques et structurales des protéines Ubi qui ont été auparavant identifiées par nos collaborateurs afin d'élucider leur fonction notamment vis-à-vis d'un complexe Ubi qui regroupe plusieurs protéines Ubi. En outre, une grande partie de ma thèse se repose sur la caractérisation biochimique et structurale des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobies (UbiT, UbiU, UbiV) chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa*. Les 4 différents chapitres résultats de cette thèse seront :

- Mise en évidence d'un complexe aérobie Ubi chez *E.coli*
- Caractérisation biochimique d'UbiU, d'UbiV et d'UbiT d'*E.coli*
- Caractérisation biochimique d'UbiU, d'UbiV et d'UbiT de *Pseudomonas aeruginosae*
- Expression et purification de RlhA et de TrhP

Pour ce dernier axe de ma thèse, bien que ces deux protéines ne soient pas impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone, elles présentent des similitudes avec UbiU et UbiV au point de vue du mécanisme de réaction. Dans le but de trouver le mécanisme de réaction, ses protéines semblent être avantageuses car leur substrats (ARNr et ARNt) sont illimités et faciles à manipuler ; alors que ceux d'UbiU et d'UbiV ne sont pas disponibles dans le commerce et la synthèse chimique est difficile. De plus, ces molécules, avec la queue polyisoprényle, sont très hydrophobes et demandent un tampon qui est compatible à la fois aux substrats, UbiU-UbiV et au cofacteur/oxydant.

Chapitre II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Mat ériels biologiques

I.1 Souches bact ériennes

Souche	G énotype	Fonction
<i>E. coli</i> DH5 α ¹	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-</i> 1 <i>gyrA96 relA1</i>	Souche permettant d'obtenir de nombreuses copies de plasmide, utilisée pour obtenir les stocks d'ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> BL21(DE3) ¹	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Souche permettant le contr ˆle de la surexpression des prot éines dont le g ène a été clon é en aval du promoteur T7, induit par la T7 ARN polym érase. Le phage DE3 présent dans la souche contient le g ène codant pour la T7 ARN polym érase sous contr ˆle du promoteur LacUV5 inductible par l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) : ce n'est qu'à l'ajout d'IPTG que la T7 ARN polym érase, et par cons équent la prot éine d'intér ˆt, vont ˆtre surexprim ées.
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ubiU-ubiV</i> ²	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>ubiU-</i> <i>ubiV::kan</i>	Souche d érivée d' <i>E. coli</i> BL21(DE3) dont les g ènes <i>ubiU</i> et <i>ubiV</i> ont été remplac és par le g ène r ésisant à kanamycine, permettant la surexpression d'UbiU et d'UbiV de <i>P. aeruginosa</i> .
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) ³	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcmrne131</i> (DE3)	Souche permettant le contr ˆle de la surexpression des prot éines dont le g ène a été clon é en aval du promoteur T7, induit par la T7 ARN polym érase. Le phage DE3 présent dans la souche contient le g ène codant pour la T7

		ARN polymérase sous contrôle du promoteur LacUV5 inducible par l'IPTG : ce n'est qu'à l'ajout d'IPTG que la T7 ARN polymérase, et par conséquent la protéine d'intérêt, vont être surexprimées. Cette souche offre également une meilleure stabilité d'ARNm compte tenu d'une mutation dans le gène RNaseE (<i>rne131</i>) qui réduit les niveaux de RNase endogènes et la dégradation d'ARNm, augmentant ainsi la stabilité des transcripts d'ARNm et le rendement des protéines
--	--	---

Tableau 6. Souches bactériennes utilisées. Sources : ¹Agilent Technologie, ²Institut Pasteur, Département de Microbiologie. ³Thermo Fisher Scientific.

I.2 Vecteurs plasmidiques

Nom	Caractéristiques	Origine
pGro7	Plasmide permettant de surexprimer les chaperonnes GroES et GroEL. Les gènes codant pour ces protéines sont en aval du promoteur araB, inducible par le L-arabinose. Gène de résistance au chloramphénicol.	TaKaRa Bio, Inc. (Japan)
pET22- <i>ubiV</i>	Plasmide permettant la surexpression d'UbiV d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inducible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé au cours de la thèse
pET22- <i>ubiU</i>	Plasmide permettant la surexpression d'UbiU d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inducible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé au cours de la thèse
pETDuet- <i>ubiU/ubiV</i>	Plasmide permettant la co-surexpression d'UbiU sans étiquette et d'UbiV d' <i>E. coli</i> avec une	Réalisé au cours de la thèse

	<p>étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Les séquences sont intégrées en aval de deux promoteurs T7 indépendants et inductibles par l'IPTG. Gène de résistance à l'ampicilline.</p>	
pET32-ubiT	<p>Plasmide permettant la surexpression d'une protéine de fusion Thiorédoxine d'<i>E. coli</i> (Trx) et UbiT d'<i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG. Le gène <i>ubiT</i> est inséré en aval du gène codant pour la thiorédoxine. Une séquence codant pour un site clivable par la thrombine et une séquence codant pour l'étiquette de six histidines sont présentes entre les deux gènes. La séquence est intégrée en aval d'un promoteur T7 inductibles par l'IPTG. Gène de résistance à l'ampicilline.</p>	Réalisé au cours de la thèse
pET22-ubiV _{PA}	<p>Plasmide permettant la surexpression d'UbiV de <i>P. aeruginosa</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.</p>	Réalisé au cours de la thèse
pET22-ubiU _{PA}	<p>Plasmide permettant la surexpression d'UbiU de <i>P. aeruginosa</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.</p>	Réalisé au cours de la thèse
pET32-ubiT _{PA}	<p>Plasmide permettant la surexpression d'une protéine de fusion Thiorédoxine d'<i>E.coli</i> (Trx) et UbiT de <i>P. aeruginosa</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG. Le gène <i>ubiT_{PA}</i> est inséré en aval du gène codant pour la thiorédoxine. Une séquence codant pour un site clivable par la thrombine et une séquence codant pour l'étiquette de six histidines sont présentes entre les deux gènes. La séquence <i>ubiT_{PA}</i> a été optimisée par une</p>	Réalisé au cours de la thèse

	modification des codons pour une surexpression chez <i>E. coli</i> . La séquence est intégrée en aval d'un promoteur T7 inductibles par l'IPTG. Gène de résistance à l'ampicilline.	
pETDuet-ubiK	Plasmide permettant la surexpression d'UbiK d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec aucune étiquette Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé par Bruno Faive
pETDuet-6his-ubiJ/ubiK	Plasmide permettant la co-surexpression d'UbiK sans étiquette et d'UbiJ d' <i>E. coli</i> avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale. Les séquences sont intégrées en aval de deux promoteurs T7 indépendants et inductibles par l'IPTG. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé par Bruno Faive
pETDuet-ubiJ ($\Delta 121-201$)	Plasmide permettant la surexpression du domaine SCP2 d'UbiT (1-120) avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale. La séquence est intégrée en aval d'un promoteur T7 inductibles par l'IPTG. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé par Bruno Faive
pET22-rlhA	Plasmide permettant la surexpression d'RlhA d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé au cours de la thèse
pET15-rlhA	Plasmide permettant la surexpression d'RlhA d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale. Gène de résistance à l'ampicilline.	Réalisé au cours de la thèse
pET15-trhP	Plasmide permettant la surexpression de TrhP d' <i>E. coli</i> en aval d'un promoteur T7 inductible par l'IPTG avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale. Gène de résistance à	Réalisé au cours de la thèse

	l'ampicilline.	
--	----------------	--

Tableau 7. Vecteurs plasmidiques utilis és

pET22-ubiV : UbiV d'*E.coli*

ATGAAATATTCCTTAGGGCCAGTGCTGTGGTACTGGCCAAAAGAGACGCTGGAA
GAATTTTATCAGCAGGCCGCCACCAGCAGCGCCGACGTGATTTATCTTGGTGAAG
CGGTATGCAGCAAGCGTCGGGCAACCAAAGTTGGCGACTGGCTGGAGATGGCAA
AATCGCTCGCCGGGAGTGGTAAGCAGATTGTGCTCTCCACGCTGGCGCTGGTGCA
GGCATCATCTGAACTGGGCGAACTGAAACGCTATGTTGAGAACGGTGAGTTTCTG
ATTGAAGCCAGCGATCTCGGCGTGGTGAATATGTGCGCTGAACGCAAACCTGCCGT
TCGTGCGCCGGGCACGCGCTGAACTGCTACAACGCGGTGACACTGAAAATATTGCT
CAAACAGGGCATGATGCGCTGGTGTATGCCAGTGGAGCTTTCCCGCGACTGGCTG
GTGAATCTGCTTAATCAGTGCGATGAGCTGGGCATTCGTAACCAGTTTGAAGTGG
AAGTCCTGAGCTACGGTCATCTGCCGCTGGCCTACTCCGCCCCGCTGCTTTACTGCG
CGTTTCGGAAGACCGCCCGAAAGATGAGTGTGAAACCTGCTGCATTAAGTATCCG
AACGGGCGCAACGTGCTGTGCGCAGGAAAACCAACAAGTGTTTGTACTCAATGGC
ATTCAGACCATGAGCGGCTACGTTTACAACCTCGGTAACGAGCTGGCATCCATGC
AGGGCCTGGTTGATGTGGTCCGCCTGTCACCGCAGGGTACTGACACTTTCGCGAT
GCTCGACGCCTTCCGCGCTAATGAAAATGGCGCTGCACCACTGCCGTTGACGGCG
AACAGCGACTGTAACGGCTACTGGCGGCGGCTGGCAGGACTGGAGCTGCAAGCC
CTTGAACACCACCATCATCACCATTAA

pET22-ubiU : UbiU d'*E.coli*

ATGGAGCTGCTCTGCCCTGCCGAAATCTCCCGGCGCTTAAGGCGGCCATCGAAA
ACGGCGCAGATGCTGTTTATATCGGGCTAAAAGATGATACCAATGCCCGTCACTT
CGCCGGCCTTAACTTTACCGAGAAAAAATTGCAGGAAGCGGTGAGTTTTGTCCAT
CAACATCGCCGAAACTTCACATCGCGATTAACACTTTTGCGCATCCGGACGGTT
ACGCCCCGTTGGCAGCGCGCCGTGGATATGGCGGCGCAGCTGGGTGCCGACGCGC
TGATCCTCGCCGACCTCGCCATGCTGGAGTACGCCGCCGAGCGTTATCCGCATAT
TGAGCGCCACGTATCGGTGCAGGCTTCGGCGACCAATGAAGAGGCGATTAACCTT
TATCATCGCCATTTTGACGTTGCTCGCGTGGTGTGCTGCCGCGCGTGTTGTCGATTCA
TCAGGTGAAACAACCTGGCACGGGTCACACCTGTACCACTGGAAGTCTTTGCTTTC
GGCAGCCTGTGCATTATGTGCGGAAGGTCGTTGCTATCTGTCGTCGTATCTGACGG
GTGAGTCGCCAACACCATAGGCGCGTGTTCTCCGGCCCCGTTTCGTGCGCTGGCA
ACAAACGCCGACGGGGCTGGAATCCCGCCTGAACGAAGTGCTGATCGACCGTTA

TCAGGACGGCGAAAACGCAGGTTATCCGACGCTATGTAAAGGGCGTTATCTGGT
GGACGGCGAGCGCTATCACGCGCTGGAAGAACCAACCAGTCTCAATACCCTGGA
ACTGCTGCCGGAGTTAATGGCGGCGAATATTGCTTCGGTGAAAATTGAAGGCCGC
CAGCGTAGCCCGGCGTATGTCAGCCAGGTGGCGAAAGTCTGGCGTCAGGCTATC
GACCGTTGTAAGGCCGATCCGCAAACTTTGTACCGCAAAGCGCGTGGATGGAG
ACGCTCGGGTCGATGTCCGAAGGCACGCAAACCACTCTTGGCGCATATCACCGTA
AATGGCAGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

pETDuet-ubiU/ubiV : Complexe UbiU-UbiV d'*E. coli*

• *ubiU*

ATGGAGCTGCTCTGCCCTGCCGAAATCTCCCGGCGCTTAAGGCGGCCATCGAAA
ACGGCGCAGATGCTGTTTATATCGGGCTAAAAGATGATACCAATGCCCGTCACTT
CGCCGGCCTTAACCTTACCGAGAAAAAATTGCAGGAAGCGGTGAGTTTTGTCCAT
CAACATCGCCGAACTTCACATCGCGATTAACACTTTTGGCGATCCGGACGGTT
ACGCCCGTTGGCAGCGCGCCGTGGATATGGCGGCGCAGCTGGGTGCCGACGCGC
TGATCCTCGCCGACCTCGCCATGCTGGAGTACGCCGCCGAGCGTTATCCGCATAT
TGAGCGCCACGTATCGGTGCAGGCTTCGGCGACCAATGAAGAGGCGATTAACCTT
TATCATCGCCATTTTGACGTTGCTCGCGTGGTGCTGCCGCGCGTGTTGTCGATTCA
TCAGGTGAAACAACACTGGCACGGGTCACACCTGTACCACTGGAAGTCTTTGCTTTC
GGCAGCCTGTGCATTATGTCGGAAGGTCGTTGCTATCTGTCGTCGTATCTGACGG
GTGAGTCGCCAACACCATAGGCGCGTGTTCTCCGGCCCGTTTCGTGCGCTGGCA
ACAAACGCCGCAGGGGCTGGAATCCCGCCTGAACGAAGTGCTGATCGACCGTTA
TCAGGACGGCGAAAACGCAGGTTATCCGACGCTATGTAAAGGGCGTTATCTGGT
GGACGGCGAGCGCTATCACGCGCTGGAAGAACCAACCAGTCTCAATACCCTGGA
ACTGCTGCCGGAGTTAATGGCGGCGAATATTGCTTCGGTGAAAATTGAAGGCCGC
CAGCGTAGCCCGGCGTATGTCAGCCAGGTGGCGAAAGTCTGGCGTCAGGCTATC
GACCGTTGTAAGGCCGATCCGCAAACTTTGTACCGCAAAGCGCGTGGATGGAG
ACGCTCGGGTCGATGTCCGAAGGCACGCAAACCACTCTTGGCGCATATCACCGTA
AATGGCAGTGA

• *ubiV*

ATGAAATATTCCTTAGGGCCAGTGCTGTGGTACTGGCCAAAAGAGACGCTGGAA
GAATTTTATCAGCAGGCCGCCACCAGCAGCGCCGACGTGATTTATCTTGGTGAAG
CGGTATGCAGCAAGCGTCGGGCAACCAAAGTTGGCGACTGGCTGGAGATGGCAA
AATCGCTCGCCGGGAGTGGTAAGCAGATTGTGCTCTCCACGCTGGCGCTGGTGCA

GGCATCATCTGAACTGGGCGAACTGAAACGCTATGTTGAGAACGGTGAGTTTCTG
ATTGAAGCCAGCGATCTCGGCCTGGTGAATATGTGCGCTGAACGCAAACCTGCCGT
TCGTCGCCGGGCACGCGCTGAACTGCTACAACGCGGTGACACTGAAAATATTGCT
CAAACAGGGCATGATGCGCTGGTGTATGCCAGTGGAGCTTTCCCGCGACTGGCTG
GTGAATCTGCTTAATCAGTGCATGAGCTGGGCATTCGTAACCAGTTTGAAGTGG
AAGTCCTGAGCTACGGTCATCTGCCGCTGGCCTACTCCGCCCGCTGCTTTACTGCG
CGTTCGGAAGACCGCCCGAAAGATGAGTGTGAAACCTGCTGCATTAAGTATCCG
AACGGGCGCAACGTGCTGTCGCAGGAAAACCAACAAGTGTGTTTGTACTCAATGGC
ATTCAGACCATGAGCGGCTACGTTTACAACCTCGGTAAACGAGCTGGCATCCATGC
AGGGCCTGGTTGATGTGGTCCGCCTGTCACCGCAGGGTACTGACACTTTCGCGAT
GCTCGACGCCTTCCGCGCTAATGAAAATGGCGCTGCACCACTGCCGTTGACGGCG
AACAGCGACTGTAACGGCTACTGGCGGCGGCTGGCAGGACTGGAGCTGCAAGCC
CTTGAACACCACCATCATCACCATTAA

pET32-ubiT : Trx-UbiT_{PA} d'*E. coli*

ATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCA
AAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCA
AAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGA
CCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCAT
CCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAA
GTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCG
GTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCA
CGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG
ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGGGTTGGATAAAC
TGCGTTCCCGTATTGTGCATTTGGGGCCATCTCTGTTGAGTGTACCGGTAAAACCTG
ACGCCATTTGCGCTAAAACGCCAGGTTCTTGAGCAGGTCTTAAGCTGGCAATTCC
GCCAGGCGCTGGATGATGGCGAGCTGGAGTTTCTTGAAGGCCGCTGGTTAAGTAT
TCATGTGCGTGATATTGACCTGCAATGGTTTACCTCGGTGGTGAATGGCAAACCTG
GTCGTTAGCCAGAACGCGCAAGCTGATGTGAGTTTTAGTGCCGACGCCAGCGATC
TGCTGATGATTGCGGGCGCGTAAACAAGATCCGGATACGCTCTTCTTCCAGCGTCG
GCTGGTGATTGAAGGCGATAACGGAGCTGGGGCTGTATGTGAAAAACCTGATGGA
CGCCATTGAACTGGAGCAAATGCCGAAAGCCTTACGCATGATGCTGCTGCAACTG
GCGGATTTTGTGAGGCGGGAATGAAAACCGCGCCTGAAACCAAACAGACATCG
GTAGGTGAACCATGCTAA

pET22-ubiV_{PA}: UbiV_{PA} de *P. aeruginosa*

ATGAAACTGAGCCTGGGACCGCTGCTGTTCTACTGGGACAAGCGGCAGATATTCG
ATTTCTACGCCGAGATGGCCGGCCAGCCGCTCGACGTCATCTACCTCGGCGAGAC
CGTCTGCGCCAAGCGCCGGGCGCTGTCCCTGAACGATTGGCAGGCGCTGGCCCCG
GAGCTGGCGCAGGCGACCCGTGCCGAGCTGGTGCTCTCCGGGCTGGCGCTGATCG
AGGCCGCTTCGGAGCTGTCCAGCCTGCGCCGGCTATGCGAGAACGGCGAACTCC
GGGTCGAGGCCAACGACATGGCCGCCGTCTATTACCTCAGCCAGCGCGGCGTGCC
CTTTGTCGGCGGTCCGGCGCTGAACCTCTACAACGGTCATGCCCTGGCCGAACTG
TATTCCTGGGGCATGCGCCGCTGGATTCCGCCGGTGAAGTCTCCGGCAAGCTGC
TGCGCGGGGTGCTCGACCAGGCTGCGCAGCTGGGCCTGGAGCAATTGCAGACCG
AGGTCTTCGCCTACGGTCACCTGCCGCTGGCCTACTCGGCGCGCTGCTTCACCGC
GCGGGCGGAGAACC GGCCCAAGGACGACTGCCAGTTCTGCTGCCAGCAGTATCC
CGAAGGTATCCCGCTGCTCAGCCAGGAGGGCGAGGCGCTGTTACCCCTCAACGG
CATCCAGACCATGTCCGGCAAGGTCAGCAACCTGCTGGCCGACTACCGCTCGCTG
GAACATAGCGGCGCCGACCTGCTACGCCTGAGTCCTCGGGCGCAGGGCATGGCC
GAGGTGATCGCGGCCTTCGACCGGGTACGCAAGGGTGCCGCTCCGCCGCTCGCCG
TGGAAGGCTGCAACGGCTACTGGCACGGCCGGCCGGGGATGCTGCGGGCAGAGG
AGGCAGGGCTATGCCTCGAGCACCACCACCACCACACTGA

pET22-ubiU_{PA}: UbiU_{PA} de *P. aeruginosa*

ATGCAACTGGTCTGTCCGGCGGGCAGCCTGCCCGCCTTGAAGTCGGCCCTGCGAC
AGGGCGCCGATGCCATCTACGTCGGTTTCCGCGACGACACCAACGCCCGCCATTT
CGCCGGCCTCAACCTTGACGAACGCCAGTTGCAGGAAGGCCTGCGGCGAGTCCA
CGAGGCCGGGCGGCAGCTCTACGTAGCGGTCAACACCTATTCCAGCGCGCAGGG
CTGGGAGCGCTGGCAGCGCGCGGTGGACCAGGCCGCCGACCTCGGCGTCGATGC
GTTGATCGCCGCCGACGTGGCGGTGCTCGGCTATGCCCGGAAGCGTCATCCGCGG
CTCAACCTGCATCTGTTCGGTGCAGGGCTCGGCAACCAATGCCGCGGCCCTGGCCC
TCTATCACGAACGCTACGGCATCCGTCGCGCGGTCTGCCCGCGTGCTATCGCT
GGCGCAGGTACGCCAGGTGGCGGCCGGTAGCCCGGTGCCGGTGGAGGTGTTTCG
CTTCGGCAGCCTGTGCATCATGGCCGAGGGCCGCTGCCACCTGTCTCTCTACGTC
ACCGGCGAGTCGCCGAACCTCTGCGGCGTCTGTTTCGCCGGCCAGGGCGGTGCGCT
GGAGCGAGGAACCGGAGGGGTTGACCTCGCGCCTCAACGAAGTGCTCATCGACC
GCTACGCCCGCCGGCGAGGCGGCCGGCTACCCGACCCTTGCAAGGGCCGTTTCCT

GGTCAATGGCCAGCGCTTCCATGCGCTGGAGGAACCGACCAGCCTGAACACCCT
GGACCTGGTCCCGCAGCTGGCGGAAATCGGCGTGGCGGCGGTGAAGATCGAAGG
CCGCCAGCGCAGCCCGGCCTACGTCGAGCAGGTCACCCGGGTCTGGCGCCAGGC
GCTGGACAGCTACGCCAGCGCGCCGGGCGCCTATAGCGTGCAGCCGCAATGGCA
GCGCGCGCTGGCCGGACTTTCCGAAGGGCACCAGACCACCCTGGGCGCCTATCAC
CGTTCCTGGCAGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

pET32-ubi_{T_{PA}} : Trx-Ubi_{T_{PA}} de *P. aeruginosa* optimisé

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCA
AAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCA
AAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGA
CCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCAT
CCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAA
GTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCG
GTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCA
CGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG
ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGAT
CCGAATTCATGCTGAATCGTCAGCGTCTGCTGCTGGGTGTTGCAGGTCGCCTGCT
GCCGCTGGCAGCCAAAGTTCCGCGTGGTCTGCAGCATCTGGTTCTGCAGCGTGTT
GCAAATCGTCTGTTTGCACAGCCGCTGGAAGAAGGTGCATTTGATCTGCTGGAAG
GTCGTTGGCTGCGTCTGGAAGTTCGTGATCTGGGTGTGGGTTGGTGTGTTACCCGT
GTTCCGGGTGGCCTGCGCCTGGTTGAACGTCCGCGTGCAAGCGTTACCATTCGTG
GTGATTGGCGTGATTTCCCTGCTGCTGGCAAGCCGTCATGAAGATCCGGATAACCCT
GTTTTTTCGTCGTCGTCGTTATTGAAGGTGATACCGAACTGGGTCTGGCAGTTA
AAAACCTGCTGGATAGCCTGGACCCTGAACATCTGCCTCCGTGGCTGTGGAATGC
AGTTGAACGTGCAGGTCGTGCAGTTCAAGAGGAACGTGGTGAAGCACCGCAGGG
TCCGGTTCAGGGTGCACGTGGTGGTTAA

pETDuet-ubi_K : Ubi_K d'*E. coli*

ATGATTGACCCGAAAAAAATTGAGCAAATCGCTCGCCAGGTTACGAATCAATG
CCTAAAGGAATCAGGGAGTTCGGGGAAGATGTGGAGAAAAAAATCCGCCAAACC
CTACAAGCGCAGCTGACGCGCCTCGACCTTGTAAGCCGTGAAGAGTTCGACGTCC
AAACGCAAGTCCTGTTACGGACTCGTGAAAACTGGCGCTGCTTGAACAAAGAA
TCAGCGAACTGGAAAATCGCAGTACTGAGATCAAAAAGCAGCCAGATCCAGAGA

CTCTCCCCCAACGCTGCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGA
ACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAA

pETDuet-6his-ubiJ/ubiK : Complexe UbiJ-UbiK

• *6his-ubiJ*

ATGGAATTGCATCATCATCATCATGAATTCATGCCTTTTAAACCTTTAGTGAC
GGCAGGAATTGAAAGTCTGCTCAACACCTTCCTGTATCGCTCACCCGCGCTGAAA
ACGGCCCGCTCGCGTCTGCTGGGTAAAGTATTGCGCGTGGAGGTAAAAGGCTTTT
CGACGTCATTGATTCTGGTGTTTCAGCGAACGCCAGGTTGATGTACTGGGCGAATG
GGCAGGCGATGCTGACTGCACCGTTATCGCCTACGCCAGTGTGTTGCCGAACTT
CGCGATCGCCAGCAGCTTACCGCACTGATTCGCAGTGGTGAGCTGGAAGTGCAG
GGCGATATTCAGGTGGTGCAAACTTCGTTGCGCTGGCAGATCTGGCAGAGTTCG
ACCCTGCGGAACTGCTGGCCCCTTATACCGGTGATATCGCCGCTGAAGGAATCAG
CAAAGCCATGCGCGGAGGCGCAAAGTTCCTGCATCACGGCATTAAAGCGCCAGCA
ACGTTATGTGGCGGAAGCCATTACTGAAGAGTGGCGTATGGCACCCGGTCCGCTT
GAAGTGGCCTGGTTTTCGCGAAGAGACGGCTGCCGTCGAGCGTGCTGTTGATGCCC
TGACCAAACGGCTGGAAAAACTGGAGGCTAAATGA

• *ubiK*

ATGATTGACCCGAAAAAATTGAGCAAATCGCTCGCCAGGTTACGAATCAATG
CCTAAAGGAATCAGGGAGTTCGGGGAAGATGTGGAGAAAAAATCCGCCAAACC
CTACAAGCGCAGCTGACGCGCCTCGACCTTGTAAGCCGTGAAGAGTTCGACGTCC
AAACGCAAGTCCTGTTACGGACTCGTGAAAAACTGGCGCTGCTTGAACAAAGAA
TCAGCGAACTGGAAAATCGCAGTACTGAGATCAAAAAGCAGCCAGATCCAGAGA
CTCTCCCCCAACGCTGCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGA
ACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAA

pETDuet-ubiJ (Δ 121-201) : Domaine SCP2 d'UbiJ

ATGGAATTGCATCATCATCATCATGAATTCATGCCTTTTAAACCTTTAGTGAC
GGCAGGAATTGAAAGTCTGCTCAACACCTTCCTGTATCGCTCACCCGCGCTGAAA
ACGGCCCGCTCGCGTCTGCTGGGTAAAGTATTGCGCGTGGAGGTAAAAGGCTTTT
CGACGTCATTGATTCTGGTGTTTCAGCGAACGCCAGGTTGATGTACTGGGCGAATG
GGCAGGCGATGCTGACTGCACCGTTATCGCCTACGCCAGTGTGTTGCCGAACTT
CGCGATCGCCAGCAGCTTACCGCACTGATTCGCAGTGGTGAGCTGGAAGTGCAG

GGCGATATTCAGGTGGTGCAAACTTCGTTGCGCTGGCAGATCTGGCAGAGTTTCG
ACCCTGCGTAA

pET22-rlhA : RlhA_{6his} d'*E. coli*

ATGACCGTATCTTCTCATCGACTTGAAGTAAAGCCCGGCACGCGATGCCGCCA
TTGCCCGCGAAGCTATTTTGCACGGTGCCGATGCTGTTTATATCGGGCGGCCCTGGT
TTTGGTGCCCGTCATAATGCCAGTAATAGCTTGAAAGATATTGCCGAGCTGGTGC
CGTTTGCCCATCGTTATGGTGCAAAAATTTTCGTCACGCTTAACACCATTTTGCAT
GATGATGAGCTGGAACCCGCGCAACGGCTGATTACTGACCTCTACCAGACCGGTG
TCGATGCGCTGATTGTTTCAGGATATGGGGATTCTGGAAGTATGATATTCCGCCGAT
TGAAGTGCACGCCAGTACGCAGTGCACATTCGTACAGTTGAAAAAGCGAAGTT
CCTCTCTGATGTTGGCTTCACGCAGATTGTGCTGGCGCGAGAGCTGAATCTTGAT
CAGATCCGCGGATTACACAGGCTACGGACGCGACCATTGAATTCTTTATTCATG
GGGCACTGTGCGTGGCCTATTCGGGTCAGTGCTACATTTCTCATGCGCAAACAGG
GCGTAGCGCCAACCGTGGCGATTGCTCGCAGGCGTGCCGTTTGCCATACACATTG
AAAGACGATCAGGGGCGGGTGGTTTCCCTATGAAAAACATCTGCTGTCGATGAAA
GATAACGATCAGACTGCCAACCTCGGCGCGCTGATTGATGCTGGTGTACGCTCCT
TCAAGATTGAAGGGCGTTACAAAGATATGAGCTACGTGAAGAATATCACCGCCC
ATTATCGCCAGATGCTTGATGCCATTATTGAAGAACGTGGCGATCTGGCGCGCGC
TTCATCAGGTCGTAAGTGAACATTTCTTTGTTCCATCGACGGAAAAGACTTTCCACC
GTGGTAGCACAGATTATTTTGTGAATGCCCGTAAAGGCGATATTGGCGCGTTCGA
TTCGCCGAAATTTATCGGCCTGCCGGTAGGCGAAGTAGTGAAAGTGGCGAAAGA
TCATCTCGATGTTGCCGTTACCGAGCCACTGGCAAATGGCGATGGCCTGAACGTG
TTGATTAACGTGAAGTCGTCGGTTTTTCGTGCCAATACGGTCGAGAAAACCGGAG
AAAATCAGTACCGCGTCTGGCCCAATGAAATGCCAGCAGATTTGCACAAAATTTCG
TCCACATCACCCACTAAACCGTAATCTTGATCATAACTGGCAGCAGGCACTGACA
AAAACCTCCAGCGAACGTCGGGTGGCGGTAGACATTGAACTGGGCGGCTGGCAG
GAACAACCTGATTCTGACCCTCACCAGTGAAGAGGGTGTGAGCATCACGCATACGC
TGGACGGGCAGTTCGACGAAGCCAATAACGCCGAAAAAGCAATGAACAATCTGA
AGGATGGTCTGGCAAAACTGGGGCAAACCCTCTATTACGCCCGCGATGTGCAAAT
TAATTTGCCGGGGGCGCTGTTTGTACCAAACAGTCTGTAAACCAGTTCCGCCGT
GAAGCTGCTGACATGCTGGATGCTGCGCGTCTTGCCAGTTACCAGCGCGGCAGCC
GTAAACCGGTTGCTGATCCTGCGCCGTTTATCCGCAAACGCATCTGAGTTTCCTC
GCGAACGTATACAACCAGAAAGCGCGTGAATTTTATCATCGCTATGGTGTGCAGC

TGATTGACGCGGCGTATGAAGCACATGAAGAGAAGGGCGAAGTCCCGGTGATGA
TCACCAAGCATTGTCTGCGCTTTGCCTTTAATCTGTGCCCGAAACAGGCGAAAGG
CAATATCAAAGCTGGAAGGCGACGCCAATGCAACTGGTTAACGGCGATGAAGT
ATTAACGCTAAAGTTTGATTGCCGCCCATGCGAGATGCACGTCATTGGCAAATC
AAAAATCACATACTGAAAATGCCGTTACCGGGAAGCGTAGTGGCATCCGTAAGT
CCGGATGAGCTGCTGAAAACATTGCCGAAGCGAAAAGGGCTCGAGCACCACCAC
CACCACCACTGA

pET15-rlhA : _{6his}RlhA d'E. coli

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGAAGCCATATGACCGTATCTTCTCATCGACTTGAAGTGTAAAGCCCGGCACG
CGATGCCGCCATTGCCCGCGAAGCTATTTTGCACGGTGCCGATGCTGTTTATATC
GGCGGCCCTGGTTTTTGGTGCCCGTCATAATGCCAGTAATAGCTTGAAAGATATTG
CCGAGCTGGTGCCGTTTGCCCATCGTTATGGTGCAAAAATTTTCGTCACGCTTAAC
ACCATTTTGCATGATGATGAGCTGGAACCCGCGCAACGGCTGATTACTGACCTCT
ACCAGACCGGTGTCGATGCGCTGATTGTTTCAGGATATGGGGATTCTGGAAGTGA
TATTCCGCCGATTGAACTGCACGCCAGTACGCAGTGCGACATTCGTACAGTTGAA
AAAGCGAAGTTCCTCTCTGATGTTGGCTTCACGCAGATTGTGCTGGCGCGAGAGC
TGAATCTTGATCAGATCCGCGCGATTACACAGGCTACGGACGCGACCATTGAATT
CTTTATTCATGGGGCACTGTGCGTGCCCTATTCGGGTCAGTGCTACATTTCTCATG
CGCAAACAGGGCGTAGCGCCAACCGTGCGGATTGCTCGCAGGCGTGCCGTTTGCC
ATACACATTGAAAGACGATCAGGGGCGGGTGGTTTCCTATGAAAAACATCTGCTG
TCGATGAAAGATAACGATCAGACTGCCAACCTCGGCGCGCTGATTGATGCTGGTG
TACGCTCCTTCAAGATTGAAGGGCGTTACAAAGATATGAGCTACGTGAAGAATAT
CACCGCCCATTATCGCCAGATGCTTGATGCCATTATTGAAGAACGTGGCGATCTG
GCGCGCGCTTCATCAGGTCGTAAGTGAACATTTCTTTGTTCCATCGACGGAAAAGA
CTTTCCACCGTGGTAGCACAGATTATTTTGTGAATGCCCGTAAAGGCGATATTGG
CGCGTTCGATTCCGCCGAAATTTATCGGCCTGCCGGTAGGCGAAGTAGTGAAAGTG
GCGAAAGATCATCTCGATGTTGCCGTTACCGAGCCACTGGCAAATGGCGATGGCC
TGAACGTGTTGATTAAACGTGAAGTCGTCGGTTTTTCGTGCCAATACGGTTCGAGAA
AACCGGAGAAAATCAGTACCGCGTCTGGCCCAATGAAATGCCAGCAGATTTGCA
CAAATTCGTCCACATCACCCACTAAACCGTAATCTTGATCATAACTGGCAGCAG
GCACTGACAAAACCTCCAGCGAACGTCGGGTGGCGGTAGACATTGAACTGGGC
GGCTGGCAGGAACAACCTGATTCTGACCTCACCAGTGAAGAGGGTGTGAGCATC

ACGCATACGCTGGACGGGCAGTTCGACGAAGCCAATAACGCCGAAAAAGCAATG
AACAAATCTGAAGGATGGTCTGGCAAAACTGGGGCAAACCCTCTATTACGCCCGC
GATGTGCAAATTAATTTGCCGGGGGCGCTGTTTGTACCAAACAGTCTGTAAACC
AGTTCCGCCGTGAAGCTGCTGACATGCTGGATGCTGCGCGTCTTGCCAGTTACCA
GCGCGGCAGCCGTAAACCGGTTGCTGATCCTGCGCCGGTTTATCCGCAAACGCAT
CTGAGTTTCCTCGCGAACGTATAACAACAGAAAGCGCGTGAATTTTATCATCGCT
ATGGTGTGCAGCTGATTGACGCGGCGTATGAAGCACATGAAGAGAAGGGCGAAG
TCCCGGTGATGATCACCAAGCATTGTCTGCGCTTTGCCTTTAATCTGTGCCCGAAA
CAGGCGAAAGGCAATATCAAAAAGCTGGAAGGCGACGCCAATGCAACTGGTTAAC
GGCGATGAAGTATTAACGCTAAAGTTTGATTGCCGCCCATGCGAGATGCACGTCA
TTGGCAAAATCAAAAATCACATACTGAAAATGCCGTTACCGGGAAGCGTAGTGG
CATCCGTAAGTCCGGATGAGCTGCTGAAAACATTGCCGAAGCGAAAAGGGTAA

pET15-*trhP* : TrhP d'*E. coli*

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGAAGCCATATGTTTAAACCGGAACCTTTCCCGGCGGGAAACGCTGAAAA
ATATGCGTTACGCTTTCGCTTATGGCGCAGATGCTGTTTATGCGGGCCAGCCGCG
TTATTCCCTGCGTGTGCGCAACAACGAATTCAACCACGAAAATCTTCAGCTCGGC
ATCAATGAAGCCCACGCGCTGGGGAAAAAGTTTTATGTCGTGGTCAACATTGCAC
CGCACAACGCCAAGCTGAAAACCTTTATCCGTGACCTGAAACCGGTGGTGGAAA
TGGGGCCGGATGCGCTGATTATGTCCGATCCAGGGCTGATTATGCTGGTGCCTGA
GCACTTCCCTGAAATGCCGATCCACCTTTCGGTGCAGGCTAACGCCGTGAACTGG
GCGACGGTGAAATTCTGGCAGCAAATGGGCCTGACCCGCGTGATCCTCTCTCGCG
AGCTGTCGCTGGAAGAGATTGAAGAGATCCGCAATCAGGTGCCGGATATGGAGA
TCGAGATCTTCGTTACGGCGCGCTGTGCATGGCCTACTCCGGTCGCTGCCTGCTC
TCTGGCTATATCAACAAGCGCGACCCGAACCAGGGCACCTGCACCAACGCCTGCC
GCTGGGAGTACAACGTCCAGGAAGGGAAAGAAGATGATGTTGGCAACATCGTAC
ACAAGTACGAGCCGATTCCGGTGCAAAATGTTGAGCCGACGCTGGGTATCGGCG
CACCAACCGACAAAGTGTTTATGATCGAAGAGGCCAGCGTCCGGGCGAGTATA
TGACCGCGTTTGAAGATGAGCACGGCACTTACATCATGAACTCGAAAGATCTGCG
CGCCATCGCCCATGTAGAACGCCTGACCAAAAATGGGCGTGCAATTCGCTGAAAATC
GAAGGTCGTACCAAATCTTTCTACTATTGTGCACGCACCGCACAGGTTTACCGCA
AAGCTATCGATGACGCCGCTGCGGGAAAACCGTTCGATACCAGCCTGCTGGAAA
CTCTGGAAGGTCTGGCGCATCGTGGCTATAACCGAAGGTTTCCTGCGTCGTCATAC

TCACGACGATTATCAGAACTACGAATACGGTTATTCAGTTTCTGACCGCCAGCAG
TTTGTTGGTGAGTTTACCGGTGAGCGCAAGGGGGACCTCGCGGCGGTAGCGGTGA
AAAATAAATTCTCCGTTGGCGACAGCCTTGAGCTGATGACGCCGCAAGGCAACAT
TAATTTTACCCTTGAGCACATGGAAAACGCCAAAGGCGAAGCTATGCCGATAGC
ACCAGGCGATGGTTATACTGTGTGGCTCCCGGTCCCGCAGGATCTTGAGCTCAAT
TACGCGCTGCTGATGCGTAATTTCTCCGGGGAAACCACGCGTAATCCCCACGGTA
AGTGA

I.3 Milieu de culture

Le milieu LB (Lysogeny Broth), utilisé pour cultiver les souches bactériennes, est composé de 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et de 10 g/L de NaCl, pH 7.0 ± 0.2 . Il est stérilisé à chaud (20 min à 120 °C). Pour les cultures sur boîtes de Pétri (milieu solide), 15 g d'agar par litre de milieu LB sont ajoutés. Les antibiotiques nécessaires à la sélection des souches bactériennes sont ajoutés à raison de 50 µg/mL pour l'ampicilline, 14 µg/mL pour le chloramphénicol et de 20 µg/mL pour la kanamycine. Pour les cultures surexprimant les chaperonnes GroES et GroEL, l'induction se fait en supplémentant le milieu au cours de la culture, avec 0,2% de L-arabinose (poids/volume), soit 2 g de L-arabinose par litre de culture.

II. Biologie moléculaire

II.1 Préparations des bactéries compétentes

Les bactéries sont cultivées dans 25 ml de milieu LB jusqu'en phase de croissance exponentielle ($A_{600 \text{ nm}} \sim 0.4$), où elles sont ensuite placées dans la glace pendant 15 min. Après centrifugation (2 700 g, 4 °C, 10 min), les cellules sont décantées par inversion du tube pour enlever tout le liquide, puis resuspendues dans 8.5 ml d'une solution préalablement refroidie dans la glace contenant 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ 100 mM, 30 mM acétate de potassium CH₃CO₂K, 15 % glycérol. Les cellules resuspendues sont ensuite incubées dans la glace (15 min) puis collectées (580 g, 4 °C, 15 min) et décantées. Les cellules sont alors resuspendues dans 2 ml d'une solution refroidie dans la glace et contenant 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glycérol. Les cellules resuspendues sont ensuite incubées dans la glace (15 min). Les cellules compétentes ainsi obtenues sont aliquotées par 50 ou 100 µl, et congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C avant utilisation.

II.2 Transformation des bactéries par choc thermique

Afin d'intégrer le plasmide désiré dans une souche bactérienne, un aliquot de 50 µL de cellules compétentes de la souche désirée est placé dans la glace et mis à incuber pendant 30 min avec 50 µg de plasmide afin que l'ADN puisse s'adsorber à la surface des bactéries. Un

choc thermique de 45 secondes à 42 °C restaure instantanément la fluidité de la membrane bactérienne et permet au plasmide de franchir les enveloppes bactériennes. Après 1 min à 4 °C, 800 µL de milieu de culture sans antibiotique sont ajoutés aux cellules ainsi transformées qui sont mises en culture pendant 1 h à 37 °C. Cette étape permet, pour les cellules ayant incorporé le plasmide, de restaurer le métabolisme et la croissance des bactéries ainsi que de démarrer la traduction du gène de résistance à l'antibiotique présent sur celui-ci. Ainsi, lorsqu'elles seront étalées sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique correspondant, les colonies transformées seront sélectionnées. Classiquement, la boîte de Pétri est placée à l'étuve à 37°C sur la nuit et récupérée le lendemain matin, entourée de parafilm et placée au frigo, où elle peut être conservée pendant trois semaines.

II.3 Extraction et purification des plasmides

Une colonie de bactéries DH5α, transformées par le plasmide à amplifier, est prélevée sur boîte de Pétri et mise en culture sur la nuit à 37 °C sous agitation (200 rpm) dans 10 mL de milieu de culture contenant l'antibiotique approprié. Le lendemain, les bactéries sont collectées par centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les ADN plasmidiques sont ensuite extraits et purifiés à grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). La méthode consiste en un traitement à la RNase suivi d'une lyse cellulaire basique qui dénature l'ADN chromosomique et les protéines. Le lysat est déposé sur une colonne de silice qui permet de retenir l'ADN plasmidique. Après deux lavages permettant d'enlever les impuretés, l'ADN plasmidique est élué avec de l'eau ou un tampon contenant une faible concentration en sel. La concentration en ADN plasmidique est déterminée en mesurant l'absorption à 260 nm de la solution sur un NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

II.4 Mutagenèse

Les mutants cystéine en alanine sont générés à partir des plasmides correspondants en utilisant le kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs). Ce kit est conçu pour la réalisation rapide et efficace d'insertions, de délétions et de substitutions au niveau d'un ADN plasmidique double brin (Fig. 29). Première étape : amplification exponentielle à l'aide d'amorces standards et d'un master mix contenant Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase. Deuxième étape : incubation avec un mélange d'enzymes unique contenant une kinase, une ligase et DpnI, permettant la circularisation rapide du produit de PCR et l'élimination de l'ADN matrice. Troisième étape : transformation de cellules compétentes.

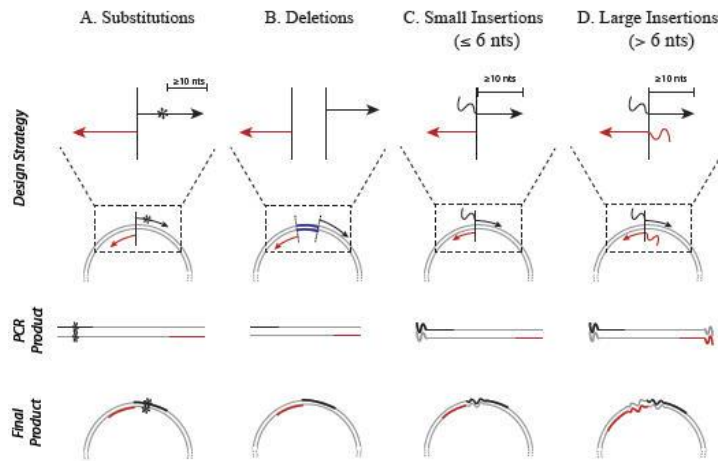


Figure 29. Principe de Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit.

III. Méthodes biochimiques

III.1 Analyses des protéines et électrophorèse

III.1.1 Dosage des protéines

La concentration en protéine est classiquement déterminée par la méthode de Bradford (Bradford 1976). Le bleu de Coomassie G-250 (Fig. 30), ou Brilliant Blue, présent dans la solution de dosage (Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5X, Bio-Rad) forme, en milieu acide, un complexe soluble anionique de couleur bleue avec les protéines, en se fixant sur les résidus basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus aromatiques (tyrosine, tryptophane, phenylalanine) de la protéine, absorbant alors à $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$. La densité optique à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration en protéine. L'albumine de sérum bovin sert à la réalisation de la gamme étalon. Cette méthode a une sensibilité de $0.2 \mu\text{g}$ de protéines.

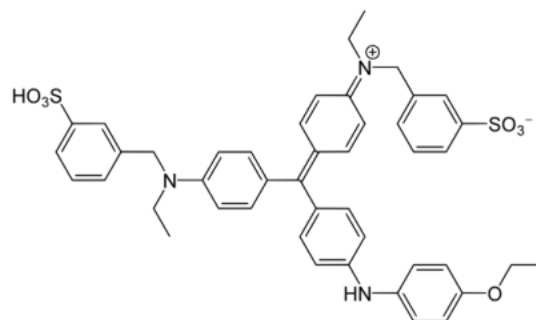


Figure 30. Structure du bleu de Coomassie G-250

III.1.2 Électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes

Cette technique analytique, appelé couramment SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est inspiré du protocole décrit par Ulrich Laemmli en 1970 (Laemmli 1970). Elle est utilisée pour analyser les protéines et les séparer en fonction de

la masse moléculaire de la chaîne polypeptidique, ainsi que d'estimer leur degré de pureté. C'est une technique dénaturante qui dissocie les complexes protéiques non-covalents. Elle permet également d'analyser des cellules entières afin de contrôler le taux d'expression d'une protéine. Des marqueurs de poids moléculaires connus sont disponibles commercialement (Bio-Rad ou Fisher Scientific).

Les échantillons protéiques à analyser sont mélangés avec un tampon dénaturant concentré 4 fois (225 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 8%, glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 3%, bleu de bromophénol 0.2%). Le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Le β-mercaptoéthanol est un agent réducteur qui réduit les ponts disulfures des protéines. Afin d'achever la dénaturation des protéines, les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C puis centrifugés pendant 5 min à 15 000 rpm. Par conséquent, les protéines dénaturées ont perdu leur structure tridimensionnelle native et elles sont sous une forme monomérique.

Le gel polyacrylamide utilisé pour séparer les protéines est en général discontinu : il est composé de deux phases. La première partie – gel de concentration, moins dense (4% d'acrylamide), permet au préalable de concentrer l'échantillon en une fine bande protéique, avant d'entrer dans la deuxième partie - gel de séparation. Cette partie contient une plus grande proportion d'acrylamide, généralement entre 8 et 12% : ce pourcentage est ajusté afin de séparer au mieux les protéines autour de la zone d'intérêt, cf. Tableau 8 pour les compositions.

Solution mère		Séparation (12%)	Concentration (4%)
Tris-HCl 0.9 M pH 8.9	pH 6,8	6 mL	0.625 mL
Acrylamide/Bisacrylamide (19:1) 40%		4.8 mL	0.75 mL
H ₂ O		4.6 mL	2.3 mL
Persulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10% (amorçeur radicalaire)		160 µL	50 µL
SDS 10%		160 µL	50 µL
TEMED		16 µL	5 µL

Tableau 8. Exemple de composition d'un gel d'acrylamide 12% pour deux gels de 1 mm d'épaisseur

Les échantillons protéiques déposés sur gel vont migrer sous une différence de potentiel de 150 V, 30 mA, pendant 60 min dans un tampon conducteur Tris-Glycine-SDS (25 mM Tris-HCl pH 8.3, glycine 192 mM, SDS 1 g/L) jusqu'à ce que le front de migration, visualisé grâce au bleu de bromophénol, atteigne le bas du gel. Les chaînes polypeptidiques, totalement dénaturées et chargées négativement de façon homogène, vont migrer à travers le gel grâce à la différence de potentiel et leur vitesse de migration ne dépendra que de leur poids moléculaire apparent, les plus petites migreront plus vite et les plus grosses plus lentement. Des marqueurs de poids moléculaire connus serviront de calibrants (Bio-rad ou Fisher Scientific).

Lorsque les protéines ont été séparées, le gel est placé dans une solution de coloration (50% H₂O, 45% éthanol, 5% acide acétique et 150 mg de bleu de Coomassie pour un litre de solution) pendant 20 min. Cette coloration permet de visualiser toutes les protéines dans l'échantillon dont la concentration dépasse la limite de détection de la coloration. Le gel coloré au bleu de Coomassie est ensuite décoloré pendant 1 heure dans une solution de décoloration (70% H₂O, 20% EtOH, 10% acide acétique) : seules les protéines, qui ont une meilleure affinité pour le bleu de Coomassie que le gel d'acrylamide, restent colorées. Le gel est ensuite analysé à l'aide du Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

III.2 Surexpression et purification des protéines

III.2.1 UbiV d'*E. coli* sauvage et ses mutants cystéine en alanine (33.6 kDa)

III.2.1.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

Les plasmides pET-22b, codant pour UbiV d'*E. coli* sauvage ou ses mutants cystéine en alanine (C193A C197A, C39A C193A C197A, C180A C193A C197A, C39A C180A C193A C197A) sont co-transformés avec le plasmide pGro7 dans les cellules compétentes BL21(DE3). Une pré-culture, à partir d'une simple colonie, est effectuée en milieu LB sur la nuit à 37 °C sous agitation (200 rpm) en présence de 50 µg/mL d'ampicilline et 14 µg/mL de chloramphénicol. Le lendemain, le milieu de culture LB est inoculé avec 1% de la pré-culture en présence des mêmes antibiotiques. La culture est réalisée à 37 °C et sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une DO_{600 nm} = 1.2. Le L- arabinose (2 g/L) est alors rajouté au milieu de culture afin d'induire l'expression et la production de GroES et GroEL. A une DO_{600 nm} = 1.8 la culture est refroidie sous eau froide puis la surexpression des protéines est induite avec 100 µM d'IPTG à 16°C sur la nuit. Toutes les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont collectées par centrifugation avec un rotor JLA - 8.1000 (Beckman Coulter, Aventi J26S XPI) à 5000 g pendant 10 min. Elles sont ensuite resuspendues à raison de 5 ml/g de cellules humides dans du tampon de lyse A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl,

15% (v/v) glycerol) contenant 1 mM DTT avec ajout d'un comprimé de Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pour 50 mL tampon de lyse A. Les cellules sont ensuite mécaniquement cassées par sonication (Branson Sonifier 450) pendant 10 min avec des cycles de 5s de sonication / 9s de repos, la sonde étant réglée sur 40% d'amplitude. Après ultracentrifugation à 190 000 g avec un rotor 50.2 Ti (35 000 rpm, Beckman Coulter ultracentrifugeuse Optima XPN80) pendant 1h, le surnageant, contenant les extraits cellulaires protéiques solubles, est récupéré

III.2.1.2 Colonne d'affinité Ni²⁺

Les protéines sont exprimées avec une étiquette de six histidines à leur extrémité C-terminal. Cette dernière possède une forte affinité pour l'ion Ni²⁺, ce qui servira pour les purifier.

Le surnageant clarifié est déposé sur une colonne HisTrap FF Crude column 5mL (GE Healthcare) pré-équilibrée avec le tampon A contenant 1 mM DTT. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon B (50 mM TrisHCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 10 mM imidazole) contenant 1 mM DTT afin d'éliminer des protéines non spécifiques d'*E.coli* retenues sur la colonne. Les protéines UbiV sauvages et ses mutantes sont ensuite éluées par un gradient linéaire en 10 volumes de colonne de 2 à 50 % de tampon B contenant 500 mM d'imidazole. Les fractions contenant les protéines (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et l'inhibiteur de protéase PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) est rajouté pour obtenir une concentration finale à 1mM.

III.2.1.3 Colonne d'exclusion stérique Superdex S75

Une colonne d'exclusion stérique permet de séparer les protéines en fonction de leur volume hydrodynamique. Si on considère que les protéines et les complexes protéiques sont globulaires, ce volume est proportionnel à leur poids moléculaire et les espèces de plus haut poids moléculaires vont sortir en premier, car elles effectueront le trajet le plus court sur la colonne. Une calibration avec des protéines de poids moléculaires connus permet de réaliser une gamme étalon permettant de calculer la masse moléculaire associée à un volume de rétention donné

Une colonne d'exclusion stérique Superdex S75 (GE Healthcare) est capable de séparer les protéines ayant un poids moléculaire situé entre 3 et 70 kDa. UbiV sauvage et les mutants issus de la colonne Nickel sont déposés sur la colonne pré-équilibrée avec le tampon C (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 1 mM DTT. Cette étape permet de séparer GroEL (60 kDa) d'UbiV sauvage ou les mutants correspondants (33.6 kDa) qui sont monomériques. Les fractions contenant les protéines (confirmées par un gel SDS-

PAGE) sont rassemblées et concentrées jusqu'à 30-40 mg/mL. Les protéines pures sont aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C.

On obtient environ 150 mg de protéine d'UbiV sauvage par litre de culture.

III.2.2 UbiU d'*E. coli* sauvage (38.1 kDa)

III.2.2.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

UbiU d'*E. coli* sauvage est surexprimée et les extraits solubles ont été obtenues en utilisant le même protocole pour UbiV d'*E. coli*, sauf que les cellules sont resuspendues dans du tampon de lyse D (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 0.2% (m/v) de sarkosyl (N-Lauroylsarcosine).

III.2.2.2 Colonne d'affinité Ni²⁺

La protéine est exprimée avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminal. Cette dernière possède une forte affinité pour l'ion Ni²⁺, ce qui servira pour les purifier.

Le surnageant clarifié est déposé sur une colonne HisTrap FF Crude column 5mL (GE Healthcare) pré-équilibrée avec le tampon D (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 0,1% (m/v) de sarkosyl. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon E (50 mM TrisHCl pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol, 10 mM imidazole) contenant 6mM du LDAO (Lauryldiméthylamine oxide) afin d'éliminer des protéines non spécifiques d'*E. coli* fixées sur la colonne. La protéine UbiU est ensuite éluée par un gradient linéaire en 10 volumes de colonne de 2 à 50 % de tampon E contenant 500 mM d'imidazole et 6mM du LDAO. Les fractions contenant les protéines (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et concentrées.

III.2.2.3 Colonne d'exclusion stérique Superdex S200

Une colonne d'exclusion stérique Superdex S200 (GE Healthcare) permet de séparer les protéines dont le poids est compris entre 10 et 600 kDa. La protéine UbiU obtenue à l'issue de la colonne Nickel est déposée sur la colonne Superdex S200 pré-équilibrée avec le tampon A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 3 mM LDAO. Cette étape permet de permettre d'éliminer les contaminants restants. Les fractions contenant la protéine (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et concentrées jusqu'à 25 mg/mL. La protéine UbiU pure est aliquotée, congelée dans liquide nitrogène et conservées à -80 °C. On obtient environ 2 mg de protéine UbiU par litre de culture.

III.2.3 Complexe UbiU-UbiV d'*E. coli* sauvage et ses mutants cystéine en alanine d'UbiU (70.6 kDa)

III.2.3.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

La surexpression et la récupération des extraits solubles du complexe UbiU-UbiV d'*E.coli* sauvage et des complexes UbiU C169A C176A-UbiV sauvage et UbiU C197A C232A -UbiV sont effectuées en utilisant le même protocole que celui d'UbiV d'*E.coli*, sauf que la surexpression des protéines est induite avec 50 μ M d'IPTG.

III.2.3.2 Purification

Le complexe UbiU-UbiV d'*E.coli* sauvage et les complexes mutants cystéine en alanine d'UbiU sont exprimées avec une étiquette de six histidines à l'extrémité C-terminal d'UbiV. Les protéines sont purifiées en utilisant le même protocole pour UbiV d'*E.coli*, sauf que les protéines sont déposées la colonne Superdex S75 pré-équilibré avec le tampon A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 1 mM DTT.

III.2.4 UbiV de *Pseudomonas aeruginosa* sauvage et ses mutants cystéine en alanine (33.7 kDa)

UbiV de *P. aeruginosa* sauvage (UbiV_{PA}) et ces mutants cystéine en alanine (C193A C197A, C39A C193A C197A) sont surexprimés et purifiés en utilisant le même protocole pour UbiV d'*E.coli*, sauf que la transformation a été effectuée dans les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV.

III.2.5 UbiU de *Pseudomonas aeruginosa* sauvage (37.1 kDa)

UbiU de *P. aeruginosa* sauvage (UbiU_{PA}) est surexprimé et purifié en utilisant le même protocole pour UbiU d'*E.coli*, sauf que la transformation a été effectuée dans les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV.

III.2.6 Trx-UbiT de *P. aeruginosa* (37.2 kDa)

III.2.6.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

Le plasmide pET-32a(+), codant pour UbiT de *P.aeruginosa* (UbiT_{PA}) fusionné avec la thiorédoxine d'*E.coli* (Trx) à son extrémité N-terminale est transformé dans les cellules compétentes BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV. Une pré-culture, à partir d'une simple colonie, est effectuée en milieu LB sur la nuit à 37 °C sous agitation (200 rpm) en présence de 50 μ g/mL d'ampicilline. Le lendemain, le milieu de culture LB est inoculé avec 1% de la pré-culture en présence des mêmes antibiotiques. La culture se fait à 37 °C et sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une DO_{600 nm} = 0.5. La culture est ensuite refroidie sous eau froide puis la surexpression de la protéine est induite avec 50 μ M d'IPTG à 16°C sur la nuit. Toutes les

étapes suivantes sont réalisées à 4 °C. Les cellules sont collectées par centrifugation avec un rotor JLA-8.1000 (Beckman Coulter, Aventi J26S XPI) à 5 000 g pendant 10 min. Elles sont ensuite resuspendues à raison de 5 ml/g de cellules humides dans du tampon de lyse D (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 5% (m/v) de cholate de sodium avec ajout d'un comprimé de Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pour 50 mL de tampon. Les cellules sont ensuite mécaniquement cassées (Branson Sonifier 450) par sonication pendant 10 min avec des cycles de 5s de sonication / 9s de repos, la sonde étant réglée sur 40% d'amplitude. Après ultracentrifugation à 190 000 g (35 000 rotor 50.2 Ti, ultracentrifugeuse Optima XPN80 Beckman Coulter) pendant 1h, le surnageant, contenant les extraits protéiques solubles, est récupéré

III.2.6.2 Colonne d'affinité Ni²⁺

La protéine fusionnée est exprimée avec une étiquette de six histidines située entre la thiorédoxine et UbiT_{PA}. Cette dernière servira pour la purifier. Le surnageant clarifié est déposé sur colonne HisTrap FF Crude column 5mL (GE Healthcare) pré-équilibré avec le tampon D (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 0,5% (m/v) de cholate de sodium. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon E (50 mM TrisHCl pH 8.5, 500 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol, 10 mM imidazole) contenant 0,5% (m/v) de cholate de sodium afin d'éliminer des protéines non spécifiques d'*E.coli* fixées sur la colonne. La protéine Trx-UbiT_{PA} est ensuite éluée par un gradient linéaire en 10 volumes de colonne de 2 à 50 % de tampon E contenant 500 mM d'imidazole. Les fractions contenant les protéines (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et concentrées.

III.2.6.3 Colonne d'exclusion stérique Superdex S200

La protéine de fusion Trx-UbiT_{PA} obtenue à l'issue de la colonne Nickel est déposée sur la colonne Superdex S200 pré-équilibré avec le tampon A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol) contenant 0,5% (m/v) de cholate de sodium. Cette étape permet de permettre d'éliminer les contaminants restants. Les fractions contenant la protéine (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et concentrées jusqu'à 25 mg/mL. La protéine de fusion Trx-UbiT_{PA} pure est aliquotée, congelée dans liquide azote et conservées à -80 °C. On obtient environ 4 mg de protéine de fusion Trx-UbiT par litre de culture.

III.2.7 UbiK d'*E. coli* (13.8 kDa)

III.2.7.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

Le plasmide pETDuet-*ubiK*, codant pour UbiK d'*E.coli* avec aucune étiquette est transformé dans les cellules compétentes BL21(DE3). Une pré-culture, à partir d'une simple

colonie, est effectuée en milieu LB sur la nuit à 37 °C sous agitation (200 rpm) en présence de 50 µg/mL d'ampicilline. Le lendemain, le milieu de culture LB est inoculé avec 1% de la pré-culture en présence des mêmes antibiotiques. La culture est réalisée à 37 °C et sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$. La surexpression de la protéine est induite avec 400 µM d'IPTG à 37°C pendant 4h. Toutes les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont collectées par centrifugation avec un rotor JLA - 8.1000 (Beckman Coulter, Aventi J26S XPI) à 5000 g pendant 10 min. Elles sont ensuite resuspendues à raison de 5 ml/g de cellules humides dans du tampon de lyse F (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl) avec ajout d'un comprimé de CompleteTM Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pour 50 mL de tampon. Les cellules sont ensuite mécaniquement cassées par sonication (Branson Sonifier 450) pendant 10 min avec des cycles de 5s de sonication / 9s de repos, la sonde étant réglée sur 40% d'amplitude. Les acides nucléiques sont précipités avec 2% (w/v) du sulfate de streptomycine. Après ultracentrifugation à 190 000 g avec un rotor 50.2 Ti (35 000 rpm, Beckman Coulter ultracentrifugeuse Optima XPN80) pendant 1h, le surnageant, contenant les extraits cellulaires protéiques solubles, est récupéré

III.2.7.2 Colonnes de dessalage

Une colonne de dessalage permet de dessaler d'échanger un tampon d'une protéine : on utilise un gel ayant une limite d'exclusion très basse qui permettra seulement de laisser pénétrer les petites molécules mais pas les macromolécules (les protéines). Avec une résine ayant un débit rapide (limite de résolution basse, qualité de résolution grossière), on peut donc rapidement recueillir le volume mort, où sont restés les macromolécules.

Les extraits solubles sont déposés sur une colonne de dessalage HiPrepTM 26 / 10 (GE healthcare) pré-équilibrée avec le tampon F (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl). Cette étape permet d'éliminer tous les sels dans les extraits et assurer que la protéine se trouve dans une solution de très basse concentration en sel. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées.

III.2.7.3 Colonne d'échange anionique

La chromatographie échangeuse d'ions permet la séparation de différentes protéines en fonction de la charge nette des protéines. La chromatographie d'échange d'anions, plus spécifiquement, utilise une résine échangeuse d'ions chargée positivement avec une affinité pour les molécules ayant des charges de surface négatives nettes, les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement. Un gradient linéaire du contre-ion (Cl^-) est utilisé. Les protéines qui sont moins étroitement liées à la résine vont éluer tout d'abord, comme le contre-ion se gêne plus facilement leur liaison

ionique de la colonne. Les protéines qui sont plus étroitement liées eluent plus tard, lorsque la concentration en contre-ion est élevée.

Les protéines issues de la colonne de désalage sont déposées sur colonne HiTrap™ Q FF pré-équilibrée avec le tampon F. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon F afin d'éliminer des protéines non liées d'*E.coli* retenues sur la colonne. La protéine UbiK est ensuite éluée par un gradient linéaire en 10 volumes de colonne de 0 à 100 % de tampon G (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl). Les fractions contenant la protéine (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées

III.2.7.4 Colonne d'exclusion stérique Superdex S200

La protéine UbiK obtenue à l'issue de la colonne d'échange anionique est déposée sur la colonne Superdex S200 pré-équilibrée avec le tampon H (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). Cette étape permet de permettre d'éliminer les contaminants restants. Les fractions contenant la protéine (confirmées par un gel SDS-PAGE) sont rassemblées et concentrées jusqu'à 25 mg/mL. La protéine UbiK pure est aliquotée, congelée dans liquide nitrogène et conservée à -80 °C.

III.2.8 Complexe UbiJ-UbiK d'*E. coli* (37.4 kDa)

La surexpression, la récupération des extraits solubles et la purification du complexe UbiJ-UbiK d'*E.coli* sont effectués en utilisant le protocole décrit dans (Loiseau, Fyfe et al. 2017). Brièvement, c'est le plasmide pETDuet-6His-UbiJ/UbiK-Stag qui est utilisé pour la surexpression. L'induction par IPTG (200 µM) se fait à $DO_{600nm} = 0.4$ et la culture se fait à 37 °C pendant 4 heures. Le tampon de lyse est le tampon H (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). Deux colonnes sont utilisées pour la purification du complexe UbiJ-UbiK : une colonne d'affinité Hitrap Chelating HP, et une colonne de gel filtration HiLoad 26/600 Superdex 200. Deux pics correspondant à deux complexes UbiJ : UbiK sont purifiés : P1 et P2. C'est le pic P2 qui est récolté, et concentré jusqu'à 25mg/ml : l'analyse SEC-MALLS et ultracentrifugation analytique pratiquée avant mon arrivée au laboratoire par M. Lombard a montré qu'il correspond à un hétérotrimère de 49 kDa consistant en un complexe UbiK-UbiJ, 2 :1. Il a un rayon hydrodynamique de 3.6 nm et est de forme allongée ($f/f_0 = 1.75$).

III.2.9 Domaine SCP2 d'UbiJ d'*E. coli* (14.7 kDa)

La surexpression et la récupération des extraits solubles du domaine SCP2 d'UbiJ (UbiJ-SCP2, 1-120) d'*E.coli* sont effectués par induction au lactose (5.8 mM) à $DO_{600nm} = 0.4$ et les cellules sont lysées dans le tampon H avec ajout d'un comprimé de Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pour 50 mL de tampon.

III.2.9.1 Purification

La protéine UbiJ-SCP2 d'*E.coli* est purifiée en utilisant le même protocole pour le complexe UbiJ-UbiK d'*E.coli*.

III.2.10 TrhP d'*E. coli* (52.3 kDa)

III.2.10.1 Surexpression et obtention des extraits solubles

La surexpression et la récupération des extraits solubles de TrhP d'*E.coli* dans les cellules BL21 Star(DE3) sont effectuées en utilisant le même protocole que celui d'UbiU, sauf que la surexpression des protéines est induite avec 500 μ M d'IPTG et les cellules sont resuspendues dans le tampon de lyse D.

III.2.10.2 Purification

La protéine TrhP d'*E.coli* est exprimée avec une étiquette de six histidines à l'extrémité N-terminal de TrhP. La protéine est purifiée en utilisant le même protocole pour le complexe UbiU-UbiV d'*E.coli*

III.2.10.3 RlhA_{his6} et his6RlhA d'*E. coli* (72.7 kDa et 75.2 kDa)

La surexpression, la récupération des extraits solubles et la purification d'RlhA d'*E. coli* sont effectuées en utilisant le même protocole que celui de TrhP d'*E. coli*, sauf que les tampons utilisés sont 50 mM phosphate de potassium pH 8 au lieu de 50 mM Tris-HCl pH 8.5.

III.3 Evaluation des cofacteurs

III.3.1 Dosage du fer

La quantification de fer dans les protéines se repose sur une méthode adaptée des travaux de Fish (Fish 1988). Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage est établie. Pour cela, une solution commerciale de nitrate ferrique $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ dans l'acide nitrique (Iron standard for AAS, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich) diluée au 36^{ème} permet d'obtenir une solution de référence à 500 μM de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ et de réaliser des standards contenant respectivement 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 nmoles de fer dans un volume final de 65 μL d' H_2O . De la même manière, différentes quantités de protéines (0.5, 1, 2 et 4 nmoles) sont mises en solution dans un volume final de 65 μL d' H_2O . L'ensemble des échantillons protéiques et des standards sont dénaturés par addition de 45 μL d'acide perchlorique 1 M pendant 15 min afin de libérer le Fe^{2+} dans la solution. Après centrifugation pendant 5 min à 10 000 rpm à température ambiante, 90 μL de solution sont prélevés auxquels sont ajoutés 72 μL de batho-phénantroline disulfonate (1.7 mg/mL), 36 μL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 μL d'acétate d'ammonium (solution saturée diluée au 1/3) : on va pouvoir obtenir un complexe de Tris-

Bathophenanthroline-Fe²⁺ absorbant dans le domaine visible ($\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$, $\epsilon = 25 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Après trente minutes d'incubation à température ambiante, la densité optique à 680 nm et à 535 nm sont mesurées et la valeur $\text{DO}_{535 \text{ nm}} - \text{DO}_{680 \text{ nm}}$ permet de déterminer la quantité de fer par monomère d'enzyme grâce à la courbe d'étalonnage.

III.3.2 Dosage de soufre

Le soufre est dosé par la méthode de Beinert (Beinert 1983). Un cristal translucide de sulfure de sodium ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $M = 240 \text{ g/mol}$) est pesé puis dissous à 20 mM dans de la soude 0,03 M. Une solution à 200 μM dans de la soude 0,03 M est obtenue à partir de cette solution mère. Des standards de 0, 1, 5, 10, 15 et 20 nmol sont préparés dans un volume final de 100 μL . De la même manière, différentes quantités de protéines, 1, 1,5, 2, 3 et 4 nmol, sont mises en solution dans un volume final de 100 μL . Le protocole consiste à dénaturer la protéine pendant trois heures par l'ajout simultané de 300 μL d'acétate de zinc 1% et de 15 μL de soude 3 M provoquant la précipitation immédiate d'hydroxyde de zinc. Après l'étape de dénaturation, les échantillons sont repris par l'ajout simultané de 75 μL de DMPD (N, N-Diéthyl-p-phénylènediamine à 1 mg/mL dans HCl 5 M) et de 16 μL de FeCl_3 (3,75 mg/mL dans HCl 1,2 M) conduisant à la formation lente de bleu de méthylène en quantité proportionnelle à la quantité de soufre initiale. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la densité optique à 670 nm et à 850 nm sont mesurées et la valeur $\text{DO}_{670 \text{ nm}} - \text{DO}_{850 \text{ nm}}$ permet de connaître la quantité de soufre par monomère d'enzyme grâce à la courbe d'étalonnage.

III.3.3 Reconstitution de centre [4Fe-4S]

III.3.3.1 Réaction de reconstitution en conditions anaérobies

Les centres [4Fe-4S] des différentes protéines étudiées sont reconstitués en boîte à gants sous atmosphère inerte ($[\text{O}_2] < 0,5 \text{ ppm}$) à température ambiante. Classiquement, une solution contenant 100 μM d'apoprotéine dans du tampon où se trouvent les protéines correspondantes est traité avec 5 mM de DTT pendant 15 min. Puis sont ajoutés 5 ou 10 équivalents de Fe(II) (Sel de Möhr : $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 5 ou 10 équivalents de L-cystéine et 1-2% équivalents molaires de cystéine désulfurase A (CsdA) d'*E. coli*. La réaction de reconstitution est suivie pendant 1h par spectroscopie UV-visible en boîte à gants grâce à des fibres optiques reliant la cellule de lecture à un spectrophotomètre UV-Visible (Cary 100, Agilent). Les centres [4Fe-4S] reconstitués par cette méthode se trouvent à l'état oxydé, ils présentent une bande d'absorbance caractéristique à 410 nm (transfert de charge S \rightarrow Fe) qui permet de visualiser leur formation. La solution est ensuite chargée sur une colonne Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), préalablement équilibrée en tampon correspondant.

Cette colonne permet d'éliminer les molécules de faible poids moléculaire (cystéine, alanine, DTT, Fe²⁺). La solution protéique de couleur brune est concentrée par centrifugation sur membrane (30 kDa Vivaspinn, Millipore). Les caractéristiques d'absorption UV-visible des protéines Fe-S constituantes les objets d'étude de ce rapport sont détaillées ci-dessous

	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$ d'apoprotéine (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$ d'holoprotéine (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\epsilon_{410 \text{ nm}}$ d'holoprotéine (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
UbiV d' <i>E. coli</i>	52.7	82.1	10
UbiU d' <i>E. coli</i>	48.2	ND	ND
Complexe UbiU- UbiV d' <i>E. coli</i>	125.9	142.4	26.2
UbiV _{PA}	52.9	75.9	13
UbiU _{PA}	43.8	ND	ND
TrhP	56.5	70.5	12.6
RlhA	108.1	N.D	N.D

Tableau 9. Coefficients d'extinction molaire des bandes d'absorbance caractéristiques de différentes protéines sous la forme apo et holo. N.D – non déterminé

III.3.3.2 Réduction chimique des protéines reconstituées.

Les centres [4Fe-4S] des holo-protéines reconstituées sont réduits par ajout de 10 équivalents de dithionite. La réaction est réalisée dans le même tampon que celui utilisé lors de la reconstitution à température ambiante. La réduction peut être suivie par spectroscopie UV-visible.

III.4 Méthodes structurales

La croissance des cristaux de plusieurs formes apo (en aérobie) ou holo (en anaérobie) des protéines a été testée par la technique de cristallisation diffusion de vapeur en gouttes assises. En aérobie, nous avons utilisé Mosquito® Crystal (TTPLabtech) comme robot de cristallisation qui permet le criblage automatisé des conditions de cristallisation en utilisant de faibles volumes d'échantillons. Les expériences de cristallisation sont suivies à l'aide de deux stéréomicroscopes dont un LEICA M205C équipé d'une caméra IC80 HD. En anaérobie, OryxNano (Douglas Instruments) est utilisé dans une boîte à gants et les expériences de cristallisations sont observées avec un stéréomicroscope LEICA M80 équipé d'une caméra IC80 HD. Les kits de criblage utilisés sont disponibles commercialement, par exemple : The Classics II Suite, the MbClass II Suite, the JCSG Core Suites (Quiagen),...

III.5 Méthodes biophysiques

III.5.1 Spectroscopie d'absorption UV-visible

La spectroscopie UV-visible est basée sur le principe d'absorption d'un photon d'une énergie définie qui permet à un électron de passer d'un état électronique fondamental S_0 à un état électronique excité S_1 . L'énergie d'une onde lumineuse dépend de sa fréquence ν et peut être calculée en multipliant la fréquence par la constante de Planck h ($E = h\nu$). Pour qu'il y ait absorption d'un photon il faut que son énergie corresponde à l'écart d'énergie qui existe entre les deux états électroniques S_0 et S_1 de l'espèce qui absorbe. Cette transition électronique peut se produire sur un atome seul, comme les transitions $d \rightarrow d$, $\pi \rightarrow \pi^*$ et $\sigma \rightarrow \sigma^*$, ou bien concerner deux atomes liés, c'est notamment le cas des transferts de charge ligand-métal et métal-ligand.

De façon générale, les molécules biologiques contenant des noyaux aromatiques, des doubles liaisons conjuguées ou des métaux de transition présentent donc des spectres d'absorption UV-visible caractéristiques.

L'absorption d'un échantillon donné permet de calculer sa concentration grâce à la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = \log(I_0/I) = \epsilon_\lambda l C$ (avec I_0 : l'intensité de l'onde incidente, I : l'intensité de l'onde en sortie, ϵ_λ : le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ , l : la longueur du trajet optique de l'échantillon et C : la concentration de l'espèce absorbante).

Dans le cas des protéines, l'absorption observée à 280 nm correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Pour les centres Fe-S, le transfert de charge du soufre vers le fer (bande LMCT ou bande de transfert de charge du ligand vers le métal dans laquelle un électron σ ou π du soufre est transféré à une orbitale du fer) provoque une absorption comprise entre 300 et 650 nm, valeur qui varie en fonction de la nature des centres Fe-S. Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique avec un spectrophotomètre Cary 100 UV - Vis (Agilent) en aérobie ou en boîte à gant sous atmosphère contrôlée d'azote.

III.5.2 Résonance paramagnétique électronique (RPE)

La RPE constitue un outil de choix pour étudier les cofacteurs redox des protéines possédant des centres métalliques ou des espèces radicalaires. Dans notre cas, elle nous permet d'accéder aux types de centre Fe-S contenus dans UbiU et UbiV et à leurs états redox.

Une entité est dite paramagnétique quand elle présente un ou plusieurs électrons non appariés. Lorsque cette entité est placée dans un champ magnétique H variable et qu'elle reçoit une onde électromagnétique d'énergie $h\nu$ et de fréquence appropriée, l'absorption de cette onde induit un phénomène de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Cette absorption est réalisée lorsque l'énergie de l'onde $h\nu = g\beta H$ correspondant exactement à l'énergie de transition entre deux états de spin de l'électron célibataire (avec g correspond au facteur de Lande soit 2.0023 pour un électron libre, β correspond au magnéton de Bohr et H le champ magnétique).

Le spectre RPE est enregistré à une fréquence ν fixe et correspond à la dérivée du signal d'absorption en fonction du champ magnétique appliqué.

Lorsque l'électron est dans une orbitale moléculaire, il présente une valeur de g différente de celle de l'électron libre, différence qui se traduit par le couplage entre le moment de spin et d'orbite.

Chapitre III
Mise en évidence d'un méga
complexe multi-protéique Ubi chez
Escherichia coli

I. Introduction

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a été en grande partie obtenu par nos collaborateurs à Grenoble (M. Hajj Chehade, F. Pierrel, L. Pelosi) et à Marseille (L. Loiseau, F. Barras) pour le travail biochimique sur le complexe Ubi et au Collège de France (M. Lombard, C. Fyfe) pour le travail structural sur UbiJ, une protéine importante pour l'assemblage du complexe Ubi. Ces études ont permis la mise en évidence pour la première fois d'un large complexe multi-protéique de biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli*.

J'ai participé à la production de protéines UbiK, UbiJ-UbiK et UbiJ-SCP2, qui ont permis de résoudre la structure du domaine SCP2 d'UbiJ (UbiJ-SCP2) et également de montrer que le complexe UbiJ-UbiK et le domaine SCP2 d'UbiJ sont capables de lier des lipides de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Cell Chemical Biology* dans laquelle je suis co-auteur (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019), et que je vais donc résumer ici.

C'est en 1979 pour la première fois que l'hypothèse de l'existence d'un complexe protéique impliqué dans la biosynthèse de l'ubiquinone a été évoquée pour la première fois chez la bactérie *E. coli* (Knoell 1979). L'auteur a cultivé une souche sauvage d'*E. coli* dans des conditions anaérobies en présence de glycérol-fumarate comme source de carbone et de 4-HB marqué (4-hydroxy [¹⁴C] benzoate). Ces conditions favorisent l'accumulation d'OPP marqué (Fig.12 chapitre I) dont il est possible de suivre la conversion en ubiquinone après exposition à l'air. La sonication du culot cellulaire suivie d'une ultracentrifugation à 40 000g du lysat a permis de séparer la fraction soluble (surnageant) de la fraction membranaire (culot). Environ 50% de l'OPP a été détecté dans le surnageant. Une chromatographie sur colonne de gel filtration de la fraction soluble a permis d'isoler une fraction de haut poids moléculaire (2 MDa environ) contenant de l'OPP marqué. L'activité de cette fraction a été testée *in vitro* par addition de la SAM et du dioxygène et a montré que le pool d'OPP marqué est converti en ubiquinone marquée. De plus, l'addition du triton X-100 inhibe la formation de l'ubiquinone ce qui indique que le complexe contenu dans cette fraction est stabilisé par des interactions hydrophobes. Malgré ce résultat très intéressant, la composition exacte des protéines constituant cette fraction active de haut poids moléculaire n'était pas connue.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les études réalisées par Catherine Clarke (UCLA, Californie, USA) depuis les années 2000 ont permis de confirmer une organisation supramoléculaire des protéines de biosynthèse du coenzyme Q dans cet organisme eucaryote (Marbois, Gin et al. 2005, Hsieh, Gin et al. 2007). Les résultats de ces études ont également été confirmés chez l'homme récemment (Stefely and Pagliarini 2017). Ainsi en 2005,

Marbois et ses collègues ont montré que Coq3, Coq4 et Coq6 de *S. cerevisiae* co-éluait à une taille de 700 kDa sur colonne de gel filtration et que Coq3 et Coq4 co-migraient à une taille supérieure à 1000 kDa sur un gel de BN-PAGE (Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en utilisant des extraits mitochondriaux solubilisés avec la digitonine (Marbois, Gin et al. 2005). Deux ans plus tard en 2007, il a été montré que Coq2 co-migrerait avec Coq3, Coq4, Coq7 et Coq9 en BN-PAGE et que Coq9 co-éluait avec Coq3, Coq4, Coq5 et Coq8 par filtration sur gel (Tran and Clarke 2007). Les auteurs ont également montré que Coq9 était co-immunoprécipité avec Coq4, Coq5, Coq6 et Coq7. Plus tard en 2015, Allan et ses collègues ont montré par des expériences de gel filtration que Coq11 co-éluait avec Coq4, Coq5 et Coq7 et que Coq11 co-immunoprécipitait avec Coq3, Coq6 et Coq9 (Allan, Awad et al. 2015).

Récemment, en microscopie à fluorescence, il a été montré chez l'homme que les protéines Coq s'assemblaient de manière dépendante du substrat dans des domaines situés au niveau de l'interface entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) (Fig. 31) (Subramanian, Jochem et al. 2019).

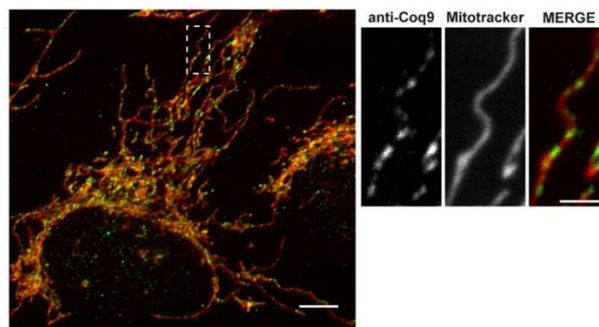


Figure 31. Microscopie confocale TIRF de cellules humaines ostéosarcomes U2OS exprimant Coq9. Mitotracker rouge pour détecter les mitochondries, et sonde Alexa Fluor 488 verte. Echelle : 10 µm dans la figure (2 µm dans le zoom). (Subramanian, Jochem et al. 2019).

En effet, les enzymes impliqués dans la modification du noyau quinone se localisent sélectivement vers de multiples domaines représentant des assemblages supramoléculaires. Ces domaines sont strictement corrélés à la production de l'ubiquinone, au flux de substrat, indiquant que des intermédiaires lipidiques de l'ubiquinone sont nécessaires pour la formation de domaines. La formation des domaines dans les cellules sont plus importantes à proximité des sites de contact réticulum endoplasmique (RE) – mitochondrie. Tous ces résultats ont permis de confirmer la présence d'un complexe protéique (ou de plusieurs sous-complexes) regroupant les protéines Coq et de proposer un modèle de répartition de ces protéines au niveau de la membrane interne mitochondriale (Fig. 32).

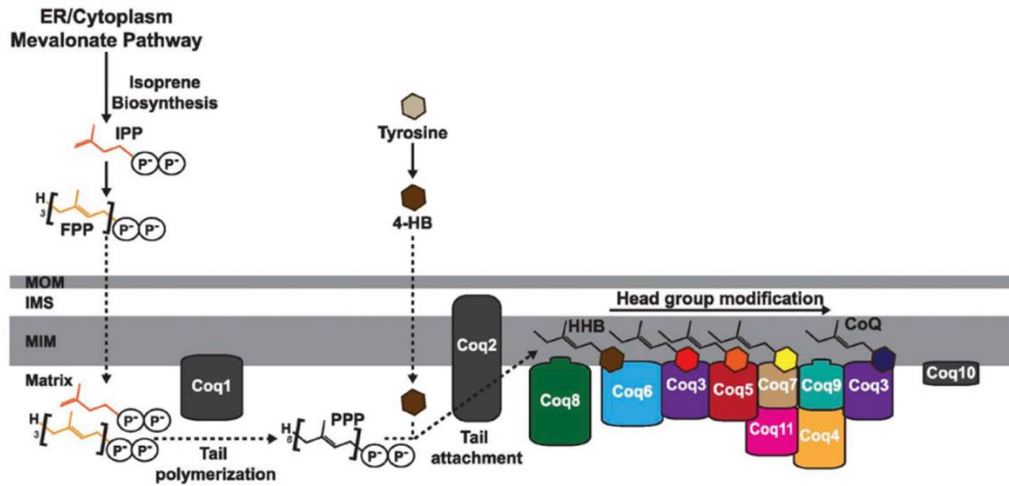


Figure 32. Modèle de complexe protéique mitochondrial proposé chez *S. cerevisiae*. La stoechiométrie représentée dans ce modèle est théorique. Les intermédiaires de biosynthèse de l'ubiquinone (molécules brunes, rouge, orange et jaune) sont présentés comme liés aux différentes protéines pour assurer la décoration du noyau aromatique. (Subramanian, Jochem et al. 2019).

Chez les mammifères, il a été montré qu'un mutant de Coq9 entraîne une perturbation étendue du complexe multi-protéique de la biosynthèse de Q₁₀ dans un modèle de souris (Lohman, Forouhar et al. 2014). Cela suggère que la stabilité des protéines Coq chez les mammifères est interdépendante tout comme la situation rencontrée chez *S. cerevisiae*. De plus la structure de Coq9 humaine a révélé un site de liaison aux lipides et des analyses par la spectrométrie de masse de la Coq9 purifiée démontrent qu'elle est associée à plusieurs espèces de lipides, dont l'ubiquinone elle-même (Lohman, Forouhar et al. 2014) (Fig. 33) ; code PDB 4RHP). Le rôle de Coq9 (qui n'a pas d'homologue chez *E. coli*) semble être limité à Coq7 puisqu'une souris dans laquelle Coq9 est partiellement inactivé accumule du DMQ9, le substrat de Coq7 (Lohman, Forouhar et al. 2014). Coq9 interagit avec Coq7 via les résidus conservés situés à la surface autour du site de liaison aux lipides, ce qui suggère que Coq9 pourrait servir à présenter le lipide lié à Coq7. Coq7, comme dit plus haut, est une métalloprotéine à centre dinucléaire de fer, qui réalise une réaction d'hydroxylation.

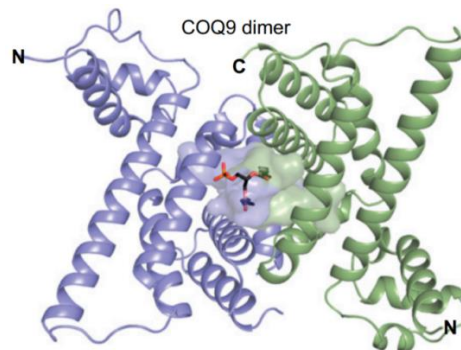


Figure 33: Structure de Coq9 humaine. Dimère de Coq9, chaque monomère est coloré en bleu et en vert, la cavité hydrophobe est soulignée et le lipide (di-palmitoyl-3-sn-phosphatidylethanolamine) co-cristallisant est montré (Lohman, Forouhar et al. 2014) (Code PDB 4RHP).

La protéine mCLK-1, l'homologue de souris de Coq7 de levure, a été étudiée par l'équipe de S. Lippard (Behan and Lippard 2010). Il s'agit de la seule enzyme de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone dont l'activité enzymatique a pu être testée *in vitro* avec un analogue de substrat ne contenant pas de chaîne terpénique, mais seulement un groupement méthyle à la place (Fig. 34).

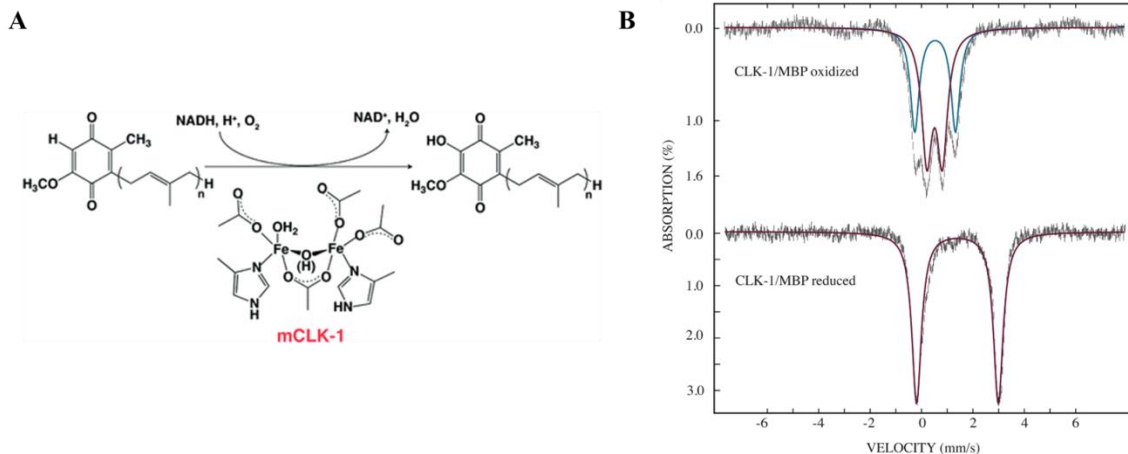


Figure 34. Etude biochimique et structurale de de Coq7 de souris, mCLK-1. (A) Site actif à fer dinucléaire avec un pont oxo-carboxylate et un pont μ -oxo/ μ -hydroxo ; mCLK-1 catalyse l'hydroxylation en C6 sur le noyau aromatique du DMQ₈. (B) Spectroscopie Mössbauer de mCLK1 oxydé et réduit enregistré à 4.2K et en champ nul. Deux espèces Fe(III)-Fe(III) sont présentes dans l'échantillon (Quadrupole splitting $\Delta E_Q = 1.59$ et 0.62 mm/s).

II. Résultats

II.1 La biosynthèse de l'ubiquinone UQ₈ se fait dans le cytosol chez *E.coli*

Etant donné qu'un test *in vitro* permettant de suivre la biosynthèse de l'ubiquinone UQ₈ n'est pas disponible actuellement, nos collaborateurs grenoblois ont développé une expérience *in vivo* qui permet d'accumuler de l'OPP marqué au sein de cellules d'*E.coli* afin de suivre sa conversion en UQ. Pour cela, ils ont cultivé des cellules $\Delta ubiC$ en l'absence d'oxygène et ajouté le précurseur marqué ¹³C₇-4HB. L'absence de dioxygène bloque la biosynthèse de l'ubiquinone (Shestopalov, Bogachev et al. 1997), et les cellules accumulent très rapidement du ¹³C₆-OPP. Après exposition à l'air, les cellules anaérobiques qui ont accumulé du ¹³C₆-OPP synthétisent alors du ¹³C₆-UQ₈. Inversement, il n'y a pas de biosynthèse de ¹³C₆-UQ₈ si les cellules restent sous atmosphère anaérobique. C'est donc bien que le dioxygène déclenche la conversion de ¹³C₆-OPP en ¹³C₆-UQ₈, ce qui est en accord avec le fait que les flavoprotéines UbiF, UbiH et UbiI ont besoin d'O₂ comme co-substrat pour réaliser leurs réactions d'hydroxylation flavine-dépendante (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013).

Ils ont ensuite lysé les cellules ayant accumulé du ¹³C₆-OPP et ont observé que des extraits totaux cellulaires incubés à l'air à 30°C synthétisaient aussi du ¹³C₆-UQ₈ et que cette biosynthèse de UQ₈ est fortement stimulée par l'ajout de S-adiénosylméthionine SAM et de

NADH, ce qui est cohérent avec ce qu'avait observé Knoell en 1979 : la SAM servirait de donneur de méthyl et le NADH de donneur d'électrons pour activer les flavoprotéines hydroxylases.

Enfin, après avoir cassé les cellules, ils ont fractionné les extraits cellulaires par ultracentrifugation à 120 000 g et testé les fractions solubles et membranaires pour leur capacité de biosynthèse de $^{13}\text{C}_6\text{-UQ}_8$ à partir de $^{13}\text{C}_6\text{-OPP}$. Comme montré dans la figure 35.A, seule la fraction soluble cytosolique est capable de synthétiser de l'UQ8.

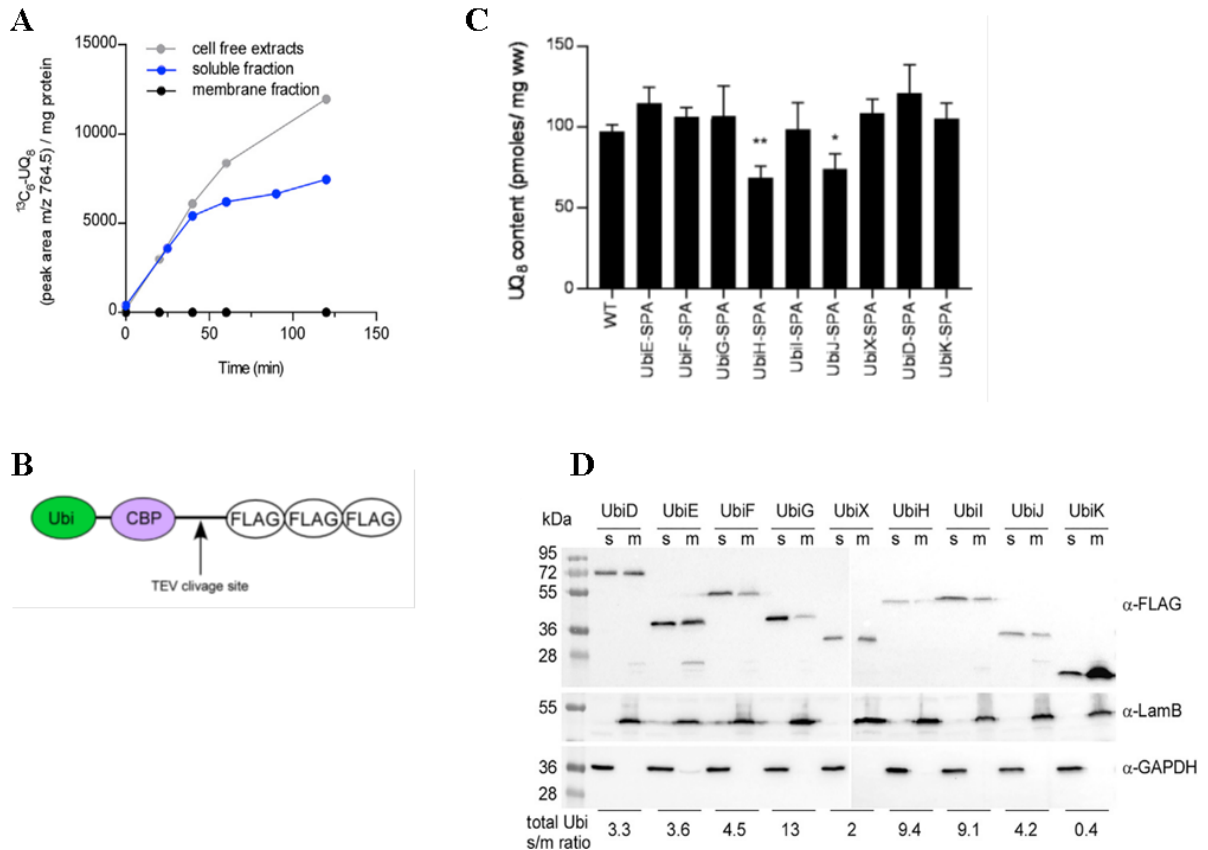


Figure 35. La biosynthèse de l'ubiquinone et les protéines Ubi se trouvent dans la fraction soluble chez *E. coli*. (A) La synthèse de $^{13}\text{C}_6\text{-UQ}_8$ à partir de $^{13}\text{C}_6\text{-OPP}$ accumulée dans les cellules $\Delta ubiC$. Les extraits totaux de cellules, les fractions membranaires et solubles ont été complétés avec du NADH et du SAM et incubés à 30 °C dans des conditions aérobie pendant le temps indiqué (B) Schéma représente les protéines Ubi avec l'étiquette SPA à leur extrémité C-ter. (CBP : Calmodulin Binding Peptide). (C) Test fonctionnel des protéines Ubi-SPA pour la biosynthèse de l'ubiquinone. (D) Immunodétection des protéines Ubi-SPA (anticorps anti-FLAG) dans les fractions solubles (s) et membranaires (m) des souches Ubi-SPA séparées par SDS-PAGE. LamB et GAPDH : contrôles de charge. Les ratios des protéines Ubi entre fraction soluble et fraction membranaire sont montrés en bas de chaque ligne du gel.

Ce test d'activité développé *in vivo* démontre bien que les 6 dernières réactions (3 hydroxylations et 3 méthylations) de biosynthèse de l'UQ8 ont lieu, de façon surprenante, dans le cytosol et non dans la membrane plasmique.

Nos collaborateurs ont alors cherché à évaluer la localisation des protéines Ubi. Pour cela, ils ont créé des souches Ubi-SPA dans lesquelles une séquence codant pour le tag SPA a

été ajouté à la partie 3' (Cter) des gènes *ubi* au sein du génome d'*E. coli* (Fig. 35B). Les protéines ainsi taggées Ubi-SPA ont été vérifiées quant à leur fonctionnalité pour la biosynthèse de l'UQ₈ et toutes les souches présentaient des taux de l'UQ₈ de 70 à 100% par rapport à la souche wild-type de *coli* ne possédant aucun tag SPA (Fig. 35C).

Après lyse des cellules, une étape d'ultracentrifugation des extraits cellulaires totaux a permis de séparer les fractions solubles et membranaires. La glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogenase (GAPDH) est soluble et la porine LamB est liée à la membrane, comme vérifié par immunodétection (Fig. 35D). Toutes les protéines Ubi-SPA testées se trouvent dans les deux fractions, solubles et membranaires (Fig. 35D). Nous avons calculé les quantités totales de chaque protéine Ubi dans les 2 fractions solubles et membranaires et les ratios présentés dans la figure 35D montrent que toutes les protéines Ubi sont localisées dans la fraction soluble cytosolique, à l'exception d'UbiK.

II.2 Un ensemble de 7 protéines Ubi forment un complexe de ~ 1 MDa

Afin de mieux caractériser ces protéines Ubi cytosoliques, nous les avons analysées par gel non-dénaturant "Blue native" (BN-PAGE), une technique qui préserve l'intégrité des complexes protéiques et qui les séparent selon leur taille et forme hydrodynamique (Wittig, Braun et al. 2006).

L'immunodétection par les anticorps anti-FLAG a révélé que les 7 protéines Ubi-SPA (UbiE, F, G, H, I, J et K) co-migraient à un poids moléculaire d'environ 1000 kDa, alors qu'UbiX et UbiD co-migraient à environ 700 kDa (Fig. 36A). Des contrôles positifs ont bien montré que la protéine GAPDH tétramérique (4 x 35.5 kDa) migrait à 140 kDa (Fig. 36A).

Nos collaborateurs ont aussi soumis les échantillons protéiques à une électrophorèse dénaturante en deuxième dimension (2D SDS-PAGE) après la première dimension BN-PAGE (1D BN-PAGE). La 2D SDSPAGE a confirmé la migration des protéines UbiE, F, G, H, I, J et K à environ 1000 kDa et celles de UbiX et UbiD à environ 700 kDa (Fig. 36B).

Afin de corroborer la co-migration de ces 7 protéines Ubi, ils ont utilisé une seconde méthode qui sépare les protéines selon leur densité au moyen de gradients de glycérol. UbiE, F, G, H, I, J et K sont alors distribués autour des fractions 11-16 de haute densité alors qu'UbiD et UbiX sont plutôt abondantes dans les fractions 9-13 intermédiaires, et que la GAPDH se trouve dans les fractions 6-10 de plus faible densité (Fig. 36C). Un gel SDS coloré à l'argent a montré que la plupart des protéines de la fraction soluble d'*E. coli* est distribué dans les fractions de faible densité (Fig. 36C).

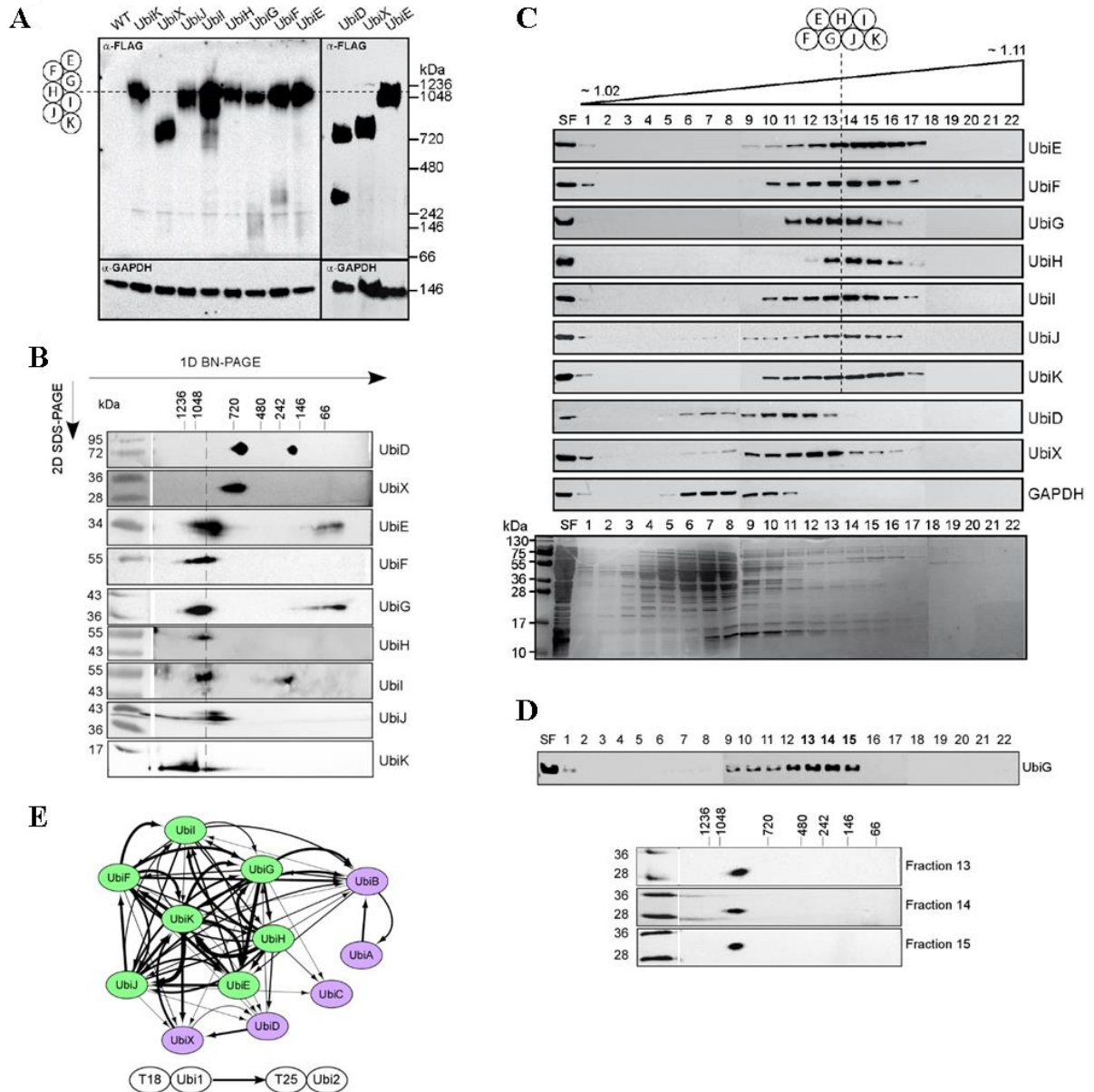


Figure 36. Sept protéines Ubi forment un complexe Ubi soluble. (A) Gel BN-PAGE et immunodétection de fractions solubles provenant des souches Ubi-SPA. La membrane a été développée avec l'anticorps anti-FLAG puis avec l'anticorps anti-GAPDH. (B) Immunodétection avec l'anticorps anti-FLAG des fractions solubles des souches Ubi-SPA après BN-PAGE 1D et SDS-PAGE 2D. (C) En haut : Gel SDS-PAGE et analyse Western blot (anticorps anti-FLAG) de fractions récupérées à partir des gradients de glycérol sur lesquelles les cytoplasmes des souches Ubi-SPA ont été déposés. Une distribution typique de GAPDH est également présente. Les fractions 1 et 22 correspondent respectivement au haut et au bas du gradient (densités 1.02 et 1.11). En bas : La coloration à l'argent des fractions de gradient analysées par SDS-PAGE montre la distribution des protéines totales. (D) En haut : La distribution d'UbiG dans toutes les fractions du gradient est indiquée. En bas : Séparation par BN-PAGE 1D et SDS-PAGE 2D des fractions 13 à 15 du gradient de glycérol contenant l'UbiG-SPA et immunodétection avec l'anticorps anti-FLAG. (E) Réseau d'interaction entre les protéines Ubi à partir des résultats des expériences bactériennes à deux hybrides.

Nos collaborateurs ont ensuite analysé par gel 2D SDS-PAGE les fractions 11, 12, et 13 du gradient de glycérol de la fraction provenant des cellules de *E. coli* modifiées UbiG-SPA et nous avons obtenu un signal pour la protéine UbiG à environ 1000 kDa (Fig. 36D). Les

expériences de BN-PAGE et de gradient de glycérol nous ont donc permis d'établir l'existence d'un « complexe protéique Ubi » de haute taille.

Afin de renforcer l'hypothèse de l'existence d'un complexe Ubi, nos collaborateurs ont réalisé des expériences de double hybride bactérien, appelé test BACTH (« Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybrid »). Il s'agit d'un test dans lequel l'activité adénylate cyclase est fonctionnelle lorsqu'il y a interaction entre deux protéines testées Ubi fusionnées chacune au domaine T18 ou T25 de l'adénylate cyclase (Karimova, Pidoux et al. 1998). Nous avons testé toutes les combinaisons d'interaction des différentes protéines Ubi, deux à deux, et nous avons obtenu un diagramme d'interaction dans lequel les 7 protéines Ubi mentionnées plus haut (Ubi E, F, G, H, I, J et K) présentent tout un réseau d'interactions robustes entre elles tandis que les autres (UbiX, D, C A et B) semblent moins connectés et semblent former une entité séparée (Fig. 36E).

Ensuite, nos collaborateurs ont réussi à isoler le complexe Ubi, une tâche très ardue, et qui a consommé une bonne partie de la thèse de Mahmoud Hajj Chehade. Cet isolement, ou purification partielle a été réalisé en utilisant une purification séquentielle par affinité une procédure en deux étapes utilisant dans un premier temps le flag SPA porté en Cter des protéines, puis dans un second temps le domaine CBP (Calmodulin Binding Peptide) (Babu, Butland et al. 2009). Nous avons travaillé à partir d'extraits solubles de cellules d'*E. coli* exprimant UbiE-SPA et à partir d'extraits de cellules WT d'*E. coli*, comme contrôle. Nous avons ainsi observé par immunodétection le complexe Ubi à environ 1000 kDa, en 2D SDS PAGE après les 2 étapes de purification dans les souches UbiE-SPA (Fig. 37A). Ce signal est similaire à celui que l'on avait observé précédemment dans l'analyse 2D SDS PAGE des fractions solubles sans aucune étape de purification (Fig. 36B). De façon similaire, nous avons isolé et purifié partiellement le complexe Ubi dans des cellules exprimant UbiI-SPA et UbiG-SPA, et après les 2 étapes de purification, nous avons observé par coloration à l'argent des bandes protéiques qui sont communes aux 3 échantillons (UbiE-SPA, UbiI-SPA et UbiG-SPA). Ces échantillons ont été soumis à une analyse protéomique par spectrométrie de masse, et nous avons observé que plusieurs protéines co-élueraient avec les protéines Ubi (Fig. 37B). On retrouve toujours 8 protéines dans ces 3 échantillons, dont 7 sont des protéines Ubi : UbiE, F, G, H, I, J et K ainsi que la 8^{ème}, la lipoprotéine Blc, dont la fonction physiologique est mal connue (Campanacci, Bishop et al. 2006). Nos collaborateurs ont mesuré le taux de l'UQ₈ d'une souche Δblc qui est comparable à celui d'une souche WT, excluant le fait que la protéine Blc participe à la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli*. Le diagramme de Venn

présenté (Fig. 37C) montre l'enrichissement des différents extraits solubles purifiés dans les 8 protéines rencontrées. On note qu'UbiE est la plus abondante.

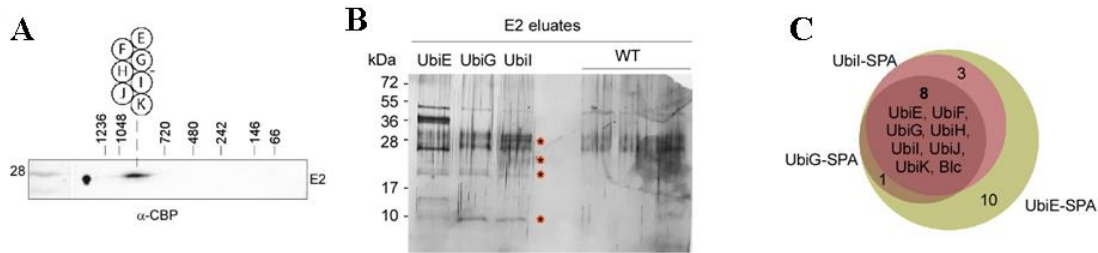


Figure 37. Purification du complexe Ubi. (A) Immunodétection avec l'anticorps anti-CBP du complexe Ubi purifié après BN-PAGE 1D et SDS-PAGE 2D. (B) Coloration à l'argent du gel SDS-PAGE des fractions purifiées provenant des échantillons Ubi-SPA et de témoins WT. Les astérisques marquent les bandes communes aux échantillons Ubi-SPA et absentes de WT. (C) Diagramme de Venn indiquant l'enrichissement des différents extraits solubles purifiés dans les huit protéines rencontrées. Les noms des huit protéines enrichies avec les trois protéines Ubi marquées sont indiqués.

De ces expériences, nous concluons donc que la biosynthèse de l'ubiquinone qui a lieu dans la fraction cytosolique est réalisée par le complexe Ubi, qui contient 5 enzymes d'hydroxylation et de méthylation (UbiF, H, I, G et E) nécessaires pour convertir l'OPP en UQ₈, ainsi que 2 protéines non enzymatiques, appelées chaperonnes ou protéines accessoires, UbiJ et UbiK. Ces 7 protéines forment un complexe de 1M Da.

II.3 Le complexe multi-protéique Ubi contient des intermédiaires de biosynthèse de l'ubiquinone UbiV

En utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique et à la spectrométrie de masse (HPLC-ECD-MS), nos collaborateurs ont analysé la distribution des quinones isoprénoïdes dans des cellules d'*E.coli* en phase de croissance exponentielle, et nous avons observé que les intermédiaires de la biosynthèse de UQ₈ tels que l'OPP (substrat de UbiI) et le DMQ₈ (substrat de UbiF) s'accumulent principalement dans la fraction cytosolique, alors que la molécule d'UQ₈ se trouve très majoritairement dans la fraction membranaire, qui est d'ailleurs son lieu d'action (Fig. 38A).

L'analyse en western blot et en contenu en quinones des fractions cytosoliques de cellules exprimant UbiH-SPA a montré que l'OPP et le DMQ₈ était enrichi dans les fractions qui contiennent le complexe Ubi de 1 MDa (Fig. 38B). A l'inverse, UQ₈ est distribué à peu près uniformément au cours du gradient.

L'ensemble de ces résultats montre bien que les intermédiaires hydrophobiques de biosynthèse de l'ubiquinone qui sont l'OPP et le DMQ₈ sont localisés de façon significative dans la fraction cytosolique et co-éluent avec le complexe Ubi trouvé à environ 1 MDa.

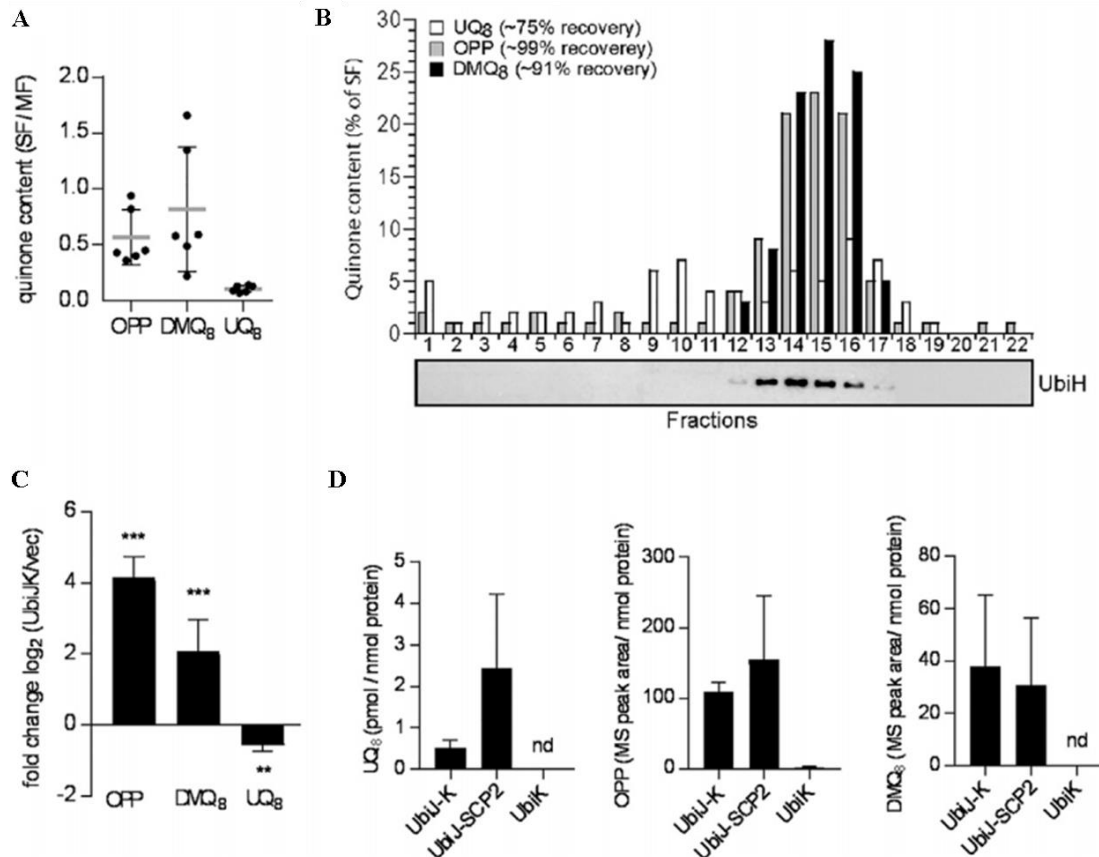


Figure 38. Le domaine SCP2 d'UbiJ lie UQ₈ et ses intermédiaires de biosynthèse dans le complexe Ubi. (A) Rapport de l'abondance des lipides octaprényliques dans la fraction soluble (SF, 150.000 g de surnageant) et de la fraction membranaire (MF) de cellules WT cultivées dans du milieu LB. (B) En haut : Analyse par gradient de glycérol des extraits solubles de cellules UbiH-SPA et quantification de la quinone isoprényle dans chaque fraction par HPLC-ECD-MS. En bas : Le western-blot montrant la position de UbiH dans le gradient est le même que sur la figure 36C. (C) Niveaux de l'OPP, de la DMQ₈ et de l'UQ₈ dans les cellules surexprimant ou non UbiJ-K. (D) Abondance des quinones isoprényles dans les protéines purifiées indiquées.

Ensuite, nous avons cherché à savoir quelles étaient les protéines Ubi qui liaient ces intermédiaires hydrophobes. Une étude récente que notre consortium a publié avait montré qu'un complexe UbiJ-UbiK était capable de lier l'acide palmitoléique (voir intro et (Loiseau, Fyfe et al. 2017)), un des plus abondants acide gras d'*E. coli*. On observe que la surexpression d'UbiJ-UbiK entraîne une diminution du taux de l'UQ₈ par rapport à une souche WT, ainsi qu'une accumulation d'OPP et de DMQ₈, ce qui suggère une séquestration potentielle de ces intermédiaires hydrophobes biosynthétiques dans le complexe UbiJ-UbiK (Fig. 38C).

Afin de savoir si d'UbiJ ou d'UbiK lie les intermédiaires de biosynthèse de l'UQ₈, j'ai purifié séparément la protéine seule UbiK, le complexe UbiJ-UbiK et le domaine SCP2 de UbiJ, la protéine UbiJ entière étant très peu soluble. Et nos collaborateurs ont ensuite dosés les quinones dans ces trois échantillons protéiques. Le complexe UbiJ-K contient un peu de UQ₈ (<1 pmole/nmole de protéine), et aussi de l'OPP et du DMQ₈. Le domaine SCP2 d'UbiJ

contient également de l'UQ₈ (environ 3 pmoles/nmole de protéine, soit 0.3%), de l'OPP et du DMQ₈, mais la protéine UbiK ne contient aucune de ces 3 quinones isoprényles. Le faible taux de l'UQ₈ dans le complexe UbiJ-UbiK ainsi que dans le domaine SCP2 d'UbiJ peut s'expliquer par la forte surexpression de ces protéines dans nos systèmes d'expression, et par les différentes étapes de chromatographie pour les purifier, qui peuvent aboutir à des pertes de lipides.

L'ensemble de ces résultats démontrent clairement que le domaine SCP2 d'UbiJ, et non la protéine UbiK, est responsable de la liaison de l'UQ₈ et des intermédiaires de synthèse OPP et DMQ₈.

II.4 Structure du domaine SCP2 de UbiJ liant les lipides isoprényles

Le domaine SCP2 de UbiJ purifié se comporte comme un dimère en solution et cristallise dans le groupe P212121 (C. Fyfe). Des petits cristaux en forme de bâtons (« rod-like ») poussent sur la nuit à 19 °C en goutte assise, avec un réservoir contenant 11% PEG 8000, 225 mM chlorure de calcium, et 100 mM MMT pH 9 (DL-Malic acid/MES/Tris base, ratio 1/2/2), pH 6.5. UbiJ-SCP2 était à 15 mg/ml. Tous les cristaux sont cryoprotégés par trempage dans une solution contenant 20% de PEG 400 avant d'être congelés. La résolution de diffraction de ces cristaux était de 2.5 Å (code PDB 6H6P).

L'absence de « template » protéique avec une identité de séquence suffisamment élevée nous empêchant de faire du remplacement moléculaire, nous avons cherché à avoir une meilleure résolution pour réaliser un phasage avec des métaux lourds et ainsi faire du SAD (« Single-wavelength Anomalous Dispersion »). Pour cela, nous avons réalisé des expériences de « seeding » (ou ensemencement) avec les petits cristaux en forme de tige obtenus précédemment. Cela a conduit à l'apparition, au bout de quelques semaines, à des cristaux plus gros, cubiques, et qui ont diffracté à 1.7 Å (code PDB 6H6O). Ces cristaux natifs ont alors été utilisés pour des expériences de dérivation avec des composés comportant des atomes lourds. Parmi tous ceux testés (Au, Pt), seuls le polyvalan crystallophore N°1 (un complexe de Tb) a permis d'obtenir des cristaux diffractant à 2 Å et présentant un signal de diffusion anormal permettant le phasage des données et la résolution de structure (code PDB 6H6N). Les données ont été recueillies sur la ligne Proxima 1 de Soleil avec l'aide de L. Ciccone et de P. Legrand.

La structure présentée dans la Fig. 39 a est celle d'un dimère générée à partir du modèle à 1.7 Å. La protéine présente un fold de type / avec 5 hélices et 5 feuillets formant une cavité hydrophobe centrale avec une cavité ouverte (Fig. 39B en jaune). Les murs de cette cavité sont tapissés de résidus hydrophobes fournis par les chaînes latérales des hélices et

des feuillettes (Fig. 39C et 39D). Ces résidus hydrophobes sont très conservés au sein des séquences d'UbiJ de différents organismes. La structure générale d'UbiJ, de même que la présence d'une cavité hydrophobe est son sein, rappelle fortement certaines structures de protéines de la famille SCP2. Cela suggère que l'absence de la partie C-terminale (121-201) d'UbiJ ne perturbe pas le repliement du domaine Nter SCP2 (1-120). Plusieurs protéines SCP2 ont montré des lipides dans leur cavité : acide palmitique ou Triton.

Bien que le modèle présenté ici ne contienne pas de ligand, nous avons pu noter la présence de densité électronique supplémentaire dans la cavité (Fig. 39C). Il est tentant de suggérer alors que cette densité inexplicitée est reliée aux différents lipides détectés en faible quantité dans les protéines purifiées qui ont servi à faire les cristaux, et que cette cavité sert donc à accueillir les intermédiaires de biosynthèse de l'ubiquinone.

Ce qui vient encore étayer cette hypothèse c'est la forme que prend la cavité et qui pourrait correspondre à la conformation adoptée par la molécule de l'UQ₈ dans le complexe photosynthétique LH1-RC, code PDB 5Y5S (Fig. 39E).

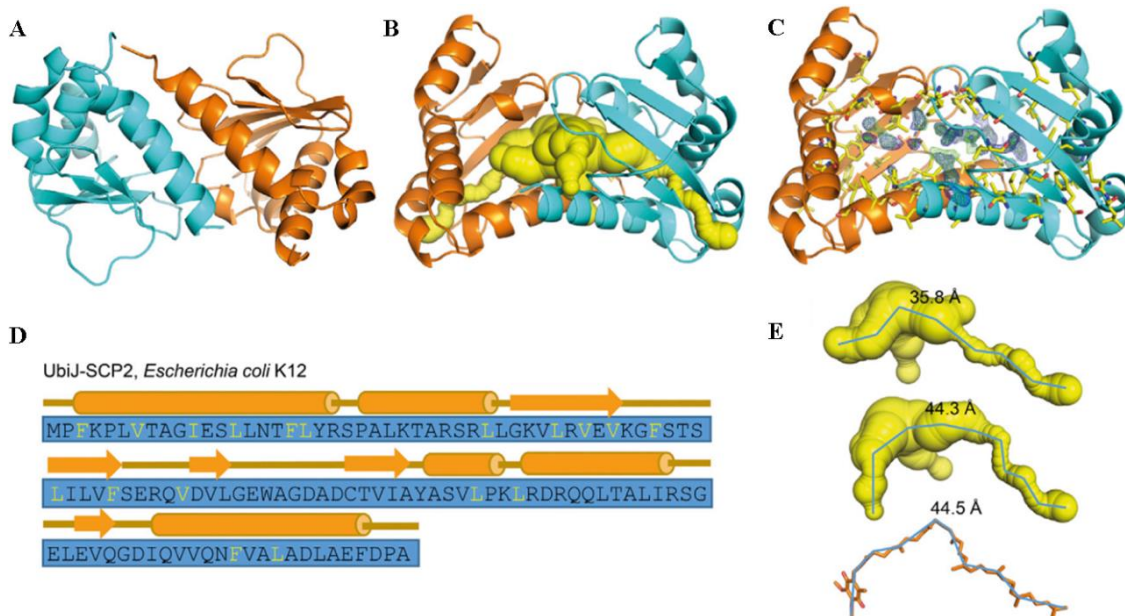


Figure 39. Structure du domaine SCP2 d'UbiJ à une résolution de 1,7 Å. (A) UbiJ-SCP2 comporte sous forme de dimère dans l'unité asymétrique, les monomères présentent un fold de type α/β avec 5 hélices α et 5 feuillettes β similaires aux protéines de la famille SCP2 (chaîne A en orange, chaîne B en cyan). **(B)** Les sphères jaunes représentent la cavité trouvée dans UbiJ-SCP2. **(C)** Modèle de la zone de la cavité d'UbiJ-SCP2 avec les résidus hydrophobes bordant la cavité mis en évidence en jaune et montrant une densité électronique non modulée. **(D)** Séquence d'UbiJ-SCP2 d'*E. coli*. Les résidus hydrophobes qui s'interfont avec la poche de la cavité sont indiqués en jaune et les cylindres représentent les hélices α , les flèches pour les feuillettes β . **(E)** Cavités hydrophobes dans la chaîne A (en haut), dans la chaîne B (au centre) et l'UQ₈ (en bas, extraites à partir du code PDB: 5Y5S) et leurs longueurs respectives.

II.5 Rôle essentiel de UbiJ dans la stabilisation du complexe Ubi

Notre caractérisation structurale d'UbiJ comme une protéine liant des lipides nous a conduit à évaluer comment se fait la liaison de l'OPP, intermédiaire précoce de l'ubiquinone, dans des cellules $\Delta ubiJ$, qui ne possèdent donc pas UbiJ. Le but étant ici de mieux cerner le rôle d'UbiJ dans le complexe Ubi.

Des travaux antérieurs à ma thèse, réalisés par nos collaborateurs grenoblois et marseillais, avaient déjà montré que les cellules $\Delta ubiJ$ voyaient une diminution drastique de la production de l'UQ₈ et une accumulation de l'OPP (Aussel, Loiseau et al. 2014).

Les extraits cytosoliques de cellules $\Delta ubiJ$ produisant UbiG-SPA ont été analysés sur gradient de glycérol et montrent un profil de distribution de la protéine UbiG dans les fractions de basse densité (fractions 2-10) (Fig. 40A), alors que les protéines Ubi sont dans les fractions de haute densité (11-16) dans les cellules WT (Fig. 38B). Des résultats similaires sont obtenus avec des cellules exprimant UbiH-SPA ou UbiF-SPA. De plus les analyses BN-PAGE et 2D-SDS PAGE révèlent l'absence du méga complexe Ubi de 1 MDa dans les cellules $\Delta ubiJ$ (Fig. 40B-D). À l'inverse ce large complexe est toujours présent dans les cellules $\Delta ubiE$, $\Delta ubiF$, $\Delta ubiG$ (Fig. 40B et 40C) ou $\Delta ubiK$ (Fig. 40E).

L'ensemble de ces résultats indique clairement le rôle structural de UbiJ pour la stabilité du complexe et permet d'expliquer pourquoi dans des cellules $\Delta ubiJ$, l'OPP s'accumule et ne permet pas d'aboutir à la biosynthèse de l'UQ₈.

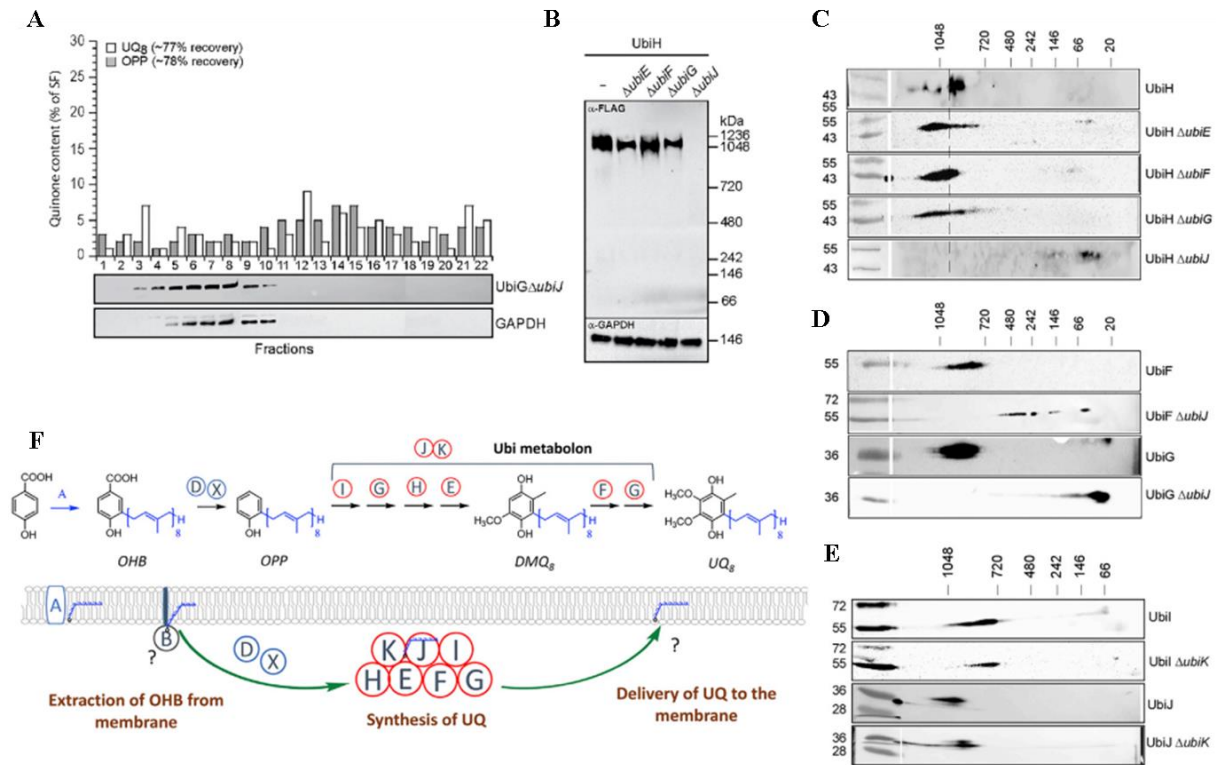


Figure 40. UbiJ est essentiel à la stabilité du complexe Ubi. (A) Analyse par gradient de glyc érol des extraits solubles des cellules Δ ubiJ produisant UbiG-SPA et quantification de l'UQ₈ et de l'OPP dans chaque fraction. Les Western-blots montrent la distribution d'UbiG-SPA et de la protéine contrôle GAPDH. (B-C) Immunodétection avec l'anticorps anti-FLAG des fractions solubles de la souche UbiH-SPA portant la délétion des gènes *ubi* indiqués après analyse par gel BN-PAGE (B) ou par gel BN-PAGE 1D et SDS-PAGE 2D (B). (D-E) Immunodétection avec l'anticorps anti-FLAG de fractions solubles de la souche Δ ubiJ (D) ou Δ ubiK (E) produisant Ubi-SPA indiquée après BN-PAGE 1D et SDS-PAGE 2D. (F) Voie de biosynthèse de l'UQ₈ (en haut) et modèle proposé d'organisation physique des protéines Ubi et des intermédiaires préylés de l'UQ₈ par rapport à la membrane interne (en bas). UbiA liée à la membrane préylate 4-HB pour donner OHB qui se localise dans la bicouche lipidique. UbiB facilite l'extraction de l'OHB de la membrane et l'OHB est ensuite décarboxylé en OPP par UbiD-X. L'OPP est liée par UbiJ dans le complexe Ubi et le métabolite formé par les sept protéines Ubi encerclées en rouge synthétise l'UQ₈, qui est finalement délivré à la membrane, où elle réalise ses fonctions physiologiques.

III. Conclusion

Nous avons montré avec ces travaux que le complexe Ubi contient 7 protéines :

- 5 enzymes (UbiI, G, H, E et F) qui catalysent les 6 dernières étapes de biosynthèse de l'UQ₈ à partir de l'OPP
- 2 protéines scaffold ou accessoires : UbiJ et UbiK, qui participent à la stabilité du complexe.

Nous avons également montré que :

- Ces 6 dernières étapes biosynthétiques de l'UQ₈ se déroulent dans la fraction cytosolique, et non au niveau de la membrane.

- des intermédiaires de synthèse, tels que l'OPP et la DMQ₈, s'accumulent dans le complexe Ubi soluble tel que nous l'avons isolé. On trouve en revanche assez peu de l'UQ₈ dans ce complexe.
- le domaine SCP2 d'UbiJ a une structure présentant une cavité hydrophobe pouvant accueillir des lipides, et potentiellement tous les intermédiaires de biosynthèse de l'UQ₈.
- La protéine UbiJ est une protéine centrale pour la stabilisation du méga complexe Ubi qui se trouve dans la fraction cytosolique.

Ainsi, nous pouvons proposer un modèle pour le complexe Ubi dans lequel les intermédiaires de biosynthèse de l'UQ₈ qui se trouvent en amont de l'OPP ne sont pas associés aux lipides membranaires mais à UbiJ au niveau du cytosol dans le large complexe Ubi (Fig. 40F). Dans ce modèle l'extrusion de l'OPP de la membrane plasmique pourrait être médiée par UbiB. En effet, récemment Coq8, l'homologue eucaryote d'UbiB, a été postulé comme étant capable de coupler l'hydrolyse de l'ATP à l'extrusion des têtes polaires d'intermédiaires de l'UQ₈ hors de la membrane. Il est intéressant de noter que UbiB contient un segment transmembranaire et une partie soluble et que cette protéine ne fait pas partie du complexe Ubi.

Les résultats obtenus permettent ainsi d'établir clairement l'existence d'un métabolon stable pour la biosynthèse de l'ubiquinone. Le terme métabolon désigne l'association d'enzymes qui agissent séquentiellement dans une voie métabolique.

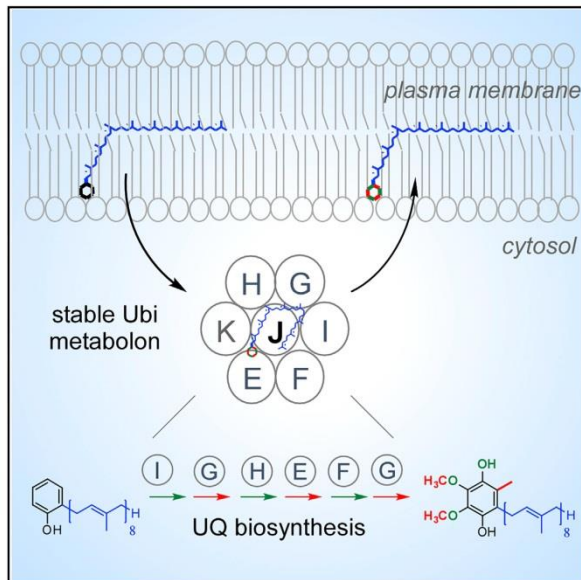
Beaucoup de métabolons sont très dynamiques et donc difficiles à purifier, comme c'est le cas du purinosome qui réalise la biosynthèse *de novo* de purine. Chez l'homme, ce complexe est composé de 6 enzymes (transférases, lyase, ligase, carboxylyase, hydrolase) qui catalysent la conversion du phosphoribosyl pyrophosphate en inosine monophosphate. Et même si une forme de «substrate channeling» a pu être montré entre des enzymes du complexe, l'isolement du complexe n'a, jusqu'à ce jour, pas pu être obtenu.

D'un autre côté, quelques métabolons ont tout de même pu être isolés, comme le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC), un complexe de 3 protéines (E1, E2, E3) qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA. Ce complexe PDC a été étudié en microscopie électronique au début des années 2000. Il fait environ 7 MDa et comprend 22 copies de la pyruvate déshydrogénase (E1), 6 copies de la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3), qui est elle-même associée à 60 copies de la dihydrolipoamide acétyltransférase (E2) qui forme le noyau structural central.

Cell Chemical Biology

A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid Ubiquinone

Graphical Abstract



Authors

Mahmoud Hajj Chehade,
Ludovic Pelosi,
Cameron David Fyfe, ...,
Frédéric Barras, Murielle Lombard,
Fabien Pierrel

Correspondence

fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr

In Brief

Hydrophobic compounds are often synthesized in association with cellular membranes. Hajj Chehade et al. identify an unusually stable metabolon that synthesizes the lipid ubiquinone in the cytosol. The metabolon regroups five Ubi enzymes, UbiK, and the lipid-binding UbiJ protein that shields the hydrophobic biosynthetic intermediates from the hydrophilic environment.

Highlights

- Seven Ubi proteins form a 1-MDa soluble Ubi complex in *Escherichia coli*
- The Ubi complex is a stable metabolon that catalyzes six sequential reactions
- Ubiquinone, an extremely hydrophobic molecule, is synthesized in the soluble fraction
- The SCP2 domain of UbiJ binds ubiquinone intermediates inside the Ubi complex

A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid Ubiquinone

Mahmoud Hajj Chehade,¹ Ludovic Pelosi,¹ Cameron David Fyfe,² Laurent Loiseau,³ Bérengère Rascalou,¹ Sabine Brugière,⁴ Katayoun Kazemzadeh,¹ Chau-Duy-Tam Vo,² Lidia Ciccone,⁵ Laurent Aussel,³ Yohann Couté,⁴ Marc Fontecave,² Frédéric Barras,^{3,6} Murielle Lombard,² and Fabien Pierrel^{1,7,*}

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC-IMAG, 38000 Grenoble, France

²Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 8229, PSL Research University, 11 Place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France

³Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire Chimie Bactérienne, Institut Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, Marseille 13009, France

⁴Univ. Grenoble Alpes, CEA, Inserm, BIG-BGE, 38000 Grenoble, France

⁵SOLEIL Synchrotron, L'Orme des Merisiers, 91198 Gif-sur-Yvette, France

⁶SAMe Unit, Département de Microbiologie, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

⁷Lead Contact

*Correspondence: fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr

<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>

SUMMARY

Ubiquinone (UQ) is a polyprenylated lipid that is conserved from bacteria to humans and is crucial to cellular respiration. How the cell orchestrates the efficient synthesis of UQ, which involves the modification of extremely hydrophobic substrates by multiple sequential enzymes, remains an unresolved issue. Here, we demonstrate that seven Ubi proteins form the Ubi complex, a stable metabolon that catalyzes the last six reactions of the UQ biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. The SCP2 domain of UbiJ forms an extended hydrophobic cavity that binds UQ intermediates inside the 1-MDa Ubi complex. We purify the Ubi complex from cytoplasmic extracts and demonstrate that UQ biosynthesis occurs in this fraction, challenging the current thinking of a membrane-associated biosynthetic process. Collectively, our results document a rare case of stable metabolon and highlight how the supramolecular organization of soluble enzymes allows the modification of hydrophobic substrates in a hydrophilic environment.

INTRODUCTION

Isoprenoid quinones are widespread in the three domains of life and represent a peculiar group of lipids able to undergo a two-step reversible redox process (Nowicka and Kruk, 2010). The electron transfer properties of isoprenoid quinones are essential to the function of respiratory chains that generate cellular ATP (Schoepp-Cothenet et al., 2013). Isoprenoid quinones also mediate disulfide bond formation in proteins (Bader et al., 2000), participate to virulence and antibiotic resistance in bacteria (Aussel et al., 2014b), and function as membrane-soluble antioxidants (Bentinger et al., 2010; Nowicka and Kruk, 2010). The

main isoprenoid quinones are menaquinone (MK) and ubiquinone (UQ), which is also called coenzyme Q in eukaryotes. MK and UQ share the same polyisoprenoid tail but differ by the structure of the redox-active head group, naphthalene ring and benzene ring, respectively (Figure S1A). The polyisoprenoid tail varies in length between organisms (UQ₆ in *Saccharomyces cerevisiae*, UQ₈ in *Escherichia coli*, and UQ₁₀ in humans) and confers extremely hydrophobic properties to isoprenoid quinones, which localize consequently in cellular membranes (Kawamukai, 2018; Nowicka and Kruk, 2010).

In the UQ biosynthesis pathway, the polyisoprenoid tail is added at an early step by an integral membrane polyprenyltransferase called UbiA in *E. coli* (Figure 1A). Subsequently, seven consecutive chemical reactions modify the head group to yield UQ (Figure 1A). Hydrophobic polyprenylated intermediates of the UQ biosynthetic pathway are predicted to be embedded within the lipid bilayer (Stefely and Pagliarini, 2017), with the head groups near the glycerol backbone of the membrane phospholipids, and the isoprenoid tail inserted between their acyl chains (Galassi and Arantes, 2015; Hoyo et al., 2017; Wollstein et al., 2015). In contrast, the decarboxylase, methyltransferases and hydroxylases of the UQ biosynthetic pathway contain no transmembrane domains and are predicted to be soluble. Thus, how UQ biosynthetic enzymes overcome the biophysical barrier that separates them from their lipophilic substrates constitutes an unresolved issue.

Besides the Ubi enzymes that catalyze the chemical reactions of the pathway (Figure 1A), three Ubi proteins of unknown function are also required for efficient UQ biosynthesis, UbiB (Poon et al., 2000), UbiJ (Aussel et al., 2014a), and UbiK (Loiseau et al., 2017). Lately, we demonstrated that purified UbiJ and UbiK form a 1:2 heterocomplex that binds palmitoleic acid, one of *E. coli*'s most abundant fatty acids (Loiseau et al., 2017). This capacity to bind lipids suggested that UbiJ and UbiK may act as accessory factors of Ubi enzymes, but the role of these two proteins and of UbiB, although central for UQ biosynthesis, is still undefined (Bayly and Yadav, 2017; Loiseau et al., 2017; Reidenbach et al., 2018).

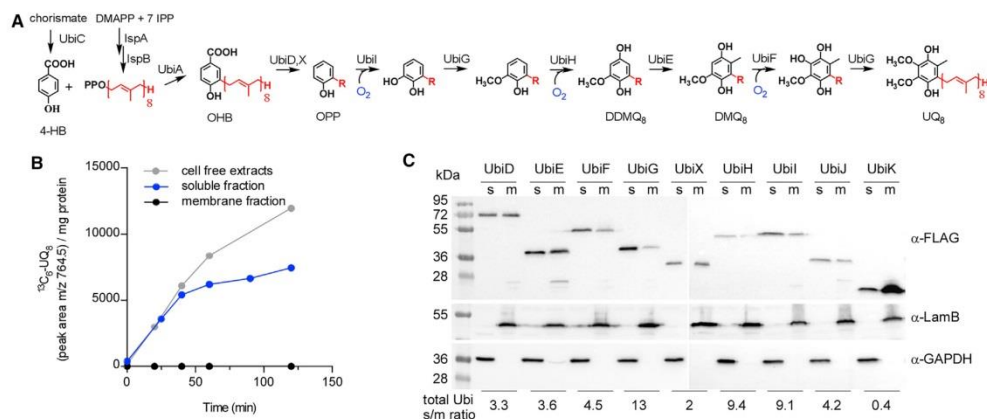


Figure 1. UQ Biosynthesis Activity and Ubi Proteins Localize in the Soluble Fraction of *E. coli* Extracts

(A) UQ biosynthesis pathway in *E. coli*. The octaprenyl tail is represented by R on the biosynthetic intermediates. DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; IPP, isopentenyl pyrophosphate; 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid; OPP, 3-hydroxyoctaprenyl pyrophosphate; UbiD, UbiE, UbiF, UbiG, UbiH, UbiI, UbiJ, UbiK, ubiquinone synthase; UbiX, UbiY, UbiZ, ubiquinol synthase.

(B) Synthesis of ¹³C₆-UQ₈ from ¹³C₆-OPP accumulated in $\Delta ubiC$ cells. Cell-free extracts, membrane and soluble fractions (resulting from 150,000×g ultracentrifugation) were supplemented with NADH and SAM and incubated at 30°C in aerobic conditions for the indicated time. The area of the ¹³C-UQ₈ peak (m/z 764.5 at a retention time of 8 min, see Figure S1E) was normalized for the protein content of the fractions assayed. Results representative of three independent experiments.

(C) Immunodetection of Ubi-SPA proteins (α -FLAG antibody) in soluble (s) and membrane (m) fractions of Ubi-SPA-tagged strains (30 μ g of total proteins) separated by SDS-PAGE. LamB and GAPDH are detected as controls. The ratio of the total content of each Ubi protein in entire soluble and membrane fractions is shown at the bottom (see Method Details).

See also Figure S1.

Together, UQ biosynthesis raises generic questions about how enzymes deal with extremely hydrophobic substrates and how cells orchestrate multistep biosynthetic pathways. To address these fundamental questions, we have studied the subcellular localization and the structural organization of the UQ pathway in the bacterium *E. coli*. Here, we show that five Ubi enzymes and the accessory factors UbiJ-UbiK form a ~1,000 kDa Ubi complex that resides in the cytosolic fraction. We demonstrate that UbiJ binds hydrophobic UQ biosynthetic intermediates and is also the keystone of the Ubi complex. Our work describes the Ubi complex as a unique microreactor, which enables the multistep biosynthesis of a complex lipid in a hydrophilic cellular environment.

RESULTS

UQ Biosynthesis Takes Place in the Soluble Fraction of *E. coli* Lysates

An assay to monitor UQ biosynthesis *in vitro* is not available (Stefely and Pagliarini, 2017). We designed an *in vivo* experimental approach to accumulate a labeled version of OPP within cells and to monitor its conversion into labeled UQ. We transferred $\Delta ubiC$ cells pretreated with chloramphenicol in an O₂-free atmosphere and added the labeled precursor ¹³C₇-4HB. The absence of dioxygen blocked UQ biosynthesis (Shestopalov et al., 1997), and the cells quickly accumulated ¹³C₆-OPP (Figure S1B). Upon exposure to air, cells preloaded

anaerobically with ¹³C₆-OPP synthesized ¹³C₆-UQ₈ (Figure S1C). Conversely, we observed no ¹³C₆-UQ₈ synthesis in cells maintained under an argon atmosphere (Figure S1C). Thus, dioxygen triggered the *in vivo* conversion of ¹³C₆-OPP into ¹³C₆-UQ₈ in our experimental setup, in agreement with the hydroxylases UbiF, H, and UbiI requiring O₂ as a cosubstrate (Alexander and Young, 1978; Hajj Chehade et al., 2013) (Figure 1A).

Next, we lysed cells loaded with ¹³C₆-OPP and found that total cell-free extracts incubated under air at 30°C also synthesized ¹³C₆-UQ₈ (Figure S1D). The biosynthesis of UQ₈ was strongly stimulated by the addition of S-adenosylmethionine and NADH (Figure S1D), which act, respectively, as the methyl-donor for the methylation reactions and as the electron-donor for the hydroxylases (Knoell, 1979b). Finally, we fractionated the cell-free extracts by ultracentrifugation and assayed the cytoplasmic and membrane fractions for UQ biosynthesis. Only the cytoplasmic fraction produced ¹³C₆-UQ₈ upon exposure to air (Figures 1B and S1E). The initial rates were comparable between the soluble fraction and cell-free extracts (Figure 1B). However, increased ¹³C₆-UQ₈ synthesis was observed at later stages in cell-free extracts (Figure 1B), potentially reflecting limiting amounts of the ¹³C₆-OPP substrate in the soluble fraction. In conclusion, we developed an activity assay that strongly supports the idea that the last six reactions of the UQ biosynthetic pathway take place in the cytosol.

Ubi Proteins Are Found Predominantly in the Soluble Fraction of *E. coli* Lysates

The presence of UQ biosynthesis activity in the cytoplasmic fraction prompted us to evaluate the distribution of Ubi proteins. We created several Ubi-SPA strains by inserting a sequence coding for the SPA tag at the 3' end of *ubi* genes in the *E. coli* chromosome (Figure S1F). The tagged proteins were functional since the UQ₈ content of the strains accounted for at least 70% of wild-type (WT) level (Figure S1G). Western blot analysis of cellular extracts with an anti-Flag antibody detected the Ubi proteins at their expected size, except the membrane-bound UbiA and UbiB, which did not show any signal (data not shown). Ultracentrifugation of cell-free extracts separated soluble and membrane fractions as verified by immunodetection of the cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the membrane-bound porin LamB (Figure 1C). All tested Ubi-SPA proteins distributed in both fractions (Figure 1C). We calculated the total amount of each Ubi protein in the entire soluble and membrane fractions. The ratio of these amounts indicate the distribution of each Ubi protein (Figure 1C) and showed that all Ubi proteins localized predominantly in the soluble fraction, except UbiK.

Seven Ubi Proteins Form a 1-MDa Complex

To further characterize the soluble Ubi proteins, we analyzed cytoplasmic fractions by blue native PAGE (BN-PAGE), a technique that preserves the integrity of protein complexes and separates them according to their hydrodynamic size and shape (Wittig et al., 2006). Anti-Flag immunodetection showed that seven Ubi-SPA proteins (UbiE, F, G, H, I, J, and K) co-migrated at ~1,000 kDa, whereas UbiD and UbiX co-migrated at around 700 kDa (Figure 2A). Similar results were obtained with an anti-CBP antibody, demonstrating that the specific detection of the SPA tag fused to the Ubi proteins (Figure S2A). As expected, the tetrameric GAPDH protein (4 × 35.5 kDa) ran at ~140 kDa (Figures 2A and S2A). We also subjected the samples to a denaturing second-dimension electrophoresis (2D SDS-PAGE) after the first-dimension BN-PAGE (1D BN-PAGE). 2D SDS-PAGE confirmed the migration of UbiE, F, G, H, I, J, and K proteins at ~1,000 kDa and of UbiX and UbiD at ~700 kDa (Figure 2B). GAPDH was detected at ~100 kDa with variations between experiments due to migration artifacts in the lower part of the gel and to disparities in the positioning of the 1D BN-PAGE lane (Figure S2B).

To corroborate the co-migration of several Ubi proteins, we used a second method that separates proteins in glycerol gradients according to their density. UbiE, F, G, H, I, J, and K distributed around the high-density fractions 11–16, whereas UbiD and X were most abundant in fractions 9–13, and GAPDH eluted in fractions 6–10 (Figure 2C). Silver staining revealed that most proteins of the soluble extracts localized in low-density fractions (Figure 2C). We analyzed by 2D SDS-PAGE fractions 11, 12, and 13 from the glycerol gradient of UbiG-SPA and obtained a signal for the UbiG protein at ~1,000 kDa (Figure 2D). Thus, both BN-PAGE and glycerol gradient experiments consistently established the existence of the same protein complex that we name “Ubi complex.”

To provide additional proof of the existence of the Ubi complex, we performed bacterial two-hybrid experiments, in which

adenylate cyclase (AC) activity reports on the interaction between Ubi proteins fused either to the T18 or T25 domains of AC (Karimova et al., 1998). We tested all combinations (Table S1) and obtained an interaction network where the seven proteins of the Ubi complex exhibited multiple robust interactions, whereas the other Ubi proteins were less connected (Figure 2E). Collectively, our results are consistent with UbiE, F, G, H, I, J, and K being part of a cytoplasmic 1-MDa Ubi complex, whereas UbiX and UbiD involved in the decarboxylation step form a separate entity.

Purification of the Ubi Complex and Identification of Its Components

Next, we isolated the Ubi complex using sequential affinity purification, a two-step procedure that uses first the FLAG epitopes of the SPA tag and second its CBP domain (Babu et al., 2009). We processed soluble extracts from UbiE-SPA cells and from WT untagged cells as control. Both eluates from the anti-FLAG resin were similar (Figures S2C and S2D), but immunodetection confirmed the presence of UbiE-CBP in the UbiE-SPA sample (Figure S2E). E2-E4 eluates of the calmodulin resin showed multiple bands that were absent in the control eluate (Figures S2F and S2G) and contained the bait UbiE-CBP protein, as revealed by western blot analysis (Figure S2H). We detected the purified Ubi complex at ~1,000 kDa in a 2D SDS-PAGE analysis of the E2 eluate (Figure 3A), with a signal similar to the Ubi complex in total soluble fractions (Figure 2B). We similarly purified the Ubi complex from UbiI-SPA and UbiG-SPA strains and obtained E2 fractions whose SDS-PAGE shared protein bands with the UbiE-SPA fraction E2 (Figure 3B). To identify the proteins in the Ubi complex, all three samples were submitted to mass spectrometry (MS)-based proteomic analysis and compared with E2 fractions from independent control purifications. The stringent comparison of MS-based results obtained for SPA-tagged proteins and negative controls identified several proteins that co-purified with the bait proteins (Table S2). Interestingly we detected only seven Ubi proteins and all of them were found in a subset of eight proteins systematically enriched in the three Ubi-SPA eluates (Figures 3C; Table S2). The eight proteins were UbiE, F, G, H, I, J, and K, and the lipoprotein Blc, the physiological function of which remains uncertain (Campanacci et al., 2006). The UQ₈ content of the Δblc strain was comparable with WT (Figure S2I), showing that the Blc protein is not required for UQ biosynthesis, unlike Ubi proteins of the Ubi complex. Overall, we conclude that the biosynthesis of UQ in the soluble fraction (Figure 1B) is mediated by the Ubi complex, which contains the five enzymes (UbiE, F, G, H, and I) necessary to convert OPP to UQ₈ (Figure 1A), and two accessory factors, UbiJ and UbiK.

UQ Biosynthetic Intermediates OPP and DMQ₈ Co-elute with the Ubi Complex

Using high-performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection and MS (HPLC-ECD-MS), we analyzed the distribution of isoprenoid quinones in exponentially growing *E. coli* cells and found that the UQ intermediates OPP and DMQ₈ accumulated substantially in the cytosolic fraction, whereas UQ₈ was highly enriched in the membrane fraction (Figure 4A). Analysis of the cytosols of Ubi-SPA strains on glycerol gradients

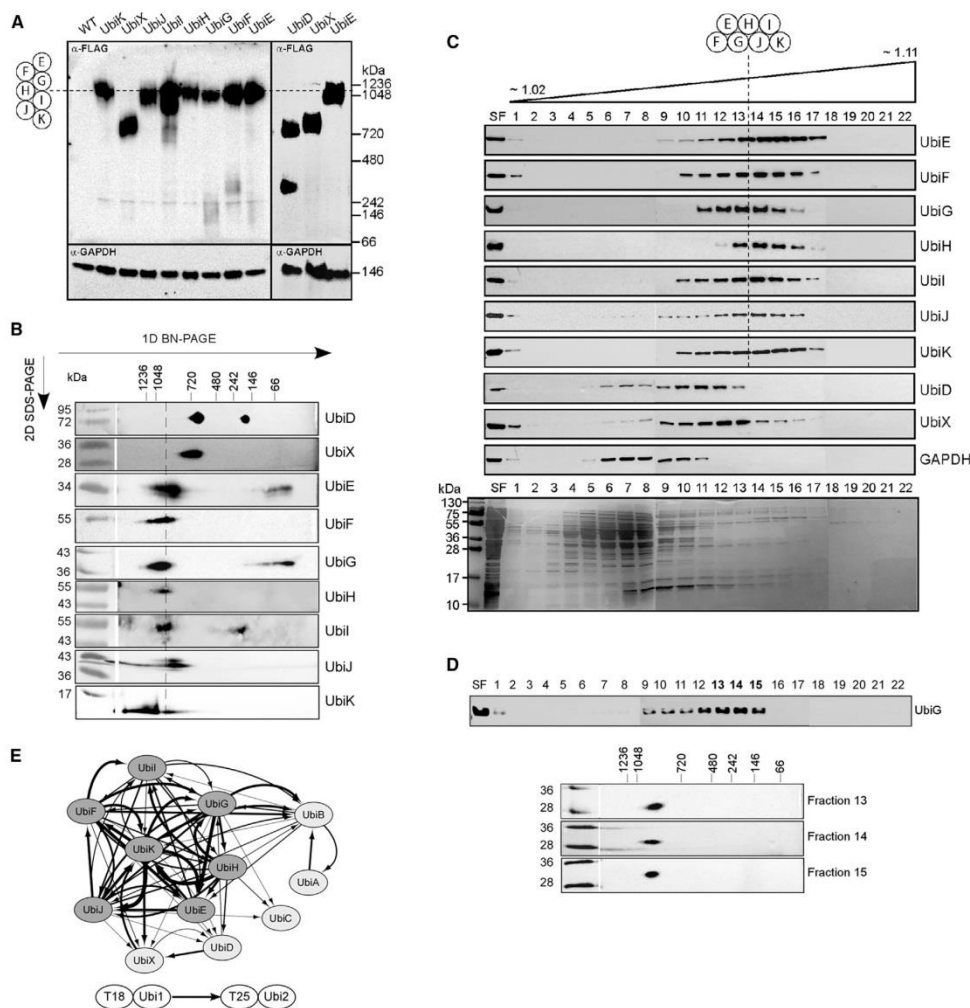


Figure 2. Seven Ubi Proteins Form a Soluble Ubi Complex

(A) BN-PAGE electrophoresis and immunodetection of soluble fractions from the indicated Ubi-SPA strains (50 μ g of total proteins). The membrane was first probed with α -FLAG antibody, stripped and probed with α -GAPDH.

(B) Immunodetection with α -FLAG antibody of soluble fractions from the indicated Ubi-SPA strains after 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE (50 μ g of total proteins).

(C) SDS-PAGE and western blot analysis (α -FLAG antibody) of fractions recovered from glycerol gradients onto which the cytoplasm of the indicated Ubi-SPA cells were deposited. A typical distribution of GAPDH is also shown. Fractions 1 and 22 correspond to the top and the bottom of the gradient, respectively (densities 1.02 and 1.11). Silver staining of gradient fractions analyzed by SDS-PAGE shows the distribution of total proteins (bottom).

(D) Separation by 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE of glycerol gradient fractions 13–15 containing UbiG-SPA and immunodetection with α -FLAG antibody. The distribution of UbiG in all fractions of the gradient is shown (top).

(E) Interaction network between Ubi proteins constructed with Cytoscape 3 from the results of the bacterial two-hybrid experiments (Table S1). Line width is proportional to the value of the interaction and cutoff value was three times background. Interaction of proteins with themselves (for example, UbiA-UbiA) are not represented. Results representative of two independent experiments (A–C).

See also Figure S2.

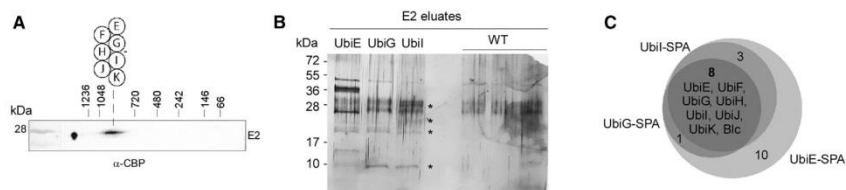


Figure 3. Purification of the Ubi Complex

(A) Immunodetection with α -CBP antibody of the purified Ubi complex after 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE (E2 fraction of UbiE-SPA, see Figure S2F). (B) Silver staining of SDS-PAGE with purified E2 fractions from indicated -SPA samples and WT controls. Asterisks mark bands common to -SPA samples and absent from WT. (C) Venn diagram integrating the different proteins found to be specifically enriched with each bait as compared with the related negative controls using MS-based proteomics (Table S2). The names of the eight proteins enriched with all three tagged Ubi proteins are indicated. See also Figure S2.

revealed that OPP and DMQ₈ were enriched in fractions that contain the Ubi complex, as visualized by western blot analysis (Figures 4B, S3A, and S3B). Conversely, UQ₈ distributed quite evenly in the gradient (Figures 4B, S3A, and S3B). Together, these results showed that the hydrophobic intermediates OPP and DMQ₈ localized to a significant extent in the soluble fraction of *E. coli* extracts and co-eluted with the Ubi complex.

The SCP2 Domain of UbiJ Binds Isoprenoid Lipids

We recently showed that the purified UbiJ-UbiK heterocomplex binds palmitoleic acid (Loiseau et al., 2017), one of the most abundant fatty acids in *E. coli*. Overexpression of UbiJ-K caused a decrease in cellular UQ₈ levels and the accumulation of OPP and DMQ₈ (Figures 4C and S3C), suggesting the sequestration of these UQ₈ biosynthetic intermediates by UbiJ-K. We then purified the UbiJ-K complex (Figure S3D) using affinity chromatography and size-exclusion chromatography, and analyzed its quinone content by HPLC-ECD-MS (Figure S3E). We detected UQ₈, OPP, and DMQ₈ (Figure 4D), showing that UbiJ-K is able to bind all three isoprenoid lipids. To elucidate which of the two proteins is responsible for lipid binding, we purified UbiK and the N-terminal SCP2 domain of UbiJ (UbiJ-SCP2) (Figure 3D); full-length UbiJ was not amenable to purification. We detected UQ₈, OPP, and DMQ₈ in UbiJ-SCP2, but not in UbiK samples (Figures 4D and S3E). The calculated UQ₈/protein ratio showed a low occupancy in UbiJ-K and UbiJ-SCP2 (less than 0.3%), probably due to the high-yield expression and the multiple purification steps. Together, our results strongly support that the SCP2 domain of UbiJ, and not UbiK, is responsible for binding UQ₈ and the biosynthetic intermediates OPP and DMQ₈ in the Ubi complex.

Structure of the SCP2 Domain of UbiJ

UbiJ-SCP2 behaved as a dimer in solution and crystallized in the space group P212121 with an asymmetric unit containing either a dimer or a tetramer (Table S3). The structure shown in Figure 5A is that of the dimer generated with data collected to the highest 1.7 Å resolution. An electron density map is shown in Figure S4. The protein has an α/β fold with five α helices and five β strands forming a hydrophobic center with an open cavity (Figure 5B). The walls of this cavity are composed of hydrophobic residues provided both by the α helices and the β strands (Figures 5C

and 5D). It is interesting to note that, at those specific positions, UbiJ-SCP2 domains have exclusively hydrophobic residues (Figure S5). The overall structure, as well as the presence of a hydrophobic cavity, is highly reminiscent of previously reported structures of the SCP2 protein family (Table S4). This suggests that the absence of the C-terminal part of UbiJ does not perturb the SCP2 domain in line with our model showing two independent domains (Loiseau et al., 2017). In some cases, SCP2 proteins have been crystallized in complex with a hydrophobic ligand as a further evidence for the cavity playing a functional role in lipid binding (Table S4) (Burgardt et al., 2017; De Berti et al., 2013; Dyer et al., 2008; Haapalainen et al., 2001). Although the model we present does not contain any ligand, electron density was noted within the cavity (Figure 5C). It is tempting to suggest that this unexplained density is related to the various lipids detected in small quantities within the purified protein (see above) and that the cavity of UbiJ serves as the binding site for UQ₈ intermediates. As a final support to that hypothesis we found that a UQ₈ conformation taken from a previously reported structure of photosynthetic LH1-RC protein in complex with UQ₈ (Yu et al., 2018) nicely aligns into this cavity, with a reasonable fit in length (Figure 5E).

UbiJ Is Essential to the Stability of the Ubi Complex

Our characterization of UbiJ as a polyprenyl lipid-binding protein led us to characterize OPP binding to the Ubi complex in $\Delta ubiJ$ cells. $\Delta ubiJ$ cells are blocked at an undefined early step of the UQ biosynthetic pathway (Aussel et al., 2014a) and have therefore a strongly diminished UQ₈ content and increased OPP levels compared with WT cells (Figure S6A). The cytosol of UbiG-SPA $\Delta ubiJ$ cells analyzed on glycerol gradient showed a profile with comparable amounts of OPP and UQ₈ in all fractions (Figure 6A). A similar result was obtained with UbiF-SPA $\Delta ubiJ$ and UbiH-SPA $\Delta ubiJ$ cells (Figures S6B and S6C). This distribution of OPP is in stark contrast with the accumulation of OPP in the Ubi complex observed in cells that contain UbiJ (Figures 4B, S3A, and S3B).

The deletion of *ubiJ* did not affect the steady-state level of UbiF or UbiG but lowered that of UbiH (Figure S6D). Western blot analysis revealed that the Ubi proteins shifted from fractions 11–16 (Figure 2C) in WT cells to fractions 2–10 in $\Delta ubiJ$ cells (Figures 6A, S6B and S6C), whereas the position of

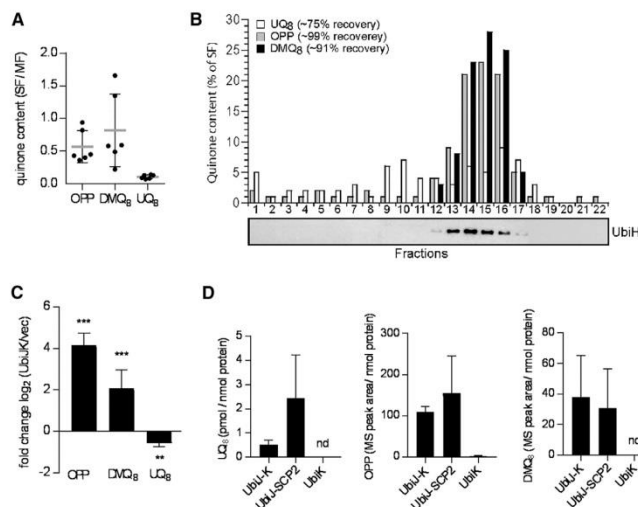


Figure 4. The SCP2 Domain of UbiJ Binds UQ₈ and Its Biosynthetic Intermediates in the Ubi Complex

(A) Ratio of the abundance of octaprenyl lipids in the soluble fraction (SF) (150,000×g supernatant) and the membrane fraction (MF) of WT cells grown in lysogeny broth medium, mean ± SD (n = 6). (B) Glycerol gradient analysis of soluble extracts from UbiH-SPA cells and quantification of isoprenoid quinones in each fraction by HPLC-ECD-MS. Recovery calculated from the total content of all fractions compared with content of the UbiH-SPA soluble fraction deposited on top of the gradient. The western blot analysis showing the position of UbiH in the gradient is the same than in Figure 2C.

(C) Levels of OPP, DMQ₈, and UQ₈ in cells over-expressing or not UbiJ-K (n = 4), see Figure S3C, **p < 0.01, ***p < 0.001, unpaired Student's t test. (D) Abundance of isoprenoid quinones in the indicated purified proteins (see Figure S3E), mean ± SEM (n = 2). See also Figure S3.

GAPDH was unchanged (compare Figures 6A and 2C). BN-PAGE and 2D-SDS-PAGE analyses showed that the Ubi complex was absent in *ΔubiJ* cells (Figures 6B–6D). Conversely, the Ubi complex was readily detected in cells lacking *ubiE*, *ubiF*, *ubiG* (Figures 6B and 6C), or *ubiK* (Figure 6E), even though deletion of this last gene decreased UbiI levels (Figure S6E). Interestingly, cells with a Ubi complex lacking an enzymatic subunit, such as UbiF or UbiE, produced substantial quantities of the late-stage intermediates DMQ₈ and DDMQ₈, respectively (Figure S6F). Together, our results show that UbiJ is required for the stability of the Ubi complex and explain why UQ biosynthesis cannot progress past the early intermediate OPP in *ΔubiJ* cells.

DISCUSSION

Here, we demonstrate the supramolecular organization of seven UQ biosynthesis proteins in a 1-MDa Ubi complex (Figure 2), which is remarkable for at least two reasons. First, it constitutes a stable metabolon, a term that designates the association of sequential enzymes acting in a metabolic pathway (Sreere, 1985). Often, metabolons are highly dynamic and therefore not amenable to biochemical characterization (Laursen et al., 2016; Nguyen et al., 2014; Wu and Minteer, 2015), like the purinosome. However, a few stable metabolons have been purified, such as the pyruvate dehydrogenase complex (Zhou et al., 2001) or a triacylglycerol biosynthetic complex in *Rhodotorula glutinis* (Gangar et al., 2001). We have shown that the Ubi complex contains two accessory factors (UbiJ and K) and the Ubi enzymes (UbiI, G, H, E, and F) that catalyze the last six reactions of the UQ biosynthesis pathway. As such, the Ubi complex is, to our knowledge, the stable metabolon that coordinates the highest number of chemical reactions. Substrate channeling between Ubi enzymes and control of undesired reactivity of UQ interme-

diates may be conferred by the Ubi metabolon to contribute to efficient UQ biosynthesis.

Second, the Ubi complex is present in the cytosolic fraction even though its polyprenylated substrates count among the most hydrophobic molecules in life (Nowicka and Kruk, 2010; Stefely and Pagliarini, 2017). As a matter of fact, we have experimentally established that the biosynthetic steps from OPP to UQ₈ proceed in the cytosolic fraction, independently from the membrane, as suggested by an early report (Knoell, 1979a) and supported by the following results: (1) OPP and DMQ₈, two UQ₈ biosynthetic intermediates, accumulated in the cytosolic fraction to a greater extent than the mature UQ₈ and co-purified with the soluble Ubi complex (Figure 4), (2) the Ubi metabolon was located in the soluble fraction, which actively converted OPP into UQ₈ *in vitro*, unlike the membrane fraction (Figure 1B). We believe that UbiJ is key to create, in the Ubi complex, a microenvironment that isolates lipophilic molecules from the surrounding hydrophilic cytoplasm. Indeed, we demonstrated that the SCP2 domain of UbiJ binds UQ biosynthetic intermediates (Figure 4), and the crystal structure revealed an elongated hydrophobic cavity, the size and shape of which are compatible with the binding of the polyprenyl tail of UQ intermediates (Figure 5). SCP2 domains are typically found lone (unfused) or in multidomain proteins and fulfill lipid-binding and transport functions in all domains of life (Burgardt et al., 2017). We demonstrated here the presence of an SCP2 protein in a multiprotein complex involved in lipid modification. Altogether, we propose a model of UQ₈ biosynthesis, in which the hydrophobic UQ intermediates downstream of OPP are not associated to membrane lipids but to UbiJ within the soluble Ubi metabolon (Figure 6F).

Since the early prenylation step by UbiA takes place in the membrane (Cheng and Li, 2014; Huang et al., 2014), our model postulates that the early octaprenyl intermediates (either OHB or OPP) move out of the membrane so that OPP can bind to

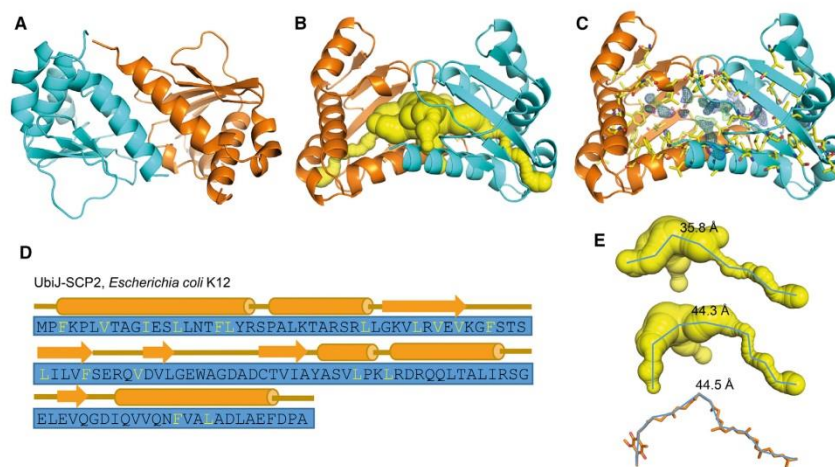


Figure 5. Structure of UbiJ-SCP2 at 1.7 Å Resolution

(A) UbiJ-SCP2 appearing as a dimer within the asymmetric unit, monomers contain a β sheet consisting of five strands and five α helices similar to SCP2 family proteins (chain A in orange, chain B in teal).
 (B) Yellow spheres represent the cavity found in UbiJ-SCP2 (cavity modeled using CAVER3 plugin for PyMOL).
 (C) Model of the cavity area of UbiJ-SCP2 with the hydrophobic residues lining the cavity highlighted in yellow and showing unmodeled electron density (maps for $2F_o - F_c$ are set at 1 σ [blue mesh] and for $F_o - F_c$ are set at 3 σ [green mesh]).
 (D) Sequence for UbiJ-SCP2 with hydrophobic residues interfacing with the cavity pocket shown in yellow (cylinders, α helices; arrows, β strands).
 (E) Hydrophobic cavities in UbiJ-SCP2 chain A (top) and chain B (middle), and comparison with ubiquinone 8 (bottom, taken from PDB: 5Y5S). The respective lengths are indicated.
 See also Figures S4 and S5.

UbiJ in the soluble Ubi complex. This mechanism is unusual because enzymes that synthesize lipids are often membrane bound or membrane associated, like the phospholipid biosynthetic pathways in *E. coli* (Lopez-Lara and Geiger, 2017). However, the extrusion of a lipid from the membrane to allow its chemical modification has a precedent, with the eukaryotic Sec14 that extracts phosphatidylinositol from the membrane and presents it to soluble hydroxylases (Bankaitis et al., 2010). In the case of UQ biosynthesis, we believe that the accessory factor UbiB may assist in the extrusion of either OHB or OPP from the membrane (Figure 6F). Indeed, UbiB and its eukaryote homolog Coq8 were recently hypothesized to couple the hydrolysis of ATP to the extraction of head groups of UQ intermediates out of the membrane (Reidenbach et al., 2018; Stefely et al., 2016). Of note, UbiB contains one transmembrane domain and is not part of the purified Ubi complex (Table S2), consistent with the soluble nature of the latter. Reciprocally, how UQ₈ is delivered to the membrane bilayer after its synthesis by the soluble Ubi complex will be addressed in future studies. Overall, UbiK may also play a role in trafficking the polyprenyl molecules in and out of the membrane as a significant part of UbiK associates with the membrane (Figure 1C), and it was described to enhance the fusion of membranes *in vitro* (Carrica et al., 2011).

UbiJ and UbiK are conserved in many proteobacteria (Loiseau et al., 2017; Xia et al., 2017), and we demonstrated that both proteins are *bona fide* subunits of the Ubi complex.

Besides binding UQ intermediates, we also found that UbiJ was an essential structural element of the Ubi complex, unlike other Ubi proteins (Figures 6B–6E). We showed previously that the C-terminal domain of UbiJ was essential for UQ biosynthesis *in vivo* and formed an extended α helix that likely associated within a three-helix bundle in the UbiK₂-UbiJ heterocomplex (Aussel et al., 2014a; Loiseau et al., 2017). Taking all these findings into account, we propose that UbiJ is the keystone of the Ubi complex and constitutes a docking platform where Ubi enzymes assemble and access their SCP2-bound polyprenyl substrates. The total molecular weight of the eight proteins identified in the purified Ubi complex approaches 270 kDa, still far from the estimated 1 MDa observed on BN-PAGE. The extra mass may correspond to multimers of Ubi proteins in the Ubi complex, as supported by a study that found members of multiprotein complexes to be made in precise proportion to their stoichiometry, and showed that Ubi proteins have heterogeneous synthesis rates (Li et al., 2014). We also found that several Ubi proteins interacted with themselves in our two-hybrid assay (Table S1), supporting that they may multimerize.

Based on the conservation of Ubi proteins, it is tempting to suggest that the UQ biosynthetic pathway of many proteobacteria is organized around a soluble stable metabolite, as in *E. coli*. Nonetheless, we expect different versions of the Ubi complex across proteobacteria because of variations in the number of UQ hydroxylases (Pelosi et al., 2016) and of other components

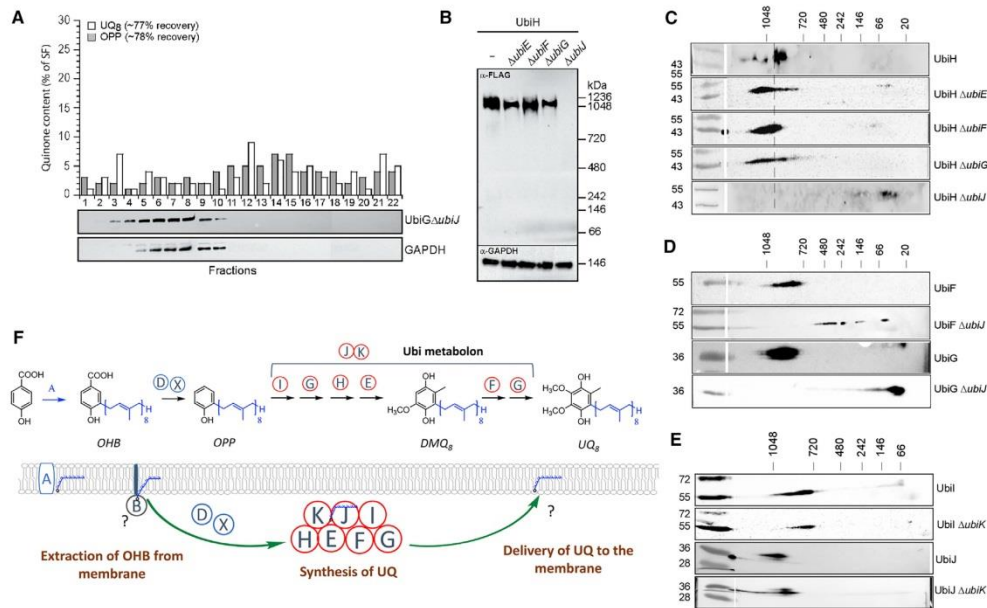


Figure 6. UbiJ Is Essential to the Stability of the Ubi Complex

(A) Glycerol gradient analysis of soluble extracts from UbiG-SPA *ΔubiJ* cells and quantification of UQ₈ and OPP in each fraction. Western blot analysis shows the distribution of UbiG-SPA and the control GAPDH protein (see also Figures S6B and S6C, recovery calculated as in Figure 4B).

(B and C) Immunodetection with α-FLAG antibody of soluble fractions from the UbiH-SPA strain carrying deletions in the indicated *ubi* genes after BN-PAGE analysis (B) or 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE (C).

(D and E) Immunodetection with α-FLAG antibody of soluble fractions from the indicated Ubi-SPA strain carrying deletions for *ΔubiJ* (D) or *ΔubiK* (E) after 1D BN-PAGE and 2D SDS-PAGE. A representative result from two independent experiments is shown (B–E).

(F) UQ₈ biosynthetic pathway (top) and proposed model of the physical organization of Ubi proteins and prenylated UQ₈ intermediates with respect to the inner membrane. The same representation is used for all polyprenylated compounds, irrespective of the substituents of the benzoquinone head group. Membrane-bound UbiA prenylates 4HB to yield OHB that localizes in the lipid bilayer. UbiB may assist the extraction of OHB from the membrane and OHB is subsequently decarboxylated to OPP by UbiD-X. OPP is bound by UbiJ in the Ubi complex and the metabolon formed by the seven Ubi proteins circled in red synthesizes UQ₈, which is ultimately delivered to the membrane, where it fulfills its physiological functions. See also Figure S6.

of the pathway (Esposti, 2017). In eukaryotes, it is unclear whether a UQ biosynthesis metabolon exists since enzymes are still missing for two chemical reactions of the pathway (Awad et al., 2018). BN-PAGE experiments showed that several UQ biosynthetic proteins form a complex associated with the mitochondrial inner membrane in the yeast *S. cerevisiae* (He et al., 2014; Marbois et al., 2009), and such supramolecular organization may also exist in mammalian cells (Floyd et al., 2016; Stefely et al., 2016). However, the composition of the complex is uncertain since multiple proteins not related to UQ biosynthesis co-purified with yeast UQ biosynthetic proteins (Allan et al., 2015). Interestingly, two UQ biosynthesis proteins of unknown function and restricted to eukaryotes, Coq4 and Coq9, are able to bind lipids (Lohman et al., 2014; Rea et al., 2010) and exhibit genetic interactions with other Coq proteins (Hsieh et al., 2007; Marbois et al., 2009; Ozeir et al., 2015). We suspect that Coq4 and Coq9 may chaperone UQ intermediates, similar to bacterial UbiJ.

In conclusion, we discovered a stable metabolon—the Ubi complex—that catalyzes UQ biosynthesis, thanks to the association of five enzymes and two accessory factors. Surprisingly this metabolon localizes in the cytosolic fraction of *E. coli*, despite the extreme hydrophobicity of UQ biosynthetic intermediates. Our work shows that the SCP2 protein UbiJ binds these compounds and opens new questions regarding the trafficking of polyprenyl lipids in and out of membranes. The Ubi complex microreactor represents also a fascinating model to study how substrates are sequentially processed by multiple active sites located in a single structural entity.

SIGNIFICANCE

Ubiquinone is a conserved isoprenoid lipid of crucial physiological importance. Isoprenoid intermediates in ubiquinone biosynthesis are extremely hydrophobic; thus, the pathway is proposed to be membrane associated. Unexpectedly, we

demonstrate that most steps in bacterial UQ biosynthesis are independent of the membrane and occur inside a soluble multiprotein complex that forms a stable metabolon. We elucidate a key role for the SCP2 domain of the UbiJ protein in binding the isoprenoid intermediates inside the multiprotein complex, documenting that the widespread SCP2 domain also functions in assisting chemical modifications of lipids. Our work highlights a remarkable bacterial metabolon synthesizing the hydrophobic ubiquinone molecule in the cytosol, and raises questions regarding the trafficking of isoprenoid lipids in and out of the membrane.

STAR METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Strain Construction
 - Plasmid Construction
 - Bacterial Two-Hybrid Reporter System
 - Preparation of Soluble and Membrane Fractions
 - Protein Concentration and SDS-PAGE
 - Blue Native-PAGE
 - Two Dimensional BN-PAGE/SDS-PAGE
 - Western-Blot Analyses
 - Silver Staining
 - Overexpression and Purification of Proteins
 - Crystallization
 - Data Collection and Structure Determination
 - ¹³C₆-UQ₈ Biosynthesis Activity Assay
 - Lipid Extraction and Quinone Analysis
 - Purification of the Ubi Complex
 - Glycerol Gradient Fractionation
 - Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and six tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), ANR Blanc (An)AeroUbi ANR-15-CE11-0001-02. We thank Amélie Amblard and Mikael Martin for technical assistance and the GEM team at TIMC for discussions and suggestions. S.B. and Y.C. give thanks for the support of the discovery platform and data science group at EDyP. Proteomic experiments were partly supported by the Proteomics French Infrastructure (ANR-10-INBS-08-01 grant) and the Labex GRAL (ANR-10-LABX-49-01). Diffraction data were collected at the synchrotron SOLEIL, beamlines Proxima 1 and Proxima 2 (Saint-Aubin, France). We are most grateful to the beamline scientists, in particular Pierre Legrand and Bill Sheperd. C.F., C.-D.-T.V., M.L., and M.F. acknowledge support from the French National Research Agency (Labex program DYNAMO, ANR-11-LABX-0011), and from Fondation de l'Orangerie for Individual Philanthropy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.P., L.P., M.F., F.B., M.L., and M.H.C. designed the research and F.P. coordinated the project. All authors performed experiments and/or data analysis. F.P., L.P., M.F., F.B., M.L., and M.H.C. wrote the paper and the manuscript was reviewed by all authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: October 16, 2018
Revised: November 14, 2018
Accepted: November 29, 2018
Published: January 24, 2019

SUPPORTING CITATIONS

The following reference appear in the Supplemental Information: Baba et al., 2006.

REFERENCES

- Alberge, F., Espinosa, L., Seduk, F., Sylvi, L., Toci, R., Walburger, A., and Magalon, A. (2015). Dynamic subcellular localization of a respiratory complex controls bacterial respiration. *Elife* 4, <https://doi.org/10.7554/eLife.05357>.
- Alexander, K., and Young, I.G. (1978). Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17, 4745–4750.
- Allan, C.M., Awad, A.M., Johnson, J.S., Shirasaki, D.I., Wang, C., Blaby-Haas, C.E., Merchant, S.S., Loo, J.A., and Clarke, C.F. (2015). Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 290, 7517–7534.
- Aussel, L., Loiseau, L., Hajj Chehade, M., Pocachard, B., Fontecave, M., Pierrel, F., and Barras, F. (2014a). ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 196, 70–79.
- Aussel, L., Pierrel, F., Loiseau, L., Lombard, M., Fontecave, M., and Barras, F. (2014b). Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1004–1011.
- Awad, A.M., Bradley, M.C., Fernandez-Del-Rio, L., Nag, A., Tsui, H.S., and Clarke, C.F. (2018). Coenzyme Q10 deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays Biochem.* 62, 361–376.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.
- Babu, M., Butland, G., Pogoutse, O., Li, J., Greenblatt, J.F., and Emili, A. (2009). Sequential peptide affinity purification system for the systematic isolation and identification of protein complexes from *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.* 564, 373–400.
- Bader, M.W., Xie, T., Yu, C.A., and Bardwell, J.C. (2000). Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem.* 275, 26082–26088.
- Bankaitis, V.A., Mousley, C.J., and Schaaf, G. (2010). The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35, 150–160.
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Coute, Y., Puthier, D., Buchou, T., et al. (2017). Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells. *Mol. Cell* 66, 89–101.e8.
- Bayly, C.L., and Yadav, V.G. (2017). Towards precision engineering of canonical polyketide synthase domains: recent advances and future prospects. *Molecules* 22, 18.
- Bentinger, M., Tekle, M., and Dallner, G. (2010). Coenzyme Q-biosynthesis and functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 74–79.

- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonrhein, C., et al. (2017). BUSTER Version 2.10.2 (Global Phasing Ltd).
- Burgardt, N.I., Gianotti, A.R., Ferreyra, R.G., and Ermacora, M.R. (2017). A structural appraisal of sterol Carrier protein 2. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1865, 565–577.
- Campanacci, V., Bishop, R.E., Blangy, S., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2006). The membrane bound bacterial lipocalin B1c is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Lett.* 580, 4877–4883.
- Carica, M.C., Craig, P.O., Garcia-Angulo, V.A., Aguirre, A., Garcia-Vescovi, E., Goldbaum, F.A., and Cravero, S.L. (2011). YqjC of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a membrane fusogenic protein required for mice colonization. *BMC Microbiol.* 11, 95.
- Cheng, W., and Li, W. (2014). Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Science* 343, 878–881.
- Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., Gora, A., Sustr, V., Klvana, M., Medek, P., et al. (2012). CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002708.
- Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1002–1011.
- De Berti, F.P., Capaldi, S., Ferreyra, R., Burgardt, N., Acierno, J.P., Klinke, S., Monaco, H.L., and Ermacora, M.R. (2013). The crystal structure of sterol Carrier protein 2 from *Yarrowia lipolytica* and the evolutionary conservation of a large, non-specific lipid-binding cavity. *J. Struct. Funct. Genomics* 14, 145–153.
- Dyer, D.H., Wessely, V., Forest, K.T., and Lan, Q. (2008). Three-dimensional structure/function analysis of SCP-2-like2 reveals differences among SCP-2 family members. *J. Lipid Res.* 49, 644–653.
- Femley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
- Esposti, M.D. (2017). A journey across genomes uncovers the origin of ubiquinone in cyanobacteria. *Genome Biol. Evol.* 9, 3039–3053.
- Floyd, B.J., Wilkerson, E.M., Veling, M.T., Minogue, C.E., Xia, C., Beebe, E.T., Wrobel, R.L., Cho, H., Kremer, L.S., Alston, C.L., et al. (2016). Mitochondrial protein interaction mapping identifies regulators of respiratory chain function. *Mol. Cell* 63, 621–632.
- Galassi, V.V., and Arantes, G.M. (2015). Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 1560–1573.
- Gangar, A., Karande, A.A., and Rajasekharan, R. (2001). Isolation and localization of a cytosolic 10 S triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 10290–10298.
- Haapalainen, A.M., van Aalten, D.M., Merilainen, G., Jalonen, J.E., Pirila, P., Wierenga, R.K., Hiltunen, J.K., and Glumoff, T. (2001). Crystal structure of the liganded SCP-2-like domain of human peroxisomal multifunctional enzyme type 2 at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313, 1127–1138.
- Hajj Chehade, M., Loiseau, L., Lombard, M., Pecqueur, L., Ismail, A., Smadja, M., Golinielli-Pimpaneau, B., Mellot-Draznieks, C., Hamelin, O., Aussel, L., et al. (2013). ubil, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 288, 20085–20092.
- He, C.H., Xie, L.X., Allan, C.M., Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2014). Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 630–644.
- Hoyo, J., Ghaus, E., and Torrent-Burgues, J. (2017). Tuning ubiquinone position in biomimetic monolayer membranes. *Eur. Phys. J. E Soft Matter* 40, 62.
- Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 19–26.
- Hu, P.Z., Janga, S.C., Babu, M., Diaz-Mejia, J.J., Butland, G., Yang, W.H., Pogoutse, O., Guo, X.H., Phanse, S., Wong, P., et al. (2009). Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol.* 7, 929–947.
- Huang, H., Levin, E.J., Liu, S., Bai, Y., Lockless, S.W., and Zhou, M. (2014). Structure of a membrane-embedded prenyltransferase homologous to UBIAD1. *PLoS Biol.* 12, e1001911.
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 5752–5756.
- Kawamukai, M. (2018). Biosynthesis and applications of prenylquinones. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 963–977.
- Knoell, H.E. (1979a). Isolation of a soluble enzyme complex comprising the ubiquinone-8 synthesis apparatus from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 919–925.
- Knoell, H.E. (1979b). Ubiquinone synthesis in vitro starting from 2-octaprenyl phenol. *FEBS Lett.* 97, 155–158.
- Laursen, T., Borch, J., Knudsen, C., Bavishi, K., Torta, F., Martens, H.J., Silvestro, D., Hatzakis, N.S., Wenk, M.R., Dafforn, T.R., et al. (2016). Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. *Science* 354, 890–893.
- Li, G.W., Burkhardt, D., Gross, C., and Weissman, J.S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* 157, 624–635.
- Lohman, D.C., Forouhar, F., Beebe, E.T., Stefely, M.S., Minogue, C.E., Ulbrich, A., Stefely, J.A., Sukumar, S., Luna-Sanchez, M., Jochem, A., et al. (2014). Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111, E4697–E4705.
- Loiseau, L., Fyfe, C., Aussel, L., Hajj Chehade, M., Hernandez, S.B., Faivre, B., Hamdane, D., Mellot-Draznieks, C., Rascalou, B., Pelosi, L., et al. (2017). The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *J. Biol. Chem.* 292, 11937–11950.
- Lopez-Lara, I.M., and Geiger, O. (2017). Bacterial lipid diversity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 1287–1299.
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., and Clarke, C.F. (2009). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 69–75.
- Nguyen, C., Haushalter, R.W., Lee, D.J., Markwick, P.R.L., Bruegger, J., Caldara-Festin, G., Finzel, K., Jackson, D.R., Ishikawa, F., O'Dowd, B., et al. (2014). Trapping the dynamic acyl Carrier protein in fatty acid biosynthesis. *Nature* 505, 427–431.
- Nowicka, B., and Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1587–1605.
- Ozeir, M., Pelosi, L., Ismail, A., Mellot-Draznieks, C., Fontecave, M., and Pierrel, F. (2015). Coq6 is responsible for the C4-deamination reaction in coenzyme Q biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 290, 24140–24151.
- Pavelka, A., Sebestova, E., Kozlikova, B., Brezovsky, J., Sochor, J., and Damborsky, J. (2016). CAVER: algorithms for analyzing dynamics of tunnels in macromolecules. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 13, 505–517.
- Pelosi, L., Ducluzeau, A.L., Loiseau, L., Barras, F., Schneider, D., Junier, I., and Pierrel, F. (2016). Evolution of ubiquinone biosynthesis: multiple proteobacterial enzymes with various regioselectivities to catalyze three contiguous aromatic hydroxylation reactions. *mSystems* 1, e00091-16.
- Poon, W.W., Davis, D.E., Ha, H.T., Jonassen, T., Rather, P.N., and Clarke, C.F. (2000). Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182, 5139–5146.
- Rea, S.L., Graham, B.H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A., and Falk, M.J. (2010). Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 200–218.
- Reidenbach, A.G., Kemmerer, Z.A., Aydin, D., Jochem, A., McDevitt, M.T., Hutchins, P.D., Stark, J.L., Stefely, J.A., Reddy, T., Hebert, A.S., et al. (2018). Conserved lipid and small-molecule modulation of COQ8 reveals regulation of the ancient kinase-like UbiB family. *Cell Chem. Biol.* 25, 154–165.e11.

- Schoepp-Cothenet, B., van Lis, R., Atteia, A., Baymann, F., Capowiez, L., Ducluzeau, A.L., Duval, S., ten Brink, F., Russell, M.J., and Nitschke, W. (2013). On the universal core of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 79–93.
- Sheldrick, G.M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* 71, 3–8.
- Shestopalov, A.I., Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Viryasov, M.B., and Skulachev, V.P. (1997). Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli* - evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 404, 272–274.
- Srere, P.A. (1985). The metabolon. *Trends Biochem. Sci.* 10, 109–110.
- Stefely, J.A., Licitra, F., Laredj, L., Reidenbach, A.G., Kemmerer, Z.A., Grangeray, A., Jaeg-Ehret, T., Minogue, C.E., Ulbrich, A., Hutchins, P.D., et al. (2016). Cerebellar ataxia and coenzyme Q deficiency through loss of unorthodox kinase activity. *Mol. Cell* 63, 608–620.
- Stefely, J.A., and Pagliarini, D.J. (2017). Biochemistry of mitochondrial coenzyme Q biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 42, 824–843.
- Su, G., Morris, J.H., Demchak, B., and Bader, G.D. (2014). Biological network exploration with Cytoscape 3. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 47, 8.13.1–8.13.24.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
- Wittig, I., Braun, H.P., and Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–428.
- Wollstein, C., Winterhalter, M., and Funari, S.S. (2015). The location of coenzyme Q10 in phospholipid membranes made of POPE: a small-angle synchrotron X-ray diffraction study. *Eur. Biophys. J.* 44, 373–381.
- Wu, F., and Minter, S. (2015). Krebs cycle metabolon: structural evidence of substrate channeling revealed by cross-linking and mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1851–1854.
- Xia, H., Yang, X., Tang, Q., Ye, J., Wu, H., and Zhang, H. (2017). *EsrE-A* yigP locus-encoded transcript-Is a 3' UTR sRNA involved in the respiratory chain of *E. coli*. *Front. Microbiol.* 8, 1658.
- Yu, L.J., Suga, M., Wang-Otomo, Z.Y., and Shen, J.R. (2018). Structure of photosynthetic LH1-RC supercomplex at 1.9 Å resolution. *Nature* 556, 209–213.
- Zhou, Z.H., McCarthy, D.B., O'Connor, C.M., Reed, L.J., and Stoops, J.K. (2001). The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 14802–14807.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
α -FLAG	Sigma Aldrich	Cat# A2220 (RRID:AB_10063035)
α -Calmodulin Binding Peptide	Genscript	Cat# A00635-40 (RRID:AB_914284)
α -GAPDH	Covalab	Cat# 00006357
α -LamB	A. Meinke, Intercell AG	N/A
goat anti-rabbit HRP-conjugated	Covalab	Cat# 00030130
goat anti-mouse HRP-conjugated	Covalab	Cat# 00030133
Bacterial and Virus Strains		
<i>E. coli</i> MG1655	ATCC	ATCC 47076
<i>E. coli</i> BW25113	National BioResource Project	http://nbrp.jp/ search for ME9062
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Merck Millipore	Cat# 69450-3
<i>E. coli</i> BTH101	(Karimova et al., 1998)	N/A
<i>E. coli</i> DY330	(Hu et al., 2009)	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
$^{13}\text{C}_7$ -4-HB	Sigma Aldrich	Cat# 587869
NADH	Sigma Aldrich	Cat# 43420
S-Adenosylmethionine	Sigma Aldrich	Cat# A2408
anti-Flag M2 agarose beads	Sigma Aldrich	Cat# A2220
Calmodulin-Sepharose 4B beads	Sigma Aldrich	Cat# GE17-0529-01
sigmaFAST protease inhibitor	Sigma Aldrich	Cat# S8830
Prestained (Two Colors) Protein Ladder Plus (10-250Kda)	Euromedex	Cat# 06P-0211
Native PAGE sample additive	Life Technologies	Cat# BN2003
Native PAGE 3–12% Bis-Tris gels	Life Technologies	Cat# BN1001BOX
Native PAGE 20X Running Buffer	Life Technologies	Cat# BN2001
NativeMark protein ladder	Life Technologies	Cat# LC0725
Polyvalan crystallophore No1	Molecular Dimensions	Cat# MD2-81
Purified UbiK protein	This study	N/A
Purified UbiJ-SCP2 protein	This study	N/A
Purified UbiJ-K complex	This study	N/A
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega	V5111
Dithiothreitol	Fisher Scientific	BP172
Iodoacetamide	Sigma Aldrich	I1149
Ammonium bicarbonate	Sigma Aldrich	A6141
Formic acid	EMD Millipore Chemical	1.11670.0250
Acetonitrile	Sigma Aldrich	34851-M
Deposited Data		
mass spectrometry proteomics data	This study	http://www.proteomexchange.org PXD010396
X-ray structure of UbiJ-SCP2, 2.1 Å	This study	http://www.rcsb.org/ PDB ID: 6H6N
X-ray structure of UbiJ-SCP2, 1.7 Å	This study	PDB ID: 6H6O
X-ray structure of UbiJ-SCP2, 2.5 Å	This study	PDB ID: 6H6P
Experimental Models: Organisms/Strains		
For all <i>E. coli</i> strains, see Table S5		
Oligonucleotides		
For all primers, see Table S6		

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Recombinant DNA		
pETDuet-6his-ubiJ/ubiK	(Loiseau et al., 2017)	N/A
pETDuet-ubiJ(Δ 121–201)	(Loiseau et al., 2017)	N/A
pETDuet-ubiK no-tag	(Loiseau et al., 2017)	N/A
pT18	(Karimova et al., 1998)	N/A
pT25	(Karimova et al., 1998)	N/A
pT18-ubiA	This paper	N/A
pT18-ubiB	This paper	N/A
pT18-ubiC	This paper	N/A
pT18-ubiD	This paper	N/A
pT18-ubiE	This paper	N/A
pT18-ubiF	This paper	N/A
pT18-ubiG	This paper	N/A
pT18-ubiH	This paper	N/A
pT18-ubiI	This paper	N/A
pT18-ubiJ	This paper	N/A
pT18-ubiK	This paper	N/A
pT18-ubiX	This paper	N/A
pT25-ubiA	This paper	N/A
pT25-ubiB	This paper	N/A
pT25-ubiC	This paper	N/A
pT25-ubiD	This paper	N/A
pT25-ubiE	This paper	N/A
pT25-ubiF	This paper	N/A
pT25-ubiG	This paper	N/A
pT25-ubiH	This paper	N/A
pT25-ubiI	This paper	N/A
pT25-ubiJ	This paper	N/A
pT25-ubiK	This paper	N/A
pT25-ubiX	This paper	N/A
Software and Algorithms		
XDS	(Kabsch, 2010)	http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/
STARANISO	(Bricogne et al., 2017)	http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi
SHELXL	(Sheldrick, 2015)	http://shelx.uni-goettingen.de/
Coot	(Emsley et al., 2010)	https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/
BUSTER	(Bricogne et al., 2017)	https://www.globalphasing.com/buster/
CCP4	(Winn et al., 2011)	http://www.ccp4.ac.uk/
Pymol	Schrödinger, LLC	https://pymol.org/2/
CAVER3	(Chovancova et al., 2012)	https://www.caver.cz/
Mascot Distiller	Matrix Science	http://www.matrixscience.com/
Mascot	Matrix Science	http://www.matrixscience.com/
Proline	Open source	http://www.profipteomics.fr/proline
Xcalibur	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com
Cytoscape 3.0	(Su et al., 2014)	https://cytoscape.org
Other		
Liquid chromatography	Thermo Scientific	UltiMate 3000 RSLCnano System
Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μ m, 250 mm x 75 μ m	Dr. Maisch GmbH	r119.aq.

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Mass spectrometer	Thermo Scientific	Q Exactive Plus
BetaBasic-18, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m	Thermo Scientific	Cat# 71505-154630
Hitrap Chelating HP column	GE Healthcare	Cat# GE17-0408-01

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Fabien Pierrel (fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

E. coli strains were stored frozen at -80°C in solutions containing 20% glycerol and revived by streaking on LB plates containing 1.6% bacto-agar (w/v) and incubating overnight at 37°C . Plates were kept at 4°C for up to three weeks and colonies from the plates were used to inoculate overnight precultures in liquid medium. Large cultures were performed by inoculating fresh growth medium at $\text{O}_{\text{D}600}$ 0.05 with the precultures. *E. coli* strains were grown in lysogeny broth (LB) medium at 37°C in Erlenmeyer flasks filled to 1/10 of the maximal volume and shaken at 180 rpm, unless stated otherwise. For experiments using labelling with $^{13}\text{C}_7$ -4-HB, cells were grown in MSG medium, a minimal medium supplemented with 0.4% glycerol (w/v) (Alberge et al., 2015). All growth media were sterilized by autoclave and then ampicillin (50 mg/L), kanamycin (25 mg/L), and chloramphenicol (25 mg/L) were added from stocks (1000X solution sterilized through 0.22 μm filters and stored at -20°C), when needed. MSG medium was supplemented with 0.5% casaminoacids (w/v) and with 1/100 volume of a filter-sterile solution of 1mM CaCl_2 , 200 mM MgCl_2 , 1% thiamine (w/v).

METHOD DETAILS

Strain Construction

All strains used in this study are listed in Table S5.

Construction of SPA Strains

The DY330 *ubiC*-SPA strain encompassing the SPA tag DNA sequence and the kanamycin antibiotic resistance marker cassette (Kan^{R}) was used as a template in polymerase chain reaction (PCR) amplification. A 5-*ubiD*, *E*, *I*, *J*, *K*-SPA gene-specific forward primer (Table S6), located immediately upstream of the *ubi* stop codon, and a 3-*ubiD*, *E*, *I*, *J*, *K*-SPA gene-specific reverse primer, located immediately downstream of the target gene stop codon, were used to amplify the SPA tag and Kan^{R} cassette. The purified PCR products were subsequently integrated at the 3' end of *ubi* genes or *atpB* gene in the BW25113 strain in which the λ -Red recombination machinery is expressed. Finally, the *ubi*-SPA-Kan cassettes were transduced through P1 phage from BW25113 to MG1655. When DY330 SPA-tagged strains were available (Hu et al., 2009), the *ubi*-SPA-Kan cassettes were transduced to MG1655 through P1 phage.

Construction of Knock-Out Strains

The *ubiC*::Kan, *ubiE*::Kan, *ubiF*::Kan, *ubiG*::Kan mutations (from the BW25113 strains, Keio library) and *ubiJ*::Kan, *ubiK*::Kan mutations were transduced into the desired MG1655 strain by P1 transduction.

Plasmid Construction

The two-hybrid plasmids were constructed by inserting the *ubi* ORF sequences in pT18 and pT25 plasmids, using the oligonucleotides indicated in Table S6. Briefly, the *ubi* gene fragments were obtained by PCR amplification using the genomic DNA of MG1655 as template and the oligonucleotides 5-*XbaI ubi* and 3-*XbaI ubi*. PCR products were *XbaI*-digested and inserted into *XbaI*-digested pT18 or pT25 plasmids, yielding the pT18-*ubi* and pT25-*ubi* plasmids, respectively. All plasmids were verified using DNA sequencing.

Bacterial Two-Hybrid Reporter System

The bacterial two-hybrid reporter system is based on functional complementation of the two domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase, T18 and T25, expressed separately from two compatible plasmids (Karimova et al., 1998). Adenylate cyclase activity is restored only when proteins fused to T18 and T25 interact. Fusions were constructed with T18 and T25 present at the N-terminal of Ubi proteins. Functional reconstitution of *B. pertussis* adenylate cyclase in an *E. coli* *_cya lac_* strain was monitored by assaying the activity of a cAMP-CRP-dependent lac promoter of a chromosomally encoded lac operon. In addition to testing the pair of proteins of interest, positive controls were performed with T25-*zip* and T18-*zip* plasmids. Negative controls were performed with the two empty T18 and T25 plasmids and also with each protein of interest against the empty T18 or T25 plasmids.

The interaction network of Ubi proteins in Figure 1E was constructed with Cytoscape 3 (Su et al., 2014) from the results of the bacterial two hybrid experiments (Table S1), excluding values less than 3 times above background.

Preparation of Soluble and Membrane Fractions

Ubi-SPA strains were cultured in 1 L of LB medium (2 L flasks) with shaking (200 rpm) at 37°C. When OD₆₀₀ reached 1.5–2, cells were cooled down on ice with occasional shaking and harvested by centrifugation at 5,000 g for 20 min at 4°C. The cell pellet was washed with 10 mL cold water, the same centrifugation was repeated and the pellet was frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C. The cell pellet was resuspended in 30 mL buffer A (50 mM Imidazole/HCl pH=7, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 250 mM sucrose; (adapted from (Wittig et al., 2006))) and the cells were ruptured by 3 passages through French press (1,500 psi). Cell debris were eliminated by centrifugation at 3,200 g for 10 min at 4°C, then 20 mL of the supernatant was subjected to ultracentrifugation at 120,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant after ultracentrifugation corresponds to the soluble fraction. The pellet was resuspended in 2 mL of buffer A to yield the membrane fraction. Aliquots of both fractions were frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C.

Protein Concentration and SDS-PAGE

Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid assay (Thermo). 30 µg of total protein were analyzed on 12% acrylamide SDS-PAGE gel and electrophoresis was performed at 20 mA for 45 min. Prestained Protein Ladder (Euromedex) was used as molecular weight marker.

Blue Native-PAGE

Native PAGE sample additive (Life Technologies) was added to the soluble fractions (50 µg of proteins) and BN-PAGE was performed using Native PAGE 3–12% Bis-Tris gels (1.0 mm × 10 wells; Life Technologies). The BN-PAGE system consisted of two compartments: the internal one contained the cathode buffer (50 mM Tricine, 7.5 mM imidazole, 0.02% coomassie blue G250, pH=7) whereas the external one contained the NativePAGE running buffer (50 mM Bis-Tris pH=7, 50 mM Tricine, Life Technologies). Electrophoresis was performed at 4°C using 3 tensions: 100V for 20 min allowing proteins to enter the gel, 200V for 30 min then 300V until the migration front reached the lower limit of the gel (~1h). Proteins were transferred onto an immobilon PVDF membrane pre-activated for 2 min with methanol. Transfer was performed in buffer B (50 mM Tricine, 7.5 mM imidazole, pH=7) for 3h at 4°C with 20 mV tension. At the end of the transfer, the PVDF membrane was discolored by rinsing several times with a mixture of 20% methanol and 10% acetic acid in order to visualize the molecular weight marker (NativeMark, Life Technologies). The position of marker bands on the membrane was marked with pencil and full discoloration of the membrane was obtained with 100% methanol. The membrane was further processed for western-blotting.

Two Dimensional BN-PAGE/SDS-PAGE

After the BN-PAGE was completed, gel lanes were cut out of the gel, soaked in SDS-PAGE running buffer (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, glycine 0.192 M, SDS 10%) for 15 min and then loaded onto a 12.5% acrylamide SDS gel of 1.5 mm thickness. 5 µL of molecular weight marker (prestained protein ladder) was deposited on a Whatman paper, which was positioned next to the BN-PAGE fragment. BN gel and SDS gel were glued together using buffer C (0.5% agarose dissolved in SDS running buffer and few drops of 0.5% bromophenol blue). Migration was performed at 20 mA until the migration front reached the bottom of the gel. Transfer was performed using trans-blot turbo system (Bio-Rad) 17 V, 10 min.

Western-Blot Analyses

After transfer, membranes were saturated with 5% milk in PBST (Phosphate-buffered saline, 0.2% Tween-20) for 30 min, rinsed 3 times in PBST and incubated overnight with the primary antibody in PBST at 4°C on a rotary table. Primary antibodies were used at the following dilutions: α-FLAG antibody, 1/5000; α-CBP, 1/3000; α-GAPDH, 1/5000; α-LamB, 1/3000. Immunodetection was performed using goat anti-rabbit HRP-conjugated or goat anti-mouse HRP-conjugated and the Clarity Western ECL substrate (BioRad). Images were acquired on a ChemiDoc XRS system with the Image Lab software (BioRad). When detection with a second antibody was needed, the membrane was stripped by three successive incubations in stripping buffer (glycine-HCl 1.5% (m/v) pH 2.2, SDS 0.1% (m/v), Tween 1% (v/v)), then rinsed in PBST and saturated with 5% milk in PBST.

The s/m ratio in Figure 1C were calculated as follows. The intensity of each protein band (quantified from the western-blot with Image Lab software) was multiplied by the total protein content of the corresponding fraction (typically, 18 mL at ~5 mg protein/mL for FS and 2 mL at ~19 mg protein/mL for FM) to estimate the total content of Ubi-SPA proteins in s and m fractions. Then, we computed the quotient of the values obtained for s and m for each Ubi-SPA protein.

Silver Staining

The SDS-gel was placed in fixing solution (50% methanol, 5% acetic acid) and agitated gently on a rotary shaker for 20 min. The gel was then rinsed in 50% methanol for 10 min, in water for 10 min and was agitated gently in 100 mL of 0.02% sodium-thiosulfate for 1 min, followed by two washing steps with water for 1 min. The gel was incubated for 20 min in 200 mL of 0.2% silver nitrate solution supplemented with 0.08% formaldehyde. The gel was washed with distilled water for 20 sec to remove the excess silver nitrate and was then placed in 50 mL of developing solution (2% sodium carbonate and 0.04% formaldehyde). When the desired intensity was obtained, the gel was transferred to 5% acetic acid for 20 min to stop the reaction. After rinsing with distilled water for 10 min, the gel was stored in 5% glycerol.

Overexpression and Purification of Proteins

The UbiJ(6his)-UbiK and UbiK proteins were overexpressed and purified as previously described (Loiseau et al., 2017). Overexpression of UbiJ-SCP2 was performed in BL21 (DE3) *E. coli* strain transformed with the previously reported pETDuet-ubiJ(Δ 121–201) (Loiseau et al., 2017). Cells were grown with shaking (200 rpm) at 37°C, in lysogeny broth (LB) medium containing ampicillin (100 μ g/ml), until they reached $OD_{600} = 0.4$, at which point overexpression was induced by addition of lactose (5.8 mM). After induction, cells were grown for 17 hours at 16°C, and then harvested by centrifugation at 5,000 g for 10 min. All subsequent operations were carried out at 4°C. Cells were resuspended in 5 volumes of buffer D (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and lysed by sonication (Branson Digital Sonifier, Amplitude 40% for 10 min). Crude extracts were then submitted to ultracentrifugation at 180,000 g for 90 min (Optima XPN-80, rotor 50.2 Ti, Beckman Coulter). The resulting supernatant was loaded onto a Hitrap Chelating HP column (5 mL, GE Healthcare) equilibrated with buffer D. The Hitrap Chelating HP column was washed with buffer D supplemented with 25 mM imidazole and subsequently eluted with 300 mM imidazole in buffer D. The most pure UbiJ-SCP2 fractions were pooled and loaded onto a HiLoad 26/600 Superdex 75 μ g equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl. The main peak fractions were pooled, frozen in liquid N2 and stored at -80°C.

Crystallization

Crystals were grown at 19°C by the hanging drop vapor diffusion method. Initial reservoir crystallization hit consisted of 18% PEG 8000, 200 mM calcium acetate hydrate with 100 mM sodium cacodylate trihydrate pH 6.5. Crystal growth was observed in high protein concentration of no less than 15 mg/mL. The reservoir condition was optimized for best crystal growth to consist of 11% PEG 8000, 225 mM calcium chloride with 100 mM MMT buffer pH 9 (MMT is DL-malic acid/MES/Tris base mixed at a ratio of 1/2/2 and pH-adjusted with sodium hydroxide). Rod-like crystals grew within the precipitate overnight. All crystals were cryoprotected in a solution similar to the reservoir solution containing 20% PEG 400 prior to flash freezing. Best diffraction of these crystals led to the initial 2.5 Å dataset (PDB code 6H6P). Derivatisation of these crystals led to lower resolution diffraction and poor anomalous signal. These crystals were used for seeding which led to more consistent crystal shape however after these conditions had been left for over a month a more cubic shaped crystal form appeared in the condition. This new crystal form diffracted to 1.7 Å (PDB code 6H6O) and when used for seeding resulted in cubic crystal growth at a much lower protein concentration of 2.5 mg/ml. These crystals natively diffracted well and were used for derivatisation using various heavy atom compounds. Polyvalan crystallophore No1 was used in cocrystallisation and resulted in crystals diffracting to 2 Å with significant anomalous signal allowing phasing of the data for structure determination (PDB code 6H6N).

Data Collection and Structure Determination

All crystals belong to the space group P212121. The 2.5 Å dataset has a unit cell parameters of $a = 47.69$ Å; $b = 94.55$ Å; $c = 115.66$ Å, and four molecules per asymmetric unit. The 1.7 Å has a unit cell parameters of $a = 48.6$ Å; $b = 67.87$ Å; $c = 74.60$ Å, and the 2.05 Å dataset has a unit cell parameters of $a = 48.30$ Å; $b = 67.93$ Å; $c = 73.08$ Å, and both have two molecules per asymmetric unit. The 2.5 Å X-ray diffraction data were collected from single crystal at 100 K on the EIGER X9M detector on beamline Proxima 2 at the Soleil synchrotron radiation source, Paris. The 1.7 Å and 2.05 Å X-ray diffraction data were collected from single crystals at 100 K on the Pilatus detector on beamline Proxima 1 at the Soleil synchrotron radiation source, Paris. Data were processed and scaled using the package XDS (Kabsch, 2010). Anisotropy and diffraction limits were set using the program STARANISO (Bricogne et al., 2017). Phases were obtained from 2 Terbium sites in the 2.05 Å dataset using SHELX (Sheldrick, 2015). Model was automatically built using Buccaneer and further manual building using the program Coot (Cowtan, 2006; Emsley et al., 2010) with refinement performed using BUSTER (Bricogne et al., 2017). This model was then used to molecularly replace the two other datasets for their further modelling and refinement using the same methods. The CCP4 software suite was also used in processing of data and Pymol was used in production of images including the CAVER3 plugin for cavities (Chovancova et al., 2012; Pavelka et al., 2016; Winn et al., 2011).

¹³C₆-UQ₈ Biosynthesis Activity Assay

ΔubiC cells from an overnight preculture were inoculated at OD_{600} 0.15 in 100 mL MSG medium. The cells were cultured at 37°C, 200 rpm until OD_{600} 1, at which point chloramphenicol (200 μ g/mL) was added and incubation continued for 20 min. Then, the cells were transferred to a screw cap flask fitted with two plastic tubing through which the culture was purge with argon for 5 min. 10 μ M ¹³C₇-4-HB was added, the cells were maintained under argon at 37°C and initial experiments following the biosynthesis of ¹³C₆-OPP at different incubation time established that 10 min labeling with ¹³C₇-4-HB was optimal (Figure S1B). Cells were cooled down on ice under argon. In all subsequent steps carried out under normal atmosphere, care was taken to maintain the cells at 4°C in order to avoid conversion of ¹³C₆-OPP into ¹³C₆-UQ₈. Cold cells were collected by centrifugation at 3,200 g, 4°C, 10 min and resuspended in 10 mL cold standard buffer (50 mM Tricine pH 7.5, 5 mM MgSO₄, 10 mM β -mercaptoethanol).

For the *in vivo* assay, the cells were diluted five-fold in MSG medium containing 200 μ g/mL chloramphenicol and incubated at 37°C either in normal atmosphere with 180 rpm shaking or under argon, a condition in which ¹³C₆-UQ₈ did not form. For the *in vitro* assay, cells in standard buffer were ruptured by 3 passages through French press (1500 psi) and debris were eliminated by centrifugation at 8,000 g for 20 min at 4°C. The cell free lysate was either directly assayed by adding 2 mM NADH, 2 mM SAM and incubating at 30°C with occasional shaking or ultracentrifuged at 150,000 g, 4°C for 90 min. The supernatant corresponding to the soluble fraction was taken and the membrane pellet was resuspended in a volume of standard buffer equal to that of the supernatant. 300 μ L fractions

were assayed by adding 2 mM NADH and 2 mM SAM and incubating at 30°C with occasional shaking. The reactions were stopped by placing the samples at -20°C prior to lipid extraction and HPLC-ECD-MS analysis.

Lipid Extraction and Quinone Analysis

Quinone extraction from cell pellets and quantification by HPLC-ECD-MS analyses were performed as previously described (Loiseau et al., 2017). Aliquots of glycerol gradient fractions (250 μ L) or of membrane (100 μ L) and soluble fractions (400 μ L) were extracted twice in glass tubes with 3 mL methanol, 30 μ L KCl 3M and 2*2 mL p-ether. Depending on the separation needed, mobile phase 1 (40% ethanol, 40% acetonitrile and 20% of a mix of 90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), 0.1% TFA) or mobile phase 2 (50% methanol, 40% ethanol and 10% of a mix of 90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), 0.1% TFA) were used at a flow rate of 1 mL/min with a BetaBasic-18 column. MS detection was on a MSQ spectrometer (Thermo Scientific) and electrospray ionization in positive mode used a probe temperature of 400°C and a cone voltage of 80V. Single ion monitoring (SIM) detected the following compounds: OPP (M+NH₄⁺), m/z 656.0-656.8, 5-10 min, scan time 0.2 s; ¹³C₆-OPP (M+ NH₄⁺), m/z 662.0-662.8, 5-10 min, scan time 0.2 s; DMQ₈ (M+NH₄⁺), m/z 714.0-714.8, 6-10 min, scan time 0.2 s; UQ₈ (M+NH₄⁺), m/z 744.0-744.8, 6-10 min, scan time 0.2 s; ¹³C₆-UQ₈ (M+Na⁺), m/z 755.0-755.8, 6-10 min, scan time 0.3 s; UQ₁₀ (M+NH₄⁺), m/z 880.2-881.2, 10-17 min, scan time 0.2 s. For some analyses, 0.1mM methylamine was added to the methanol of mobile phase 2, in which case the probe temperature was 450°C and SIMs were set as follows: UQ₈ (M+CH₃NH₃⁺), m/z 758.0-758.8, 6-10 min, scan time 0.2 s; ¹³C₆-UQ₈ (M+CH₃NH₃⁺), m/z 764.0-764.8, 6-10 min, scan time 0.3 s; UQ₁₀ (M+CH₃NH₃⁺), m/z 894.2-895.2, 10-17 min, scan time 0.2 s. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time of 0.3 s. UV detection at 247 nm was used to quantify DMK₈ and MK₈. Peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis of the recovery of the UQ₁₀ internal standard and were then normalized either to cell's wet weight, or to total proteins (soluble and membrane fractions), or to quantity of purified protein, or to the total content of the fraction deposited on glycerol gradients. The peak of UQ₈ obtained with electrochemical detection was quantified with a standard curve of UQ₁₀ (Hajj Chehade et al., 2013).

Purification of the Ubi Complex

Ubi-SPA and WT strains were cultured in 1 L LB medium (2 L flasks) with shaking (200 rpm) at 37°C until OD₆₀₀ = 2.5-3. Soluble fractions were prepared in 10 mL lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM DTT) with 1X anti-protease (sigmaFAST protease inhibitor). The subsequent two steps purification procedure was carried out at 4°C with ice cold buffers and we indicate below the names of the fractions analyzed in Figures S2C-S2G. 100 μ L of anti-Flag M2 agarose beads (Sigma) were first washed with 10 mL lysis buffer (without DTT) and the beads were added to the ultracentrifugation supernatant in a 15 mL Falcon tube. The mixture was rotated moderately (20 rpm) for 3h, then transferred to a 10 mL disposable chromatography column (EconoPac, BioRad) and the unbound material was eluted by gravity (FT-FLAG). The resin was washed with 30 mL lysis buffer (W1) followed by 30 mL TEV cleavage buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl and 0.2 mM EDTA) (W2). The 3X FLAG motif was cleaved by adding 500 μ L of TEV cleavage buffer containing 1X anti-protease, 1 mM DTT and 50 μ g Tobacco Etch Virus protease (TEV) and by incubating overnight under rotation. The next day, the eluate was drained into a fresh Eppendorf tube (E1-TEV).

Prior to use, 100 μ L of Calmodulin-Sepharose 4B beads were transferred into a 15 mL tube (Falcon), washed twice in batch with 10 mL of CBP binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl and 2 mM CaCl₂) and the beads were suspended in 500 μ L of TEV cleavage buffer containing 2 mM CaCl₂ and 10 mM β -mercaptoethanol. The beads suspension was added to the eluate recovered after TEV cleavage and the mixture was rotated for 3h in an Eppendorf tube. The sample was transferred to a 1.5 mL chromatography column (Mini-columns, Evergreen Scientific) and the unbound fraction was drained by gravity (FT-CBP). The beads were then washed 5 times with 500 μ L of calmodulin washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol) (W1-W5). The bound proteins were eluted in five fractions of 100 μ L using the calmodulin elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 200 mM NaCl, 3 mM EGTA, 10 mM β -mercaptoethanol) (E1-E5).

Glycerol Gradient Fractionation

1 mL soluble fractions of Ubi-SPA strains were deposited on 10 mL linear glycerol gradients prepared using two glycerol solutions (densities 1.025 and 1.110) in modified buffer A (50 mM Imidazole/HCl pH=7, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). Fractions of 0.5 mL were collected manually from the bottom of the tubes after centrifugation for 15h at 120,000 g and 4°C in a swinging bucket rotor (Beckman SW-41). 15 μ L of each fraction were analyzed by SDS-PAGE, SPA-tagged proteins were immunodetected and the reproducibility of the gradients was verified by immunodetection of GAPDH. Quinone quantification in glycerol gradient fractions was measured from 200 μ L aliquots.

Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses

Proteins were in-gel digested using trypsin as described in (Barral et al., 2017). The resulting peptides were analyzed by online nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Ultimate 3000 nano RSLC and Q-Exactive HF, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. Peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific) and separated on a 75 μ m x 250 mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μ m, Dr. Maisch). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6.0) through concomitant searches against Uniprot (Escherichia coli K12 taxonomy), classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (<http://proline.profipteomics.fr>) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide identification

FDR < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, minimum peptide score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group) before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples. Proteins were considered as potential partners of the bait if they were identified only in the positive co-IPs with a minimum of 5 specific spectral counts or enriched at least 10 times in positive co-IPs compared to control ones on the basis of specific spectral counts.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

See each individual method and figure legends for the associated statistical analysis. In general, p-values were calculated using an unpaired, two-tailed, Student's t-test. In all cases, n represents independent replicates of an experiment.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

The accession number for the mass spectrometry proteomics data reported in this paper is PRIDE: PXD010396.

The accession numbers for the crystal structures of the SCP2 domain of UbiJ reported in this paper are PDB: 6H6N, 6H6O and 6H6P.

Chapitre IV

**Caractérisation biochimique de
nouvelles protéines impliquées
dans la biosynthèse de
l'ubiquinone en anaérobiose chez *E.*
coli : UbiT, UbiU, UbiV**

I. Introduction

La voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* comporte trois réactions d'hydroxylation catalysées par les hydroxylases aérobies UbiI, UbiF et UbiH, qui sont toutes des monooxygénases dépendantes de la flavine (Alexander and Young 1978, Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013). Il a été démontré que le dioxygène O₂ était la source des groupements hydroxyles ajoutés sur le noyau aromatique des intermédiaires de l'ubiquinone (Alexander and Young 1978). Bien que la ménaquinone et la déméthylménaquinone soient considérées comme des quinones anaérobies, car elles fonctionnent principalement dans la respiration anaérobie, et que l'ubiquinone soit considérée comme une quinone aérobie, car elle fournit des électrons principalement aux réducteurs qui réduisent l'oxygène, Alexander et ses collègues ont déjà démontré il y a plus de 40 ans que l'ubiquinone était quand même synthétisée en absence d'oxygène, suggérant une voie alternative de la biosynthèse de l'ubiquinone de manière indépendante de l'oxygène (Alexander and Young 1978).

En collaborant avec l'équipe grenobloise du Dr. Fabien Pierrel et Dr. Ludovic Pelosi (UMR5163, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Grenoble Alpes Université) et celle marseillaise du Pr. Frédéric. Barras, Laurent Loiseau et Laurent Aussel (UMR7283, Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille), nous avons mis en évidence l'existence d'une voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. Cette voie repose sur trois nouvelles protéines : UbiT, UbiU et UbiV. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans *mBio* en 2019 (Pelosi, Vo et al. 2019). La première partie de ce travail présente la découverte et les études *in vivo* de ses trois gènes. La deuxième partie de ce travail présente les études biochimiques des protéines UbiT, UbiU et UbiV.

II. Résultats

II.1 Découverte et caractérisations génétiques des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* d'*E.coli*

Cette première partie des travaux a été effectuée par nos collaborateurs, le Dr. Fabien Pierrel et le Dr. Ludovic Pelosi (Grenoble), concernant la mise en évidence *in vivo* de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. Cette voie alternative nécessite la participation de trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*. Pour faciliter la visualisation, la voie de biosynthèse de l'ubiquinone est présentée encore une fois dans la figure 41A.

II.1.1 4-Hydroxybenzoate (4-HB) - le précurseur de la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie

Le 4-HB a été démontré comme le précurseur de l'ubiquinone en aérobie depuis les années soixante (Cox and Gibson 1964). En effet, un mutant $\Delta ubiC$ d'*E. coli* perdant la capacité de synthétiser le 4-HB (Siebert, Severin et al. 1994) est déficient en ubiquinone et est complétement réparé par addition de 4-HB dans le milieu de culture (Payet, Leroux et al. 2016). Le 4-HB serait-il également le précurseur de l'ubiquinone dans la voie de biosynthèse indépendante de l'oxygène ? Pour cela, une souche $\Delta ubiC$ a été cultivée dans les conditions anaérobiques. Une diminution du taux d'ubiquinone a été observée dans cette souche et le taux de la souche sauvage a été partiellement récupéré par une supplémentation en 4-HB (Fig. 41B).

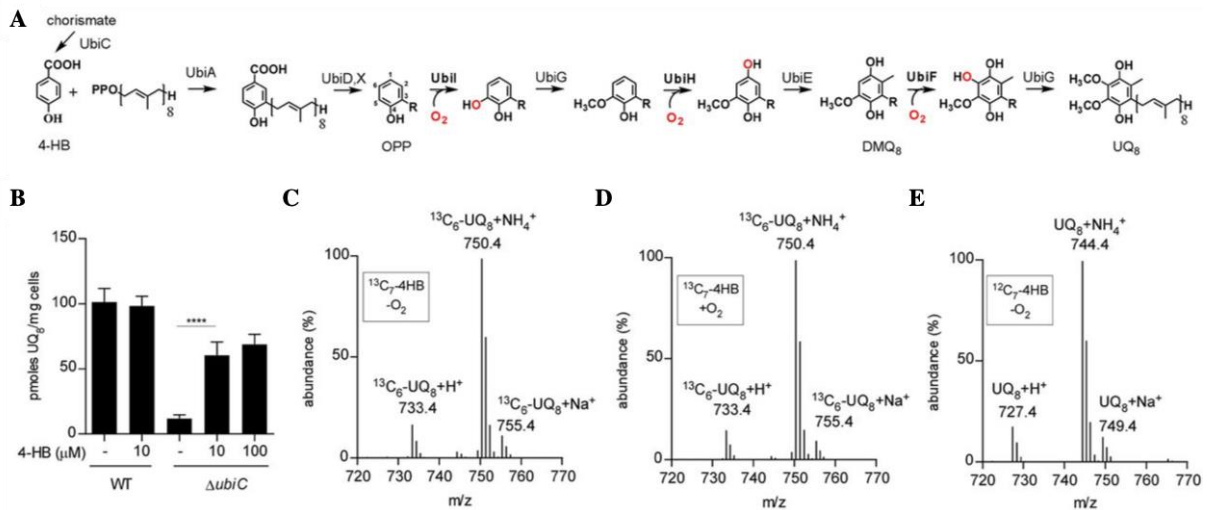


Figure 422. Identification du 4-HB comme précurseur de l'ubiquinone dans la voie de biosynthèse indépendante de l'oxygène. (A) La voie de biosynthèse dépendante de l'oxygène de l'ubiquinone. (B) Quantification de l'ubiquinone dans les cellules sauvage (WT) et $\Delta ubiC$ cultivées en anaérobie supplémentées ou non avec du 4-HB en concentrations indiquées. (C à E) Spectres de masse de l'ubiquinone obtenus par les analyses en HPLC-MS des extraits lipidiques des cellules cultivées avec du ¹³C₇-4-HB en anaérobie (C), en aérobie (D) ou en anaérobiose avec du 4-HB non marqué (E).

De plus, la souche $\Delta ubiC$ a été cultivée dans un milieu additionné de ¹³C₇-4-HB et le marquage de l'ubiquinone biosynthétisée a été analysé par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à spectrométrie de masse (HPLC-MS). Dans les cellules cultivées dans des conditions aérobie ou anaérobiques, la forme marquée de l'ubiquinone (¹³C₆-UQ₈) représente 98.3% et 97.3% ($\pm 0.2\%$) du pool total de l'ubiquinone (Fig. 41C et 41D). Au contraire, les cellules $\Delta ubiC$ cultivées en anaérobie avec du 4-HB non marqué ne présente pas de ¹³C₆-UQ₈ (Fig. 41E). Tous ces résultats démontrent que le 4-HB est le précurseur de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène.

II.1.2 Les enzymes Ubi, à l'exception des hydroxylases, sont communes aux voies de biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie et en anaérobie

Le fait que le 4-HB est le précurseur de l'ubiquinone dans les deux voies alternatives suggère que dans la voie de biosynthèse en anaérobie, le 4-HB est décoré avec les mêmes groupes chimiques de manière indépendante de l'oxygène. Nos collaborateurs ont donc évalué si les enzymes de la voie aérobie sont également impliqués dans la voie indépendante de l'oxygène en mesurant la teneur en ubiquinone des souches KO cultivées dans les conditions aérobie et anaérobie. Les souches $\Delta ubiA$, $\Delta ubiE$ et $\Delta ubiG$ ne sont pas capables de synthétiser l'ubiquinone que ce soit en aérobie ou en anaérobie, alors que les souches $\Delta ubiB$, $\Delta ubiD$ et $\Delta ubiX$ en synthétisent en quantité limitée mais uniquement dans des conditions aérobie (Fig. 2A). En revanche, les délétions des gènes *ubiJ* et *ubiK* n'ont aucun effet sur la biosynthèse de l'ubiquinone dans des conditions anaérobie (Fig. 42A). Ceci montre que les protéines UbiA, UbiE et UbiG sont impliqués dans la biosynthèse aérobie de même que dans la biosynthèse anaérobie, alors que UbiJ et UbiK ne sont pas impliqués dans la voie anaérobie.

Nous avons vu que les réactions d'hydroxylation sont catalysées par les monooxygénases dépendantes du FAD (UbiF, UbiH et UbiI) qui utilisent le dioxygène comme co-substrat (Alexander and Young 1978, Kwon, Kotsakis et al. 2000, Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013). En effet, les mutants $\Delta ubiF$, $\Delta ubiI$ ou $\Delta ubiH$ ne sont pas capables de synthétiser l'ubiquinone uniquement dans les conditions aérobie, mais en synthétisent dans les conditions anaérobie (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013), ce qui correspond à l'existence d'un système alternatif qui est responsable des réactions d'hydroxylation dans la voie indépendante de l'oxygène (Alexander and Young 1978).

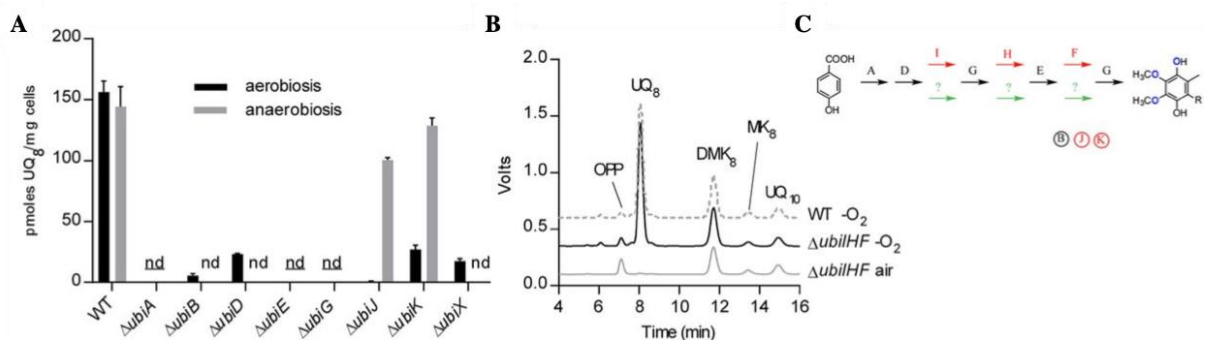


Figure 423. Implication des protéines Ubi dans les voies de biosynthèse de l'ubiquinone en aérobie et en anaérobie. (A) Quantification de l'ubiquinone à partir de cellules sauvages (WT) et Δubi cultivées en anaérobie pendant une nuit ou en aérobie jusqu'à atteindre une DO de 0.8. nd, non détecté dans les conditions aérobie et anaérobie; nd, non détecté dans les conditions anaérobie. (B) Analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques des cellules sauvages (WT) ou $\Delta ubiIHF$ cultivées en aérobie (air) ou anaérobie (-O₂). (C) Biosynthèse de l'ubiquinone est présentée avec les enzymes Ubi spécifiques

à la voie dépendante de l'oxygène (rouge), à la voie indépendante de l'oxygène (vert) ou commune aux deux voies (noire). Le même code couleur s'applique aux facteurs accessoires (entourés).

Et finalement, nos collaborateurs ont confirmé que les trois hydroxylases aérobiques *UbiI*, *UbiF* et *UbiH* ne sont pas indispensables pour la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène, puisqu'un triple mutant $\Delta ubiF \Delta ubiI \Delta ubiH$ est déficient en ubiquinone lorsqu'il est cultivé en aérobic, alors qu'il synthétise l'ubiquinone au même niveau que les cellules sauvages dans les conditions anaérobiques (Fig. 42B).

Tous ces résultats démontrent que les deux voies biosynthétiques de l'ubiquinone dépendantes et indépendantes de l'oxygène partagent les enzymes impliquées dans les réactions de prénylation (*UbiA*), de décarboxylation (*UbiX* et *UbiD*) et de méthylation (*UbiE* et *UbiG*), mais diffèrent par leurs hydroxylases et les facteurs accessoires *UbiJ* et *UbiK* (Fig. 42C).

II.1.3 Identification de trois gènes nécessaires à la biosynthèse d'ubiquinone en anaérobic

Afin d'identifier les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène, une collection d'environ 200 souches d'*E. coli* contenant des délétions couvrant plusieurs gènes ont été cultivées en anaérobic (Hashimoto, Ichimura et al. 2005, Mizoguchi, Sawano et al. 2008) et leur contenu en ubiquinone a été analysé par HPLC-électrochimique (HPLC-ECD). Ces souches proviennent de la banque Keio.

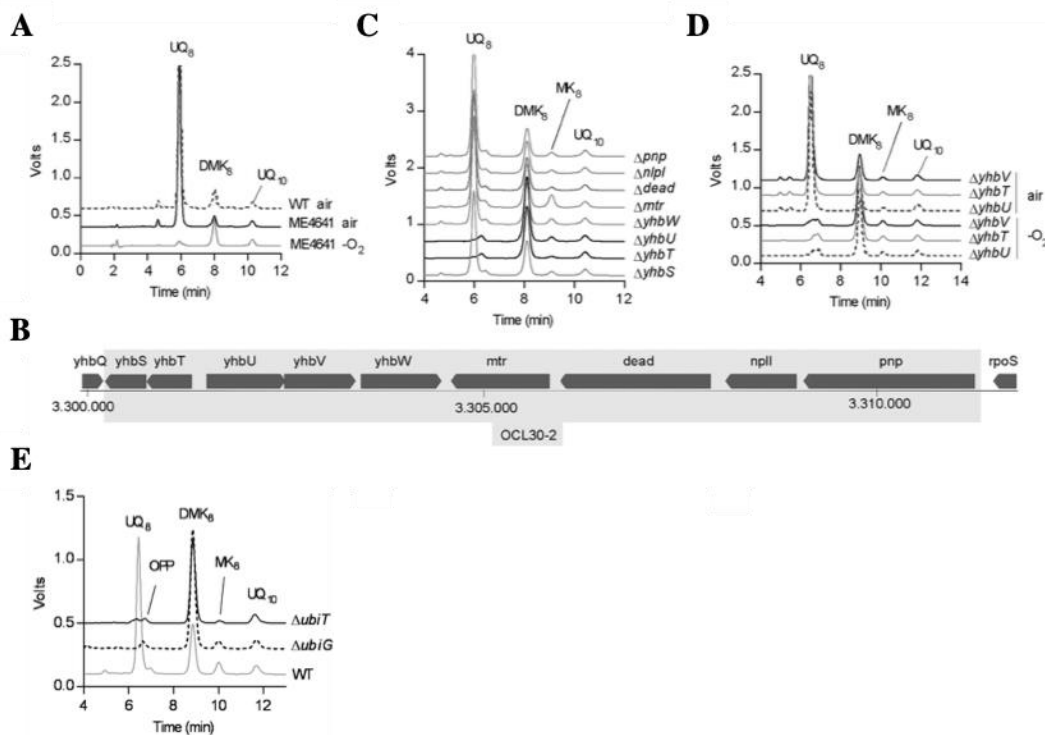


Figure 424. Découverte de trois gènes *ubiT*, *ubiU*, *ubiV* qui sont essentiels pour la voie de biosynthèse indépendante de l'oxygène de l'ubiquinone. (A) Analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques de la souche ME4641 cultivée en anaérobic

(air) ou en anaérobiose (-O₂). (B) Région génomique couverte par la délétion de OCL30-2 dans la souche ME4641. (C) Analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques des souches dont chaque gène individuel couverts par la délétion de OCL30-2 a été inactivé et cultivés en anaérobiose. (D) Analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques de souches $\Delta yhbT$, $\Delta yhbU$ et $\Delta yhbV$ construits dans la souche MG1655 et cultivés en aérobie (air) ou en anaérobiose (-O₂). (E) Analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques des cellules sauvage (WT), $\Delta ubiT$ et $\Delta ubiG$ cultivés en anaérobiose.

Une absence complète de l'ubiquinone a été observée dans les souches ME4561, ME5034 et ME4746 portant des délétions englobantes respectivement *ubiE-ubiJ-ubiB-ubiD*, *ubiG* et *ubiX*. Fait très intéressant, la souche ME4641 n'est pas capable de synthétiser l'ubiquinone uniquement en anaérobiose (Fig. 43A), ce qui suggère que seule la voie indépendante de l'oxygène est altérée. ME4641 contient une délétion nommée OCL30-2 qui couvre 9 gènes, dont 5 n'ont pas de fonction identifiée (Fig. 43B). Pour trouver le gène candidat impliqué dans la biosynthèse anaérobique de l'ubiquinone, 8 souches KO monogéniques de la collection Keio ont été cultivés en anaérobiose (Baba, Ara et al. 2006) et leur contenu analysé en quinone (Fig. 43C).

Les souches $\Delta yhbT$ et $\Delta yhbU$ sont fortement déficientes en ubiquinone. Nos collaborateurs ont ensuite transféré les mutations $\Delta yhbT$ et $\Delta yhbU$ des souches Keio (qui est la souche d'*E. coli* K-12 BW25113) dans la souche MG1655 et ils ont également construit la souche $\Delta yhbV$, qui n'est pas disponible dans la collection Keio. Ces trois souches synthétisent l'ubiquinone à un niveau très faible lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions anaérobiques, mais montrent des niveaux normaux dans les conditions aérobiques (Fig. 43D, Tableau 10). De plus, les souches mutantes présentent 2 fois moins de MK₈ et 2 fois plus de DMK₈ dans les conditions anaérobiques (Tableau 10). Cet effet pourrait résulter indirectement du déficit en ubiquinone, comme il a également été observé dans la souche $\Delta ubiG$ (Fig. 43E).

Culture condition	Strain	Quinone content		
		UQ ₈ (pmol/mg cells)	DMK ₈ (247-nm peak area/mg cells)	MK ₈ (247-nm peak area/mg cells)
Air	WT	208 ± 9.4	0.94 ± 0.26	0.15 ± 0.09
Air	$\Delta yhbT$	193.9 ± 12.4	1.34 ± 0.05	0.13 ± 0.03
Air	$\Delta yhbU$	233.8 ± 16.2	0.9 ± 0.26	0.16 ± 0.09
Air	$\Delta yhbV$	227.9 ± 25.1	0.93 ± 0.15	0.13 ± 0.04
Anaerobic	WT	114.2 ± 19.1	1.28 ± 0.4	0.41 ± 0.15
Anaerobic	$\Delta yhbT$	3.3 ± 0.4	2.88 ± 0.47	0.17 ± 0.01
Anaerobic	$\Delta yhbU$	6.1 ± 3.3	2.55 ± 0.55	0.19 ± 0.01
Anaerobic	$\Delta yhbV$	7.3 ± 4.7	2.61 ± 0.49	0.21 ± 0.01
Anaerobic	$\Delta yhbT$ +pK	2 ± 0.4	2.46 ± 0.33	0.16 ± 0.04
Anaerobic	$\Delta yhbT$ +pK-yhbT	64.6 ± 16.1	1.77 ± 0.29	0.3 ± 0.04
Anaerobic	$\Delta yhbU$ +pBAD	1 ± 0.6	2.29 ± 0.58	0.18 ± 0.04
Anaerobic	$\Delta yhbU$ +pBAD-yhbU	82 ± 15.9	1.2 ± 0.18	0.27 ± 0.04
Anaerobic	$\Delta yhbV$ +pBAD	2.2 ± 3.5	2.14 ± 0.15	0.23 ± 0.01
Anaerobic	$\Delta yhbV$ +pBAD-yhbV	120.4 ± 18.5	1.87 ± 0.19	0.42 ± 0.06

Tableau 60. Teneur en quinone des souches sauvages et Δyhb cultivés en aérobie ou en anaérobiose.

II.1.4 La suppression de *yhbT*, *yhbU* ou *yhbV* résulte d'un déficit en ubiquinone spécifiquement dans des conditions anaérobiques

Les souches KO sont transformées par un vecteur vide ou un vecteur portant un allèle sauvage (WT) du gène étudié. Nous avons observé, dans les souches Δyhb exprimant le gène correspondant, une complémentation du déficit en ubiquinone (Tableau 10) et une augmentation du taux d'octaprénylphénol (OPP), intermédiaire précoce de la biosynthèse de l'ubiquinone (Fig. 44A). L'accumulation de l'OPP dont le taux est multiplié par un facteur 2 environ dans les mutants $\Delta yhbT$, $\Delta yhbU$ et $\Delta yhbV$ par rapport à la souche WT suggère que la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène est bloquée en aval de l'OPP dans ces souches.

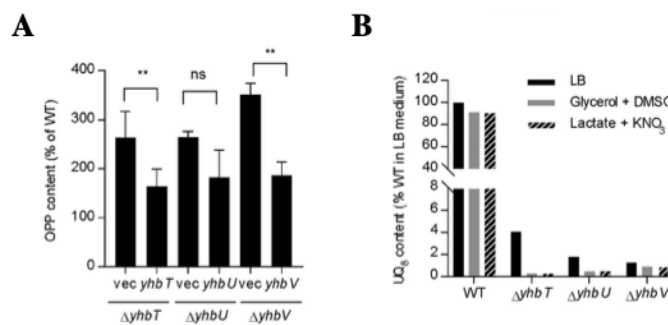


Figure 425. (A) Teneur en OPP (en % de WT) dans les cellules Δyhb transformées par un vecteur vide (vec) ou un vecteur portant le gène indiqué et cultivées en anaérobie. (B) Teneur en ubiquinone (en % de WT cultivé dans du milieu LB) de cellules cultivées en anaérobie dans le milieu contenant les sources de carbone et accepteurs d'électrons indiqués.

Dans ces expériences, aucune complémentation croisée n'a été observée : par exemple, le plasmide contenant *yhbV* n'a aucun effet sur les souches $\Delta yhbT$ ou $\Delta yhbU$, ce qui suggère l'absence de redondance dans la fonction de chaque gène. Nous avons également observé un déficit profond en ubiquinone lorsque les souches $\Delta yhbT$, $\Delta yhbU$ et $\Delta yhbV$ sont cultivées en anaérobie dans divers milieux (glycérol + DMSO, lactate + KNO₃) (Fig. 44B), ce qui montre que le défaut de biosynthèse de l'ubiquinone n'est pas lié à une source particulière de carbone ou d'accepteur d'électrons. Tous ces résultats démontrent que les gènes *yhbT*, *yhbU* et *yhbV* font partie de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène, d'où viennent les noms *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*, respectivement.

II.1.5 Absence totale de biosynthèse d'ubiquinone dans les mutants $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ cultivés dans les conditions anaérobiques strictes

Comme les souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ synthétisent encore une petite quantité de l'ubiquinone dans les conditions anaérobiques (Tableau 10 et Fig. 44B), nous nous sommes demandé comment elle a été synthétisée. Pour vérifier si la voie dépendante de l'oxygène contribuait à cette synthèse, le gène *ubiH* a été inactivé dans la souche $\Delta ubiU$. Par HPLC-MS,

une absence complète de l'ubiquinone a été détectée dans les extraits des cellules $\Delta ubiH$ $\Delta ubiU$ (Fig. 45A). Ce résultat corrobore que la petite quantité d'ubiquinone synthétisée dans les cellules $\Delta ubiU$ provient de la voie dépendante de l'oxygène et suggère que notre milieu anaérobique contient quelques traces d'oxygène ou que la biosynthèse de l'ubiquinone dépendante de l'oxygène se produit lors de la manipulation des cellules, sous atmosphère normale, avant l'extraction des quinones.

Pour éliminer les traces d'oxygène, nos collaborateurs ont pris des précautions supplémentaires lors du dégazage et de l'inoculation des milieux de culture et ils ont également ajouté de la L-cystéine comme réducteur de l'oxygène. De plus, la résazurine a été utilisée comme indicateur d'oxydo-réduction pour vérifier qu'une anaérobie stricte soit présente pendant toute la culture. Du méthanol glacé a également été utilisé lors du traitement des cellules dans le but d'empêcher toutes les biosynthèses possibles d'ubiquinone dépendante de l'oxygène avant l'extraction des quinones.

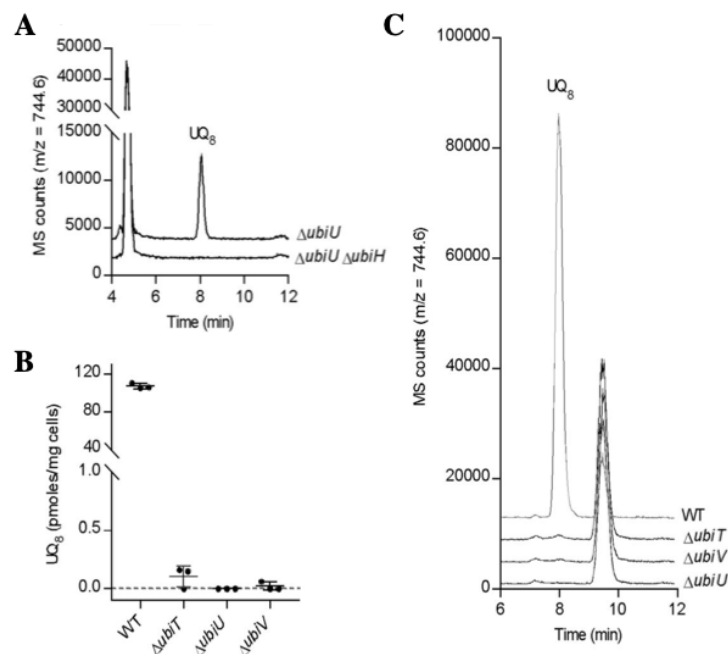


Figure 426. Absence totale de biosynthèse d'ubiquinone dans les mutants $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ cultivés dans des conditions anaérobies strictes. (A) Analyses par HPLC-MS des extraits lipidiques des cellules $\Delta ubiU$ ou $\Delta ubiU \Delta ubiH$ cultivés dans les conditions anaérobiques. (B) Analyses par HPLC-MS des extraits lipidiques des cellules cultivés dans les conditions anaérobiques strictes et trempés dans du méthanol froid. (C) Teneur en ubiquinone des cellules décrites dans le panneau B.

Les analyses HPLC-MS des extraits des cellules cultivées et manipulées dans de telles conditions anaérobiques strictes ont alors montré l'absence complète d'ubiquinone dans les souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ (Fig. 45B et 45C). En revanche, le niveau de l'ubiquinone synthétisée dans la souche sauvage (WT) (Fig. 45C) est comparable à ceux mesurés précédemment dans les cellules sauvages cultivées dans les conditions anaérobiques sous-

optimales (Tableau 10), établissant que la biosynthèse de l'ubiquinone a lieu indépendamment de l'oxygène. Tous ces résultats montrent que les cellules $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ sont incapables de synthétiser l'ubiquinone dans des conditions anaérobies strictes, contrairement aux cellules sauvages. De plus, nos résultats confirment que la faible teneur en ubiquinone précédemment observée dans les souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ (Tableau 10 et Fig. 44B) provenait de la voie dépendante de l'oxygène, dû à une faible contamination en dioxygène du milieu de culture.

II.1.6 Les gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* sont fortement co-occurrents exclusivement dans les génomes portant des signes de leur capacité à synthétiser l'ubiquinone

Nos collaborateurs bioinformaticiens de Grenoble (S. Abby) ont ensuite étudié la distribution des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* dans 5750 génomes de bactéries et des archées et nous observons que ces trois gènes se trouvent uniquement chez les α -, β - et γ -protéobactéries et trois génomes d'*Acidithiobacillia sp.* Il est intéressant de noter que ces trois premières classes sont les seules connues à ce jour à pouvoir produire l'ubiquinone (Schoepp-Cothenet, van Lis et al. 2013), ce qui correspond à un lien spécifique entre la biosynthèse de l'ubiquinone et *UbiT*, *UbiU* et *UbiV*.

Ceci a été confirmé en analysant plus en détail la distribution d'*ubiT*, d'*ubiU* et d'*ubiV* et de trois gènes marqueurs de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone (*ubiA*, *ubiE* et *ubiG*) dans 611 génomes α -, β - et γ -protéobactéries. Nous avons choisi *ubiA*, *ubiE* et *ubiG* car ils sont les plus conservés par rapport aux autres gènes et parce qu'ils font partie à la fois de la voie dépendante et indépendante de l'oxygène (Fig. 42C). 575 génomes possèdent trois gènes *ubiA*, *ubiE* et *ubiG* et 589 en possèdent au moins deux. Concernant la distribution des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*, 221 génomes présentent au moins l'un des trois gènes, et dans 210 cas (95%), les trois gènes sont présents. Il est important de noter que tous les génomes possédant des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* possèdent au moins deux de ces trois gènes. En outre, 22 parmi 29 ordres protéobactériens analysés ont jusqu'à 50% de génomes possédant un jeu complet de trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* (Fig. 46A), démontrant une large distribution taxonomique. Ces analyses indiquent une forte tendance à la co-occurrence des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* et démontrent qu'ils ne se retrouvent que dans des génomes qui ont des signes de la biosynthèse de l'ubiquinone.

Il existe les gènes *ubiA*, *ubiE* et *ubiG* et les gènes des hydroxylases aérobie dans 570 génomes, dont 204 contiennent également les gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* (Fig. 46C). Seules trois espèces, *Phaeosporillum fulvum*, *Magnetococcus marinus* et *Oxalobacter formigenes*,

semblent dépendre exclusivement de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène, car leurs génomes contiennent uniquement les gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* (Fig. 46C). Nous avons remarqué que les gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* se trouvent à côté des autres gènes *ubi* chez *M. marinus* (Fig. 46B). Il est intéressant de noter que *P. fulvum* et *M. marinus* sont capables de synthétiser l'ubiquinone dans des conditions microaérobiques (Hiraishi, Hoshino et al. 1984, Bazylnski, Williams et al. 2013) et que *O. formigenes* est un anaérobe obligatoire (Stewart, Duncan et al. 2004). Tous ces résultats montrent que la voie de la biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène est répandue dans les α -, β - et γ -protobactéries et qu'elle coexiste avec la voie dépendante de l'oxygène dans 98% des cas.

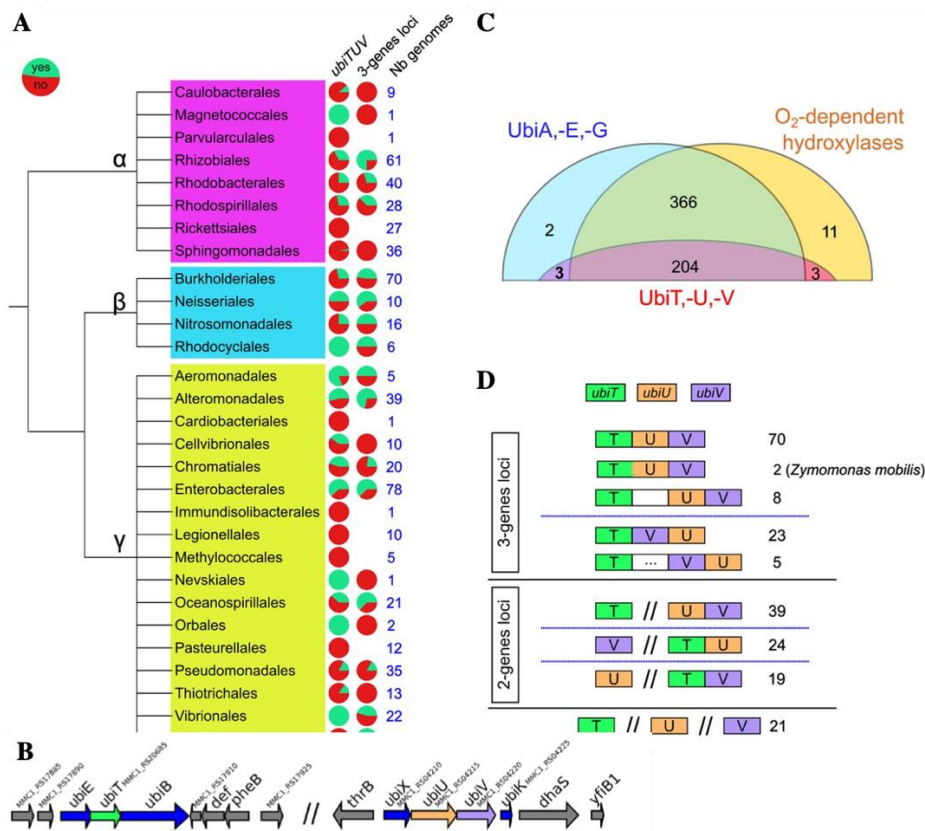


Figure 427. Distribution et architecture génétique des trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* dans les génomes protobactériens. (A) La proportion des génomes avec (vert) et sans (rouge) les trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* (colonne à gauche), est indiquée pour chaque ordre protobactérien connu pour capacité de synthétiser l'ubiquinone. La colonne au milieu (loci à 3 gènes), affiche la proportion des génomes possédant les trois gènes, soit à un seul locus (vert), soit à loci différents (rouge). Le nombre des génomes analysés pour chaque ordre est indiqué dans la colonne à droite. (B) Organisation des trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* chez *M. marinus* (WP_011715033.1). (C) Occurrence des gènes marqueurs (*ubiA*, *ubiE* et *ubiG*), des gènes des hydroxylases aérobieques et des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* dans les génomes protobactériens. Le nombre en gras représente les 3 génomes (*P. fulvum*, *M. marinus* et *O. formigenes*) contenant exclusivement la voie indépendante de l'oxygène. (D) Les architectures génétiques distinctes trouvées pour *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* dans les génomes où les trois gènes sont présents sont affichées sous forme de boîtes avec des couleurs différentes. Le nombre de cas correspondant à chaque architecture décrite est indiqué à droite. La boîte blanche correspond à un gène situé entre les gènes d'intérêt et la boîte blanche avec des points correspond à deux à cinq gènes situés entre les gènes d'intérêt.

Nous avons ensuite examiné le positionnement relatif des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* dans 210 génomes possédant les trois gènes. Nous observons que dans 106 cas, couvrant des α , β - et γ -protéobactéries, les trois gènes se situent les uns à côté des autres (appelés locus à 3 gènes) et 82 cas possèdent des loci à 2 gènes, le troisième gène se trouve ailleurs dans le génome (Fig. 46D). L'évaluation de l'architecture génétique des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* révèle que *ubiU* et *ubiV* se trouvent côte à côte dans 69% des loci (dans tous les loci à 3 gènes et dans 39/82 des loci à 2 gènes) et que les trois gènes se trouvent dans trois parties distinctes du génome dans seulement 21 cas (Fig. 46D). Très intéressant, nous remarquons que chez *Zymomonas mobilis* (α -protéobactérie), les gènes *ubiT* et *ubiU* sont fusionnés, suivis directement en aval du gène *ubiV* (Fig. 46D).

II.1.7 UbiU-UbiV sont nécessaires pour l'hydroxylation de DMQ₈ de manière indépendante de l'oxygène

Nous avons vu que les voies de biosynthèse de l'ubiquinone dépendante et indépendante de l'oxygène diffèrent par les réactions hydroxylations, autrement dit seules les réactions d'hydroxylation restent non caractérisées dans la voie indépendante de l'oxygène (Fig. 42C). Nous avons donc supposé qu'UbiU et UbiV sont impliqués dans ces étapes. Pour tester notre hypothèse, nos collaborateurs ont développé un test *in vivo* basé sur la conversion de la DMQ₈ marquée en UQ₈ marquée de manière indépendante de l'oxygène. Ce test permet de suivre les réactions d'hydroxylation en C6 et de la méthylation ultérieure de l'O6 (Fig. 47A).

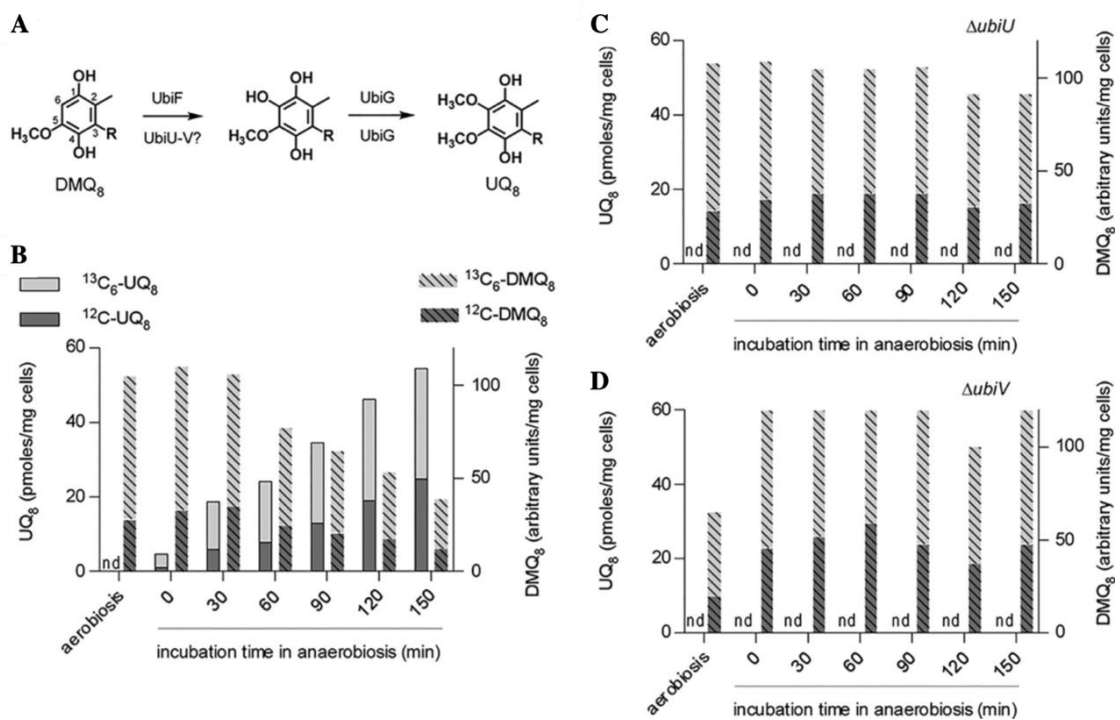


Figure 428. UbiU et UbiV sont nécessaires pour la conversion de DMQ₈ en UQ₈ de manière indépendante de l'oxygène. (A) Conversion de DMQ₈ en UQ₈ par les enzymes des voies dépendante et indépendante de l'oxygène, indiquées

au-dessus et au-dessous les flèches (la numérotation des atomes de carbone indiqué sur DMQ₈ et la queue polyprényle représentée par R). **(B)** Quantification par HPLC-MS de DMQ₈ et UQ₈ non marqués (¹²C) et marqués (¹³C₆) dans des cellules $\Delta ubiC \Delta ubiF$ cultivés en aérobie puis en l'anaérobiose. **(C et D)** Identiques au panneau B mais avec des cellules $\Delta ubiC \Delta ubiF \Delta ubiU$ **(C)** et $\Delta ubiC \Delta ubiF \Delta ubiV$ **(D)**. nd, non détecté

Les cellules $\Delta ubiC \Delta ubiF$ cultivés en aérobie avec du ¹³C₇-4-HB synthétisent la DMQ₈ au, dont 73% sont marqués au ¹³C₆. Lors du transfert des cellules en culture en conditions anaérobiques, les cellules ont progressivement converti une partie importante de ¹³C₆-DMQ₈ en ¹³C₆-UQ₈ (Fig. 47B). L'inactivation des gènes *ubiU* ou *ubiV* dans les cellules $\Delta ubiC \Delta ubiF$ ne perturbe pas l'accumulation de ¹³C₆-DMQ₈, mais empêche la conversion en ¹³C₆-UQ₈ (Fig. 47C et 47D). Ce résultat démontre que les protéines UbiU et UbiV sont essentielles pour la réaction d'hydroxylation en C6 de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène.

II.2 Caractérisations biochimiques des protéines UbiT, UbiU, UbiV et le complexe UbiU-UbiV

II.2.1 UbiT d'*E. coli*

II.2.1.1 Expression et purification

Au début de ma thèse, j'ai construit le plasmide pETDuet-his₆-UbiT qui code pour UbiT avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale clivable à la TEV (his₆-UbiT). Bien que le plasmide ait été testé dans diverses conditions, aucune expression d'UbiT n'a été observée (données non montrées). J'ai ensuite construit une série de différents plasmides afin de tenter d'obtenir l'expression d'UbiT (UbiT-his₆, GST-UbiT, GST-SCP2-UbiT). Cependant, aucune surexpression de la protéine d'intérêt n'a pu être observée, quel que soit les conditions de cultures. Comme évoqué dans le chapitre I, UbiT a été montrée comme substrat de FtsH et le niveau d'expression d'UbiT est stable quand le gène *ftsh* est délé. Nous sommes en train de travailler sur la délétion du gène *ftsh* dans les cellules BL21(DE3) dans le but d'y exprimer UbiT.

En 2018, Groenewold et ses collègues ont réussi à exprimer et purifier la protéine PA3911 de *P. aeruginosa*, l'homologue d'UbiT d'*E. coli*. La protéine PA3911 était fusionnée à la thiorédoxine (Trx) à son extrémité N-terminale (Groenewold, Massmig et al. 2018). Nous avons donc construit le plasmide pET32-UbiT codant pour Trx-UbiT d'*E. coli* et son expression a été testée dans différentes conditions. Trx-UbiT est exprimé et soluble quand les cellules sont lysés dans le tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 500 mM NaCl / 15% glycérol / 5% cholate (Fig. 48A). L'ajout du détergent cholate est indispensable à la solubilisation de la protéine chimère Trx-UbiT. Sans détergent, toute la protéine chimère se trouve dans le culot. La protéine chimère est ensuite purifiée sur une colonne de Ni²⁺ (Fig.

48A) puis une colonne de chromatographie d'exclusion. Cependant, elle se trouve dans le volume mort de la colonne, ce qui signifie que la protéine est sous forme de haut poids moléculaire, probablement sous forme agrégée (Fig. 48B). Le protocole de purification de la protéine chimère Trx-UbiT est en cours d'optimisation afin d'obtenir la forme non agrégée.

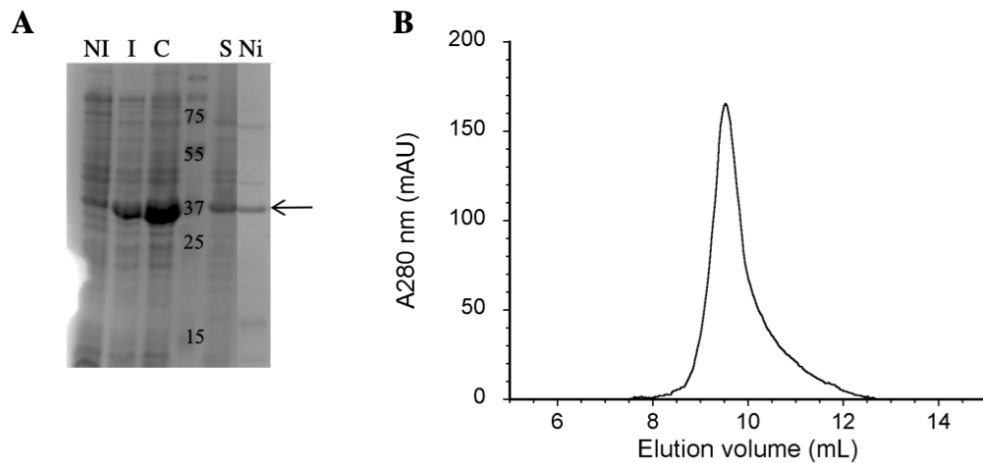


Figure 429. Expression et purification d'UbiT fusionnée à la thiorédoxine (Trx-UbiT). (A) Les cellules BL21(DE3) sont transformées par le plasmide pET32-UbiT codant pour UbiT fusionnée à la thiorédoxine à l'extrémité N-terminale et une étiquette de six histidines et cultivées dans le milieu LB. Le plasmide est induit par IPTG (50 μ M) à une DO 0.5 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 500 mM NaCl / 15% glycérol / 5% cholate, les lysats sont clarifiés par ultracentrifuge et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). La bande correspondante à UbiT est indiquée par la flèche. La protéine est ensuite purifiée par une colonne de Ni^{2+} (Ni). (B) Le chromatogramme de Trx-UbiT sur une colonne d'exclusion S200 10/300 increase (GE Healthcare).

II.2.1.2 Caractérisation bioinformatiques

Bien que pour l'instant, nous ne soyons pas capables de purifier UbiT d'*E. coli*, les analyses bioinformatiques nous donnent quelques informations sur cette protéine.

La partie centrale (acides aminés 45-133) de la protéine correspond à un domaine SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) (Fig. 49A), comme c'est le cas pour UbiJ. Les domaines SCP2 forment généralement une cavité hydrophobe qui lie divers lipides (Burgardt, Gianotti et al. 2017) et notre alignement de séquence a, en effet, montré la présence des acides aminés hydrophobes conservés à plusieurs positions dans le domaine SCP2 d'UbiT (Fig. 49A).

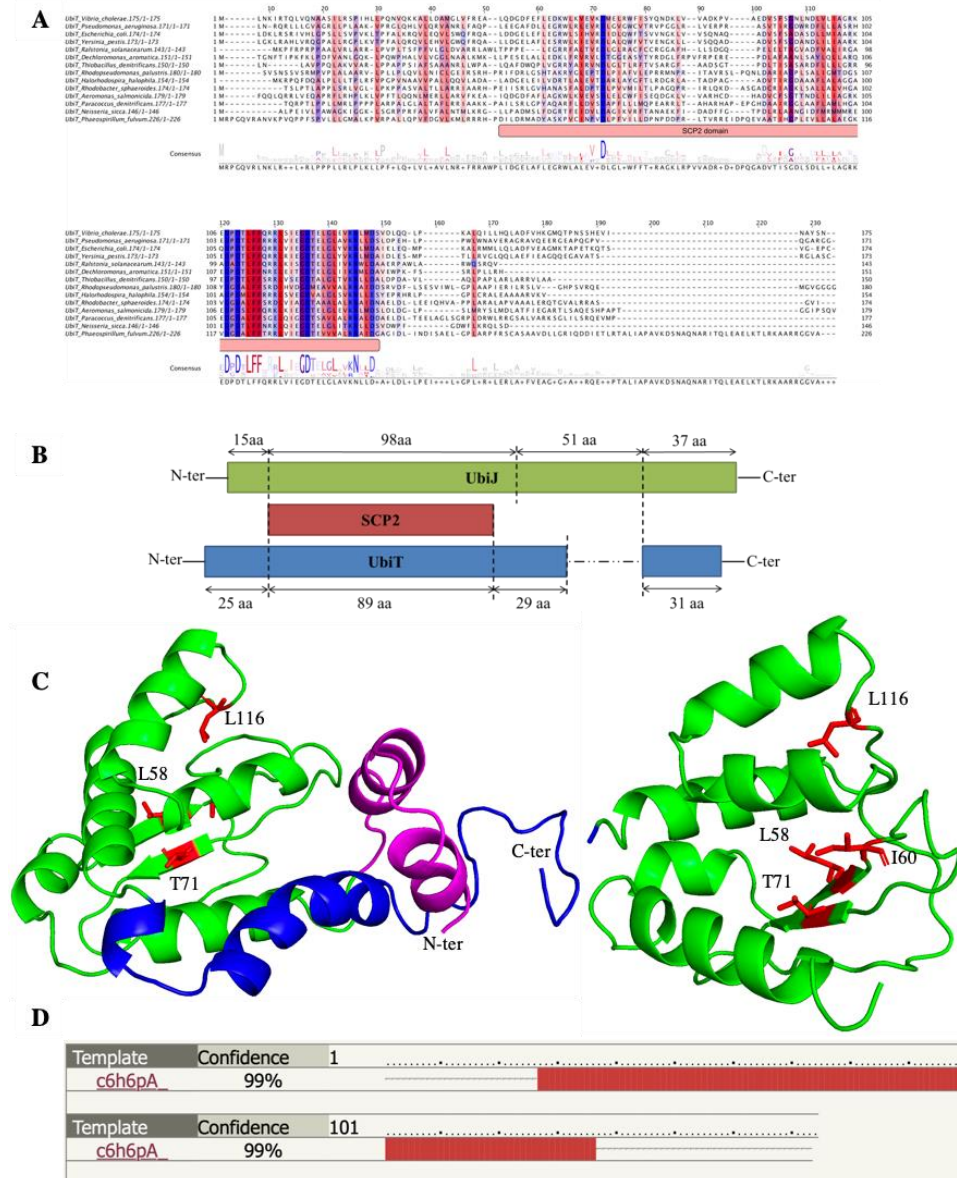


Figure 430. (A) Alignement de multiples séquences d’UbiT à partir de des protéobactéries représentatives. Les résidus hydrophobes sont colorés en rouge. La position du domaine SCP2 est indiquée par un cadre rouge (Pelosi, Vo et al. 2019). (B) Organisation des domaines dans UbiT et UbiJ. UbiT est représenté en bleu, UbiJ en vert et le domaine SCP2 en rouge, les extrémités N-ter et C-ter sont indiqués. (C à D) Modèle structural d’UbiU (Phyre2). (C) La partie centrale (acides aminés 26-136, vert) correspondant au domaine SCP2 est composée de deux feuillets β et de cinq hélices α formant un centre hydrophobe avec une cavité ouverte. Les résidus hydrophobes conservés qui sont importants pour la capacité de fixation aux lipides sont indiqués en rouge. Les extrêmes N-ter et C-ter sont représentés en magenta et bleu, respectivement. A gauche, le modèle entier d’UbiT, à droite, le domaine SCP2 d’UbiT. (D) La construction de la partie centrale repose sur la structure du domaine SCP2 d’UbiJ 6H6N et celle des extrémités N-ter (acides aminés 1-25, magenta) et C-ter (acides aminés 137-174, bleu) est réalisée par modélisation *ab initio*.

Comme évoqué, UbiJ lie des intermédiaires de biosynthèse de l’ubiquinone dans son domaine SCP2 et permet l’organisation d’un complexe multiprotéique composé de plusieurs enzymes Ubi (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019). Chez *E. coli*, UbiT entière partage 21.1% d’identité de séquence avec UbiJ, tandis que son domaine SCP2 (acides aminés 45-133)

partage 20.7% d'identité de séquence avec celui d'UbiJ (acides aminés 15-112) et les deux extrémités C-ter en partagent 30% (acides aminés 164-201 dans UbiJ et 143-174 dans UbiT) (Fig. 49B). Ainsi, UbiT et son domaine SCP2 pourraient remplir des fonctions similaires dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie, car UbiJ est exclusivement impliqué dans la voie en aérobie (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019).

Basé sur la structure du domaine SCP2 d'UbiJ (code PDB 6H6N), nous avons construit un modèle structurel pour UbiT (Fig. 49C). La partie centrale d'UbiT (acides aminés 26-136, partie rouge, Fig. 49C), construite avec une confiance de 99% (Fig. 49D), est composée de deux feuillets β et de cinq hélices α formant un centre hydrophobe avec une cavité ouverte. Les parois de cette cavité sont composées de résidus hydrophobes fournis à la fois par les hélices et les feuillets. Les extrémités N-ter (1-25, partie magenta) et C-ter (137-174, partie bleue), construites par la modélisation *ab initio*, sont composées par des hélices α . Groenewold et ses collègues ont montré que les résidus hydrophobes conservés L56, L58, V69 et L114 de PA3911, homologue d'UbiT chez *P. aeruginosa*, étaient importants pour la capacité de fixation des lipides (Groenewold, Massmig et al. 2018). Ces résidus, correspondant aux L58, I60, T71 et L116 chez *E. coli* (indiqués en rouge Fig. 49C), se trouvent dans la cavité hydrophobe d'UbiT où les lipides se fixent.

II.2.2 UbiU, UbiV et le complexe UbiU-UbiV

II.2.2.1 UbiV d'*E. coli*

II.2.2.2 Expression et purification

J'ai tout d'abord exprimé UbiV avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale (his₆-UbiV), mais malgré différentes conditions de surexpression (température de culture, concentration d'IPTG, présence de chaperones, moment d'induction, etc) la protéine his₆-UbiV s'avère insoluble (données non montrées). J'ai donc choisi de changer le tag His de position et de le placer en position C-terminale.

Les cellules BL21(DE3) ont été tout d'abord transformées par le plasmide pET-22-UbiV codant pour UbiV avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale (UbiV-his₆), puis cultivés dans le milieu LB et le gène *ubiV* est induit à différents DO (0.5 ou 1.8) avec différentes concentrations en IPTG (100 ou 500 μ M) à 16 °C sur la nuit. Elles ont été ensuite lysées par sonication dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation. Différentes fractions (soluble et culot) sont analysées par gel SDS-PAGE (Fig. 50A).

La protéine UbiV-his₆, exprimée dans la meilleure condition (entourée par un cadre rouge sur la Fig. 9A) est ensuite purifiée jusqu'à homogénéité par une chromatographie d'affinité à

Ni²⁺ puis une chromatographie d'exclusion (Fig. 50B). UbiV-his6 se comporte comme monomère en solution et est purifiée avec un rendement de 13 mg d'UbiV-his6/L de culture (données non montrées).

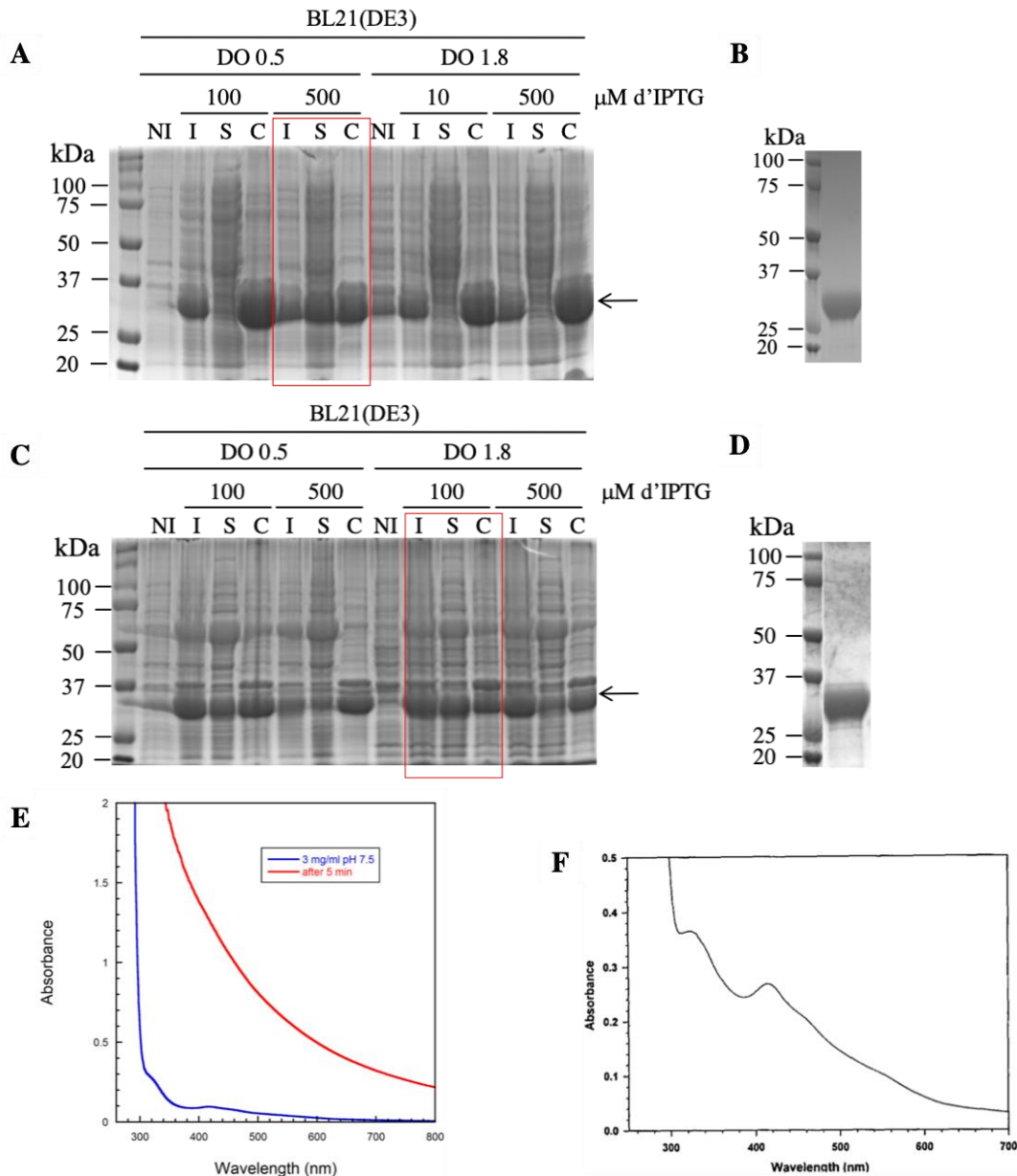


Figure 50. Expression et purification d'UbiV. Les cellules BL21(DE3) sont transformées par le plasmide pET-22-UbiV codant pour UbiV-his₆ (A) ou co-transformées avec le plasmide pGro7 (B) et cultivées dans le milieu LB. Le plasmide est induit par IPTG (100 ou 500 μM) à une DO 0.5 ou 1.8 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées, les lysats sont clarifiés par ultracentrifuge et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). La bande correspondant à UbiV est indiquée par la flèche ; le cadre rouge indique la condition d'expression choisie pour la purification des protéines. (C) et (D) UbiV est purifié par deux étapes de purification (une chromatographie d'affinité à Ni²⁺ et une chromatographie d'exclusion) dans 50 mM Tris-HCl pH 7.5 / 150 mM NaCl. (E) Spectre UV-vis d'UbiV purifiée. La ligne bleue : UbiV (3 mg/ml) fraîchement purifiée, la ligne rouge : après 5 minutes à la température ambiante. (F) Spectre UV-vis d'UbiV purifiée de la sous-unité NQO3 (1.25 mg/ml) (Yano, Yagi et al. 1995).

Bien qu'UbiV-his₆ soit soluble et purifiable par ce protocole et que le rendement soit assez élevé, une partie de la protéine exprimée se trouve dans le culot (Fig. 50A). Le protocole est donc optimisé en co-transformant les plasmides pET-22-UbiV et pGro7 qui code pour les chaperones GroEL (57.3 kDa) et GroES (10 kDa) en présence de L-arabinose. Ces dernières facilitent le repliement des protéines et empêchent leur agrégation. En effet, UbiV-his₆, exprimé dans la meilleure condition (entouré par un cadre rouge sur la Fig. 50C), est ensuite purifié par le même protocole en ajoutant 15% de glycérol avec un rendement plus important de 20 mg d'UbiV-his₆ / L de culture (Fig. 50D).

UbiV est légèrement rose et son spectre d'absorption UV-visible (UV-vis) présente des bandes d'absorption dans la région de 350 à 550 nm (Fig. 50E, ligne bleue) ; on note que ce spectre est très similaire à celui d'une sous-unité du complexe I (NADH-ubiquinone Q-oxydoréductase) chez *Paracoccus denitrificans*, NQO3, qui possède deux centres [2Fe-2S] (Yano, Yagi et al. 1995) (Fig. 50F). Ces résultats suggèrent donc la présence d'un ou de centres Fe-S dans UbiV purifiée. Au bout de 5 minutes, l'absorbance dans la région de 350 à 550 nm diminue, tout en présentant une certaine diffusion et la solution d'UbiV devient turbide (Fig. 50E, ligne rouge), suggérant une instabilité d'UbiV, qui a donc quand même tendance à s'agréger. Cela nous a amené à changer la composition du tampon et à réaliser un criblage de différents tampons appropriés pour purifier et stocker les protéines, avec le kit JBScreen Solubility HTS (Jena Bioscience).

Au final, la protéine UbiV-his₆ est finalement purifiée dans un tampon assez basique (pH 8.5) et contenant peu de sel (25 mM NaCl). Le tampon final pour purifier et stocker UbiV-his₆ est le suivant : 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 25 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT, ce qui permet une longue stabilité et un rendement final très important de 150 mg d'UbiV-his₆ / L de culture.

II.2.2.3 Caractérisations biochimiques

UbiV-his₆, purifiée à homogénéité grâce à deux étapes de purification (affinité à Ni²⁺ et chromatographie d'exclusion), se comporte comme monomère dans la solution (Fig. 51A et 51B).

La protéine, encore une fois, est rose et son spectre d'absorption UV-vis montre des caractéristiques de centres Fe-S dans la région de 350 à 550 nm (Fig. 51C, ligne pointillée). En effet, nous avons détectés des quantités sous-stœchiométriques de fer et de soufre (0.2 Fe et 0.2 S / monomère), indiquant une dégradation oxydative des centres Fe-S au cours de la purification aérobie ; cela a été déjà observé dans de nombreuses autres protéines Fe-S (Ollagnier-De Choudens, Sanakis et al. 2000, M, Ollagnier-de-Choudens et al. 2007). Afin de

confirmer cette hypothèse, nous avons essayé de reconstituer le(s) centre(s) Fe-S d'UbiV en anaérobie. En effet, après la reconstitution, la protéine possède 3.9 Fe et 3.3 S / monomère (Tableau 11) et son spectre UV-vis, avec une absorbance vers 400 nm, est caractéristique d'un centre [4Fe-4S] (Ollagnier-de Choudens, Loiseau et al. 2005) (Fig. 51C, ligne continue). Le spectre de résonance paramagnétique électronique (RPE) du centre [4Fe-4S] réduit au dithionite en anaérobie possède des caractéristiques d'un centre [4Fe-4S]¹⁺ à l'état de spin S = 1/2 (Ollagnier-De Choudens, Sanakis et al. 2000) (Fig. 51D). Ce centre [4Fe-4S] se dégrade rapidement quand la protéine reconstituée est exposée à l'air (Fig. 51E). Tous ces résultats suggèrent qu'UbiV est capable de lier, dans des conditions anaérobiques, un centre redox-actif [4Fe-4S] qui est sensible à l'air.

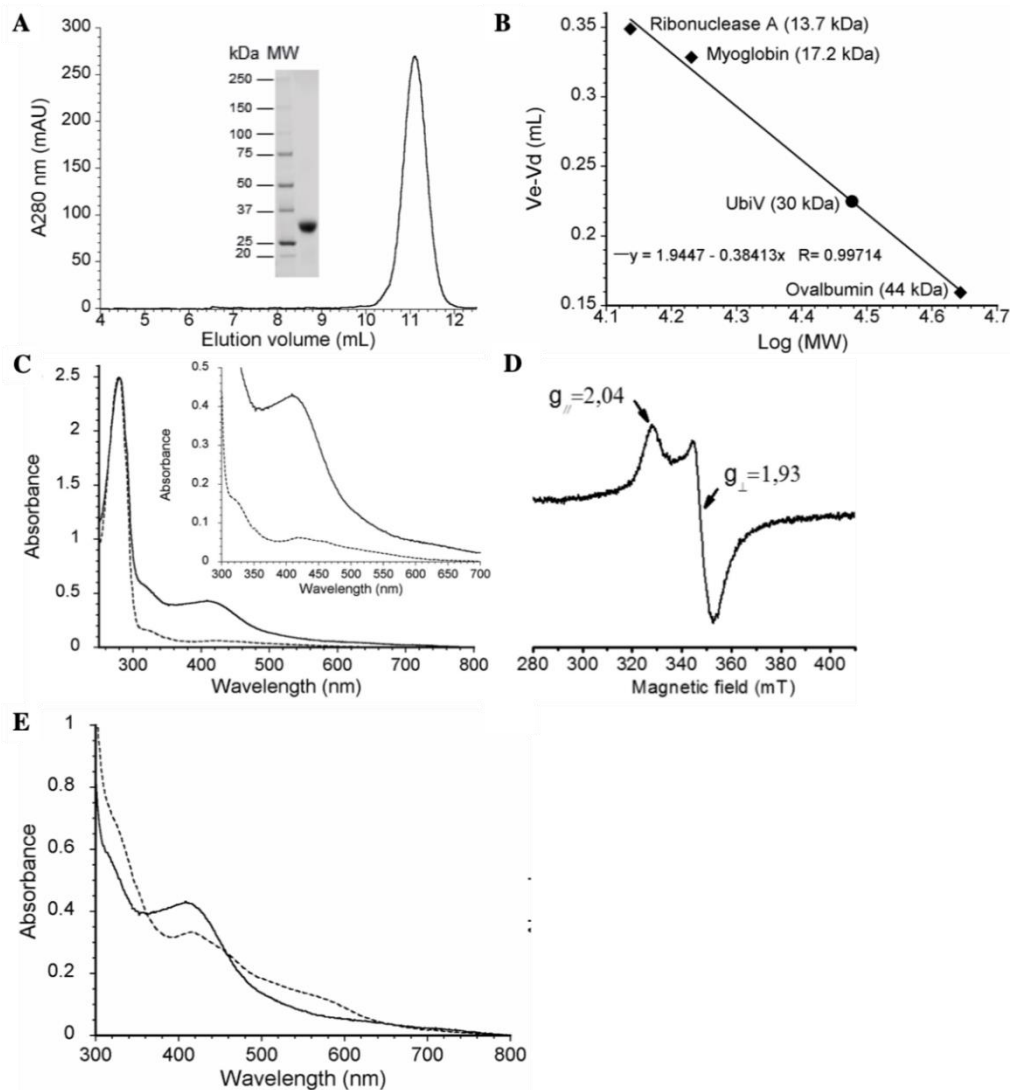


Figure 51. Purification et caractérisations biochimiques d'UbiV. (A) Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiV purifiée en aérobie sur une colonne Superdex 75 Increase10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiV purifiée en aérobie. (B) Courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, UbiV en cercle. (C) Spectre d'absorption UV-vis d'UbiV purifié en aérobie (ligne pointillée, 47 μM) et de l'holo-UbiV reconstitué en anaérobie (ligne continue, 41 μM). L'insertion est un agrandissement de la région de 300 à 700 nm. Le coefficient d'extinction molaire, soit 410 nm, a été déterminé à $10,8 \pm 0,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour l'holo-UbiV. (D) Spectre de RPE

en bande X d'holo-UbiV à 785 μM réduite par dithionite. (E) Spectre d'absorption UV-visible de l'holo-UbiV à 41 μM en anaérobiose (trait continu) et après 20 min d'exposition à l'air (trait pointillé).

Proteins	A_{280}/A_{410}	Content (nmol/nmol of protein)	
		Iron	Sulfur
UbiV WT	5.8	3.9 ± 0.13	3.3 ± 0.18
UbiV C193A C197A	8.4	2.4 ± 0.02	2.2 ± 0.13
UbiV C39A C193A C197A	15.5	1.9 ± 0.01	1.5 ± 0.4
UbiV C180A C193A C197A	26.7	0.7 ± 0.05	0.6 ± 0.1
UbiV C39A C180A C193A C197A	57.4	0.1 ± 0.04	0
UbiU WT-UbiV WT	4.3	7.9 ± 0.05	7.5 ± 0.06
UbiU C169A C176A-UbiV WT	7.3	4.7 ± 0.03	5.8 ± 0.1
UbiU C193A C232A-UbiV WT	8	3.9 ± 0.05	5.8 ± 0.1

Tableau 11. Caractérisation des protéines UbiV et des complexes hétérodimères UbiU-UbiV. La quantité en molaire et les propriétés UV-Vis des protéines sauvages et des mutants après les reconstitutions anaérobiques de leurs centres Fe-S sont indiqués.

Dans les centres Fe-S des protéines, les atomes de fer sont typiquement coordonnés par des résidus cystéines, et on peut les prédire car ils forment des motifs au niveau de la séquence protéique (Johnson, Dean et al. 2005, Fontecave, Py et al. 2008). Ainsi pour 110 protéines Fe-S identifiées chez *E. coli*, plus de 30 motifs ont été observés (Fontecave 2006).

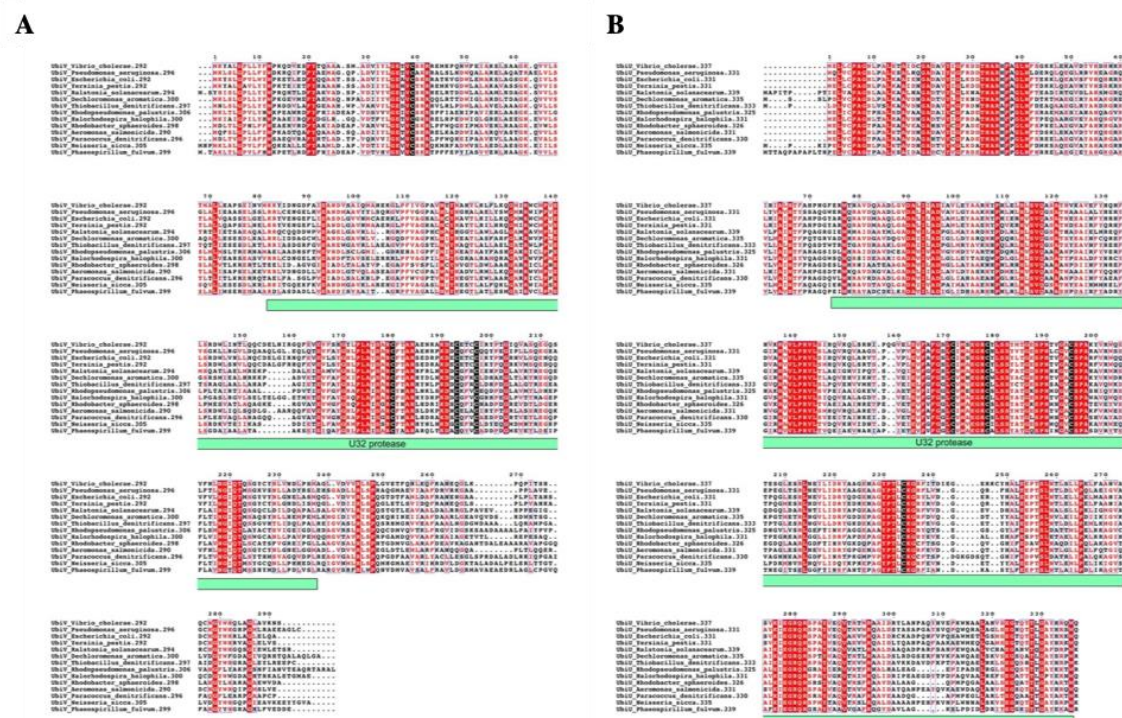


Figure 52. Alignement de multiples séquences à partir de des protéobactéries représentatives d'UbiV (A) et d'UbiU (B). Les cystéines conservés sont représentés en noir.

Dans la séquence d'UbiV, nous avons observé quatre résidus cystéines conservés dans la séquence : C39, C180, C193 et C197, formant un motif CX_nCX₁₂CX₃C. (Fig. 52A). Afin de confirmer cette hypothèse, les mutants cystéines en alanine (un double mutant C193A C197A, deux triple mutants C39A C193A C197A et C180A C193A C197A et un quadruple mutant) ont été purifiés à homogénéité de même manière qu'UbiV sauvage (Fig. 53A). Ces mutants ne sont plus capables de lier le centre Fe-S. En effet leur spectres UV-Vis montrent une absence des bandes d'absorbance dans la région 350-550 nm (Fig. 53A) et les teneurs en Fe et S et l'absorbance à 410 nm sont largement diminuées après la reconstitution en anaérobie (Fig. 53B et Tableau 11). Ces résultats suggèrent que les résidus cystéines en position 39, 180, 193 et 197 sont importants pour la coordination du centre [4Fe-4S] dans la protéine UbiV. De plus, nous avons montré *in vivo* que les cystéines C180 et C193 étaient importantes pour la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie (Fig. 53C). En effet, les cellules $\Delta ubiV$ qui ont été transformées par les plasmides codant pour UbiV C180A et UbiV 193A ne sont plus capables de synthétiser l'ubiquinone en anaérobie, comparé à celles transformées par le plasmide codant pour UbiV sauvage. Cela suggère que le centre [4Fe-4S] est nécessaire à l'activité enzymatique d'UbiV.

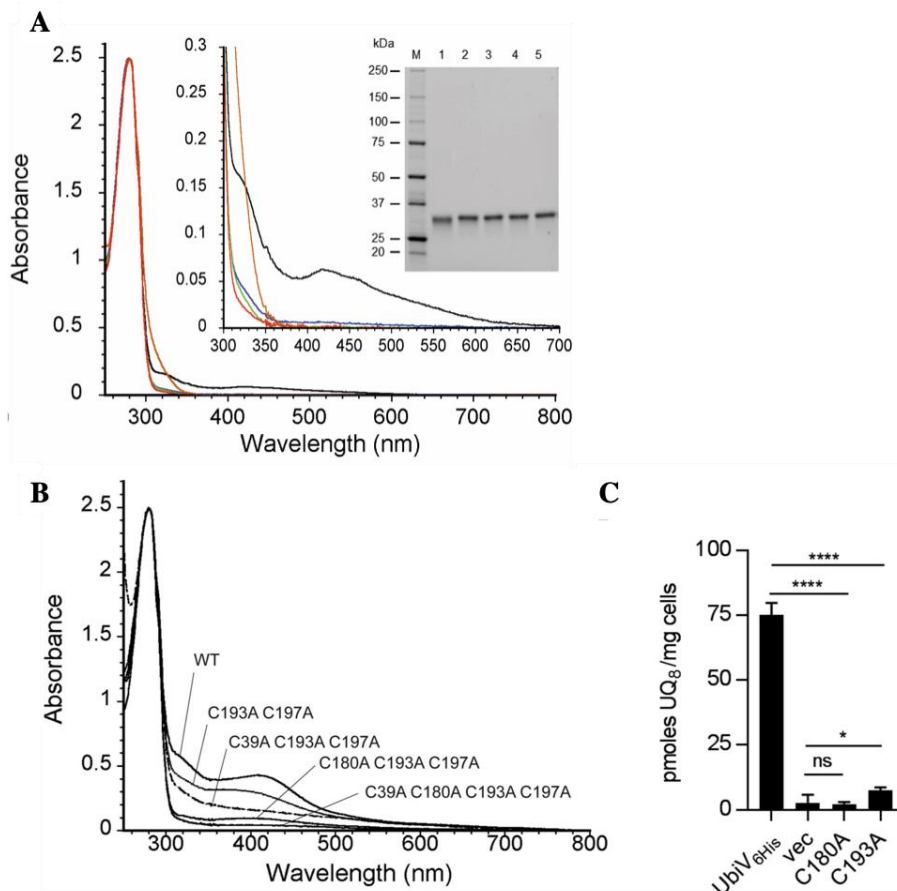


Figure 31. Caractérisations biochimiques des mutants cystéines en alanines d'UbiV. (A) Comparaison des spectres d'absorption UV-vis d'UbiV sauvage (noir) purifiée en aérobie et de différents mutants cystéines en alanines d'UbiV (C193A

C197A en bleu, C39A C193A C197A en vert, C180A C193A C197A en rose, C39A C19A C197A en brun). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie des purifications d'UbiV et des variants. Puits : M, marqueur de masse moléculaire ; 1, UbiV sauvage ; 2, UbiV C193A C197A ; 3, UbiV C39A C193A C197A ; 4, UbiV C180A C193A C197A ; 5, UbiV C39A C180A C193A C197. **(B)** Comparaison des spectres d'absorption UV-vis d'UbiV sauvage et de différents mutants cystéines en alanines d'UbiV après reconstitution des centres [Fe-S] en anaérobie. **(C)** Quantification de l'ubiquinone des cellules *ΔubiV* transformées par pBAD-UbiV_{6His}, pBAD-UbiV_{6His} C180A, pBAD-UbiV_{6His} C193A, ou pBAD vide et cultivées toute la nuit en anaérobie.

II.2.2.4 Caractérisations structurales et bioinformatiques

Des essais de cristallographie ont été réalisés avec différents kits de cristallographie avec la forme apo-UbiV purifiée en aérobie qui présente environ 20% de centres Fe-S, probablement sous forme [2Fe-2S] ou la forme holo-UbiV contenant un centre [4Fe-4S] en anaérobie. Malheureusement aucun cristal n'a pu être observé. Des expériences de protéolyse ménagée à la trypsine ont permis de mettre en évidence un domaine de 12 kDa bien protégé de la digestion (Fig. 54A). La protéine traitée à la trypsine est ensuite déposée sur une colonne d'affinité Ni²⁺. Le domaine protégé d'UbiV ne s'y accroche pas, suggérant que ce domaine correspond à l'extrémité N-ter d'UbiV, qui ne possède pas l'étiquette His-Cter. L'identification du site de coupure exacte de ce domaine est en cours d'obtention par la spectrométrie de masse. Le domaine purifié par une colonne Superdex 75 Increase10/300 GL se comporte comme un trimère en solution (Fig. 54B). De plus le pic à l'absorbance 400 nm correspondant aux protéines possédant un centre Fe-S sort plus tardivement sur le chromatogramme, suggérant que ce domaine ne contient pas de Fe-S. Des essais de cristallographie de ce domaine N-ter d'UbiV ont été réalisés, cependant aucun cristal n'a pu être observé.

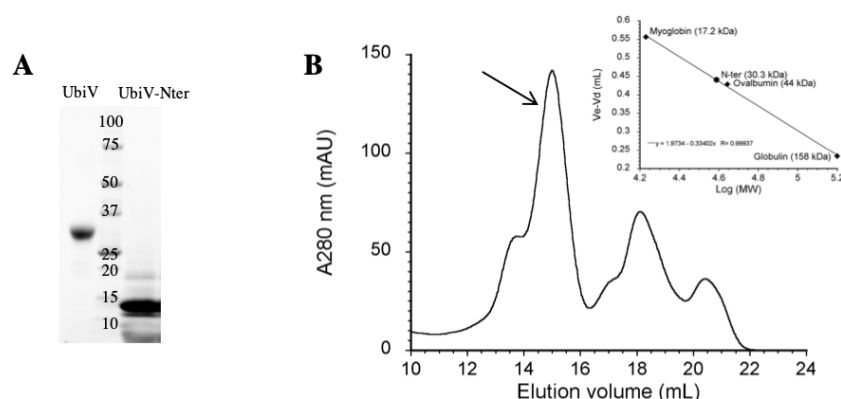


Figure 54. Protéolyse ménagée d'UbiV. **(A)** Gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiV entière (lane UbiV) ou le domaine N-ter d'UbiV protégé de la digestion à la trypsine (lane UbiV-Nter). **(B)** Chromatogramme de filtration sur gel du domaine N-ter d'UbiV à l'issue de la protéolyse ménagée à la trypsine sur une colonne Superdex 75 Increase10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre une courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, l'extrémité N-ter d'UbiV en cercle.

Bien que pour l'instant, nous ne soyons pas capables d'avoir des cristaux de plusieurs formes d'UbiV, le modèle structural que j'ai réalisé à l'aide de Phyre2 nous donne quelques informations sur cette protéine (Fig. 55). La construction de la partie N-ter (acides aminés 1-214, partie rouge, Fig. 55A) repose sur deux structures 5D88 (domaine U32 de Mk0906 chez *Methanopyrus kandleri*) et 3KTS (Glycerol uptake operon antiterminator regulatory protein de *Listeria monocytogenes*) avec une confiance de 100% et 96% respectivement (Fig. 55B). Ces deux protéines, dont la structure comporte un motif de tonneau «TIM barrel», partagent 21.5% et 20.4% d'identité respectivement avec le domaine N-ter d'UbiV. La partie C-ter du modèle structural est construite par calcul *ab initio* (partie verte, Fig. 55A). En effet, la partie N-ter est composée de six feuillets β entourés par sept hélices α , formant un motif de tonneau TIM. Les quatre cystéines conservées (C39, C180, C193 et C197), indiqués en bleu, se trouvent à l'extérieur du cœur du motif TIM dans la partie inférieure du modèle (Fig. 55A). La partie C-ter (215-292) est composée de deux hélices α connectées par des boucles.

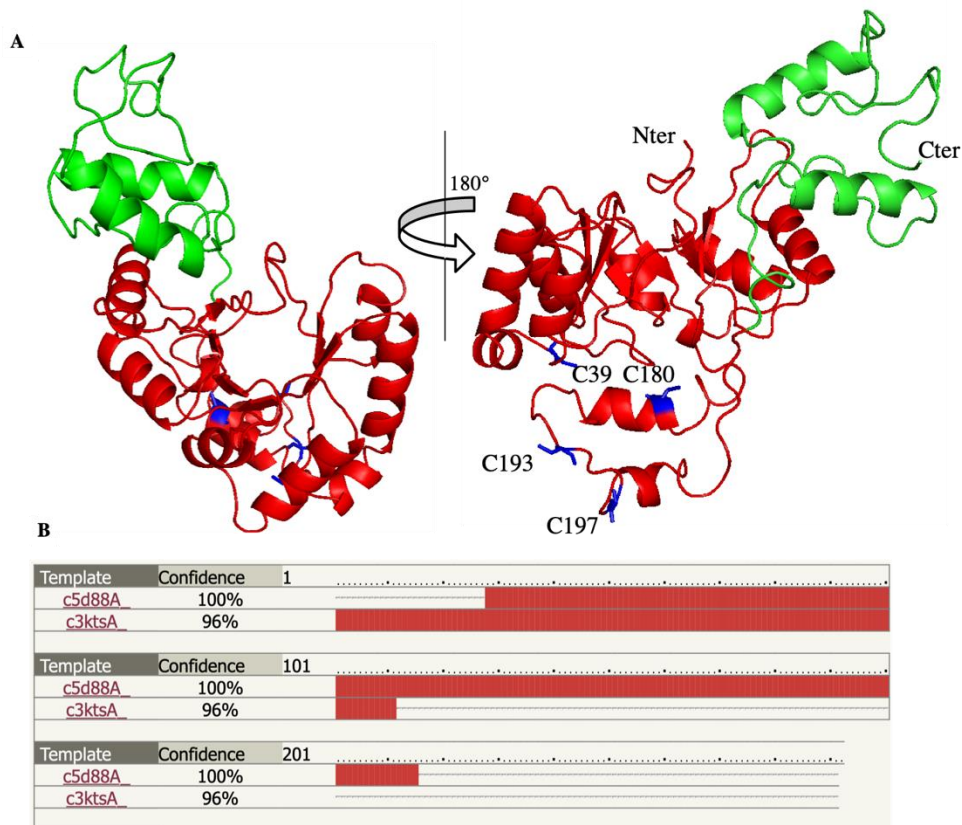


Figure 55. Modèle structural d'UbiV d'*E. coli* (Phyre2). (A) La partie N-ter (acides aminés 1-214, rouge) est caractéristique par un tonneau TIM composé de six feuillets β entourés par sept hélices α . La partie C-ter (acides aminés 215-292, rouge) est composée de deux hélices α connectées par les boucles sans structure caractéristiques. Les quatre cystéines conservées (C39, C180, C193 et C197) sont indiqués en bleu. (B) La construction de la partie N-ter repose sur deux structure 2D88 et 3KTS et celle de la partie C-ter par calcul *ab initio*.

II.2.3 UbiU d'*E. coli*

II.2.3.1 Expression et purification

Nous avons tout d'abord tenté de purifier UbiU avec le plasmide pACYCDuet-UbiU codant pour UbiU avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-terminale (his₆-UbiU). L'expression de ce plasmide a été testée dans les cellules BL21(DE3) co-transformées avec pGro7. Le gène codant pour his₆-UbiU est induit à différents moments de la culture (DO 0.5 ou 1.8) par différentes concentrations en IPTG (20 ou 50 μM) pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5 / 150 mM NaCl et les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation. Différentes fractions (soluble et culot) sont analysées par gel SDS-PAGE (Fig. 56A).

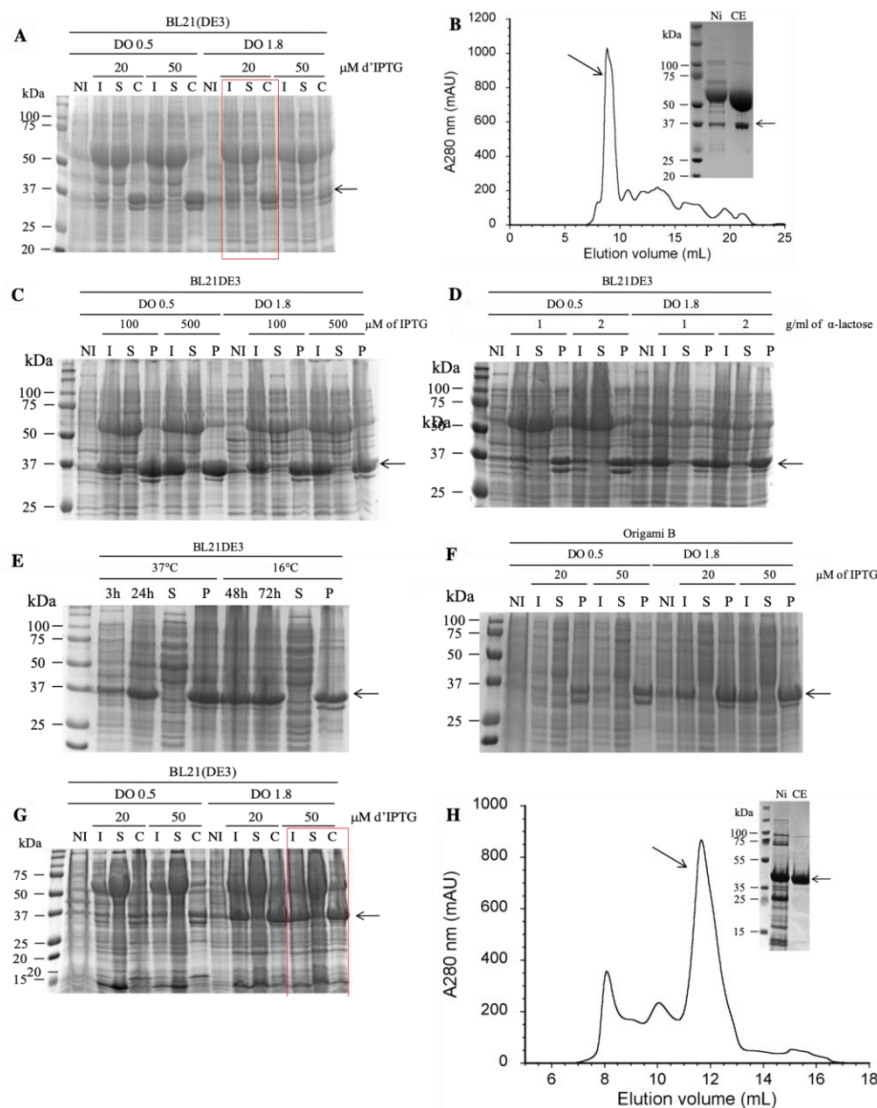


Figure 56. Expression et purification d'UbiU d'*E. coli*. (A) Les cellules BL21(DE3) sont co transformées par le plasmide pETDuet-UbiU codant pour his₆-UbiV et le plasmide pGro7 et cultivées dans le milieu LB. Le plasmide est induit par IPTG (20 ou 50 μM) à une DO 0.5 ou 1.8 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées, les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). La bande correspondante à l'UbiU est indiquée par la flèche ; le cadre rouge indique les conditions

d'expression choisies pour la purification des protéines. **(B)** Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiU purifié sur une colonne Superdex 200 Increase10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiU purifiée par une colonne Ni²⁺(Ni) et filtration sur gel (CE) dans 50 mM Tris-HCl pH 7.5 / 150 mM NaCl. **(C à G)** Expression du plasmide pET22-UbiU codant pour UbiV- his₆ dans différentes conditions de culture. Toutes les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol. **(C)** Les conditions d'expression sont identiques que le panneau (A). **(D)** Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant 500 mM NaCl. **(E)** Les cellules sont cultivées dans le milieu auto-inductif. **(F)** Le plasmide est exprimé dans les cellules Origami B. **(G)** Les conditions d'expression sont identiques que le panneau (A), sauf que les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 0.2% (m/v) sarkosyl. **(H)** Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiU purifié sur une colonne Superdex 200 Increase10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiU purifiée par une colonne Ni²⁺(Ni) et filtration sur gel (CE) 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 3mM LDAO.

La protéine his₆-UbiU, exprimée dans la meilleure condition (entourée par un cadre rouge sur la Fig. 56A) est ensuite purifiée par une colonne Ni²⁺ puis une chromatographie d'exclusion Superdex 200 10/300 Increase (GE Healthcare). his₆-UbiU est co-élué avec la chaperonne GroEL sous forme de multimères de haut poids moléculaire (Fig. 56B). Bien que différentes étapes de purification supplémentaire soient employées, nous n'arrivons pas à obtenir UbiU non-agrégé (donnés non montrés).

Par analogie avec ce qui a été observé avec UbiV, c'est-à-dire une meilleure solubilisation lorsque le tag est au niveau de la partie C-terminale, j'ai donc construit le plasmide pET-22-UbiU codant pour UbiU avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-terminale (UbiU-his₆).

Bien que l'expression de ce plasmide soit testée dans diverses conditions : milieu de culture (LB ou milieu auto-inductif), coexpression avec différents plasmides de chaperones (pGro7, pG-Tf2, pG-KJE8), diverses souches bactériennes (BL21(DE3), Origami B(DE3)), diverses concentrations de l'inducteur IPTG (variée de 20 à 500 µM) ou α-lactose (1-2 g/mL), variations du pH (entre 7.5 et 9) et de la concentration en sel (entre 150 et 500 mM), divers détergents, UbiU-his₆ se trouve dans la partie insoluble (Fig. 56C-F). Elle est seulement en partie soluble uniquement en présence de 0.2% de sarkosyl (Fig. 56G). La protéine est ensuite purifiée par une colonne de Ni²⁺ suivie d'une filtration sur gel dans le tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 3 mM LDAO avec un rendement de 4 mg d'UbiU-his₆ /L de culture (Fig. 56H). UbiU-his₆ se comporte comme un tétramère en solution (Fig. 56H)

UbiU, qui semble être similaire à UbiV qui lie un centre [4Fe-4S] via quatre cystéines conservées, possède également quatre cystéines conservées dans sa séquence protéique (Fig. 52B). Nous avons donc essayé de reconstituer le(s) centre(s) Fe-S d'UbiU purifiée. Cependant la protéine précipite rapidement pendant la réaction de reconstitution. Cela

pourrait être à cause de la présence du détergent (LDAO) dans la solution qui empêche l’incorporation du Fe et S à la protéine ; ou bien la présence d’UbiV serait nécessaire pour la reconstitution du centre Fe-S d’UbiU vu que les résultats *in vivo* montrent qu’elles forment un complexe et que les résultats *in vitro* que je vais présenter ci-après le confirme.

II.2.3.2 Caractérisation bioinformatiques

Bien que pour l’instant, nous ne soyons pas capables d’avoir des cristaux d’UbiU, le modèle structural réalisé par Phyre2 nous donne quelques informations sur cette protéine (Fig. 55). Similaire à UbiV, la partie N-ter (acides aminés 1-262, partie rouge, Fig. 57A) est construite à partir de deux structures 5D88 (domaine U32 de Mk0906 chez *Methanopyrus kandleri*) et 3XI3 (Phosphorylase au Pyrophosphate de thiamine chez *Pyrococcus furiosus*) avec une confiance de 100% et 97% respectivement (Fig. 57B). Ces deux protéines partagent 21.6% et 21.8% d’identité respectivement avec le domaine N-ter d’UbiU. La partie C-ter du modèle structural est construite par la modélisation *ab initio* (partie verte, Fig. 57A). Dans ce modèle, la partie N-ter comporte un motif de tonneau «TIM barrel» composé de cinq feuillets β entourés par sept hélices α . Les quatre cystéines conservées (C169, C176, C193 et C232), indiquées en bleu, se trouvent à l’extérieur du cœur du motif TIM (Fig. 57A). La partie C-ter (263-331) est composée de deux hélices α connectées par des boucles.

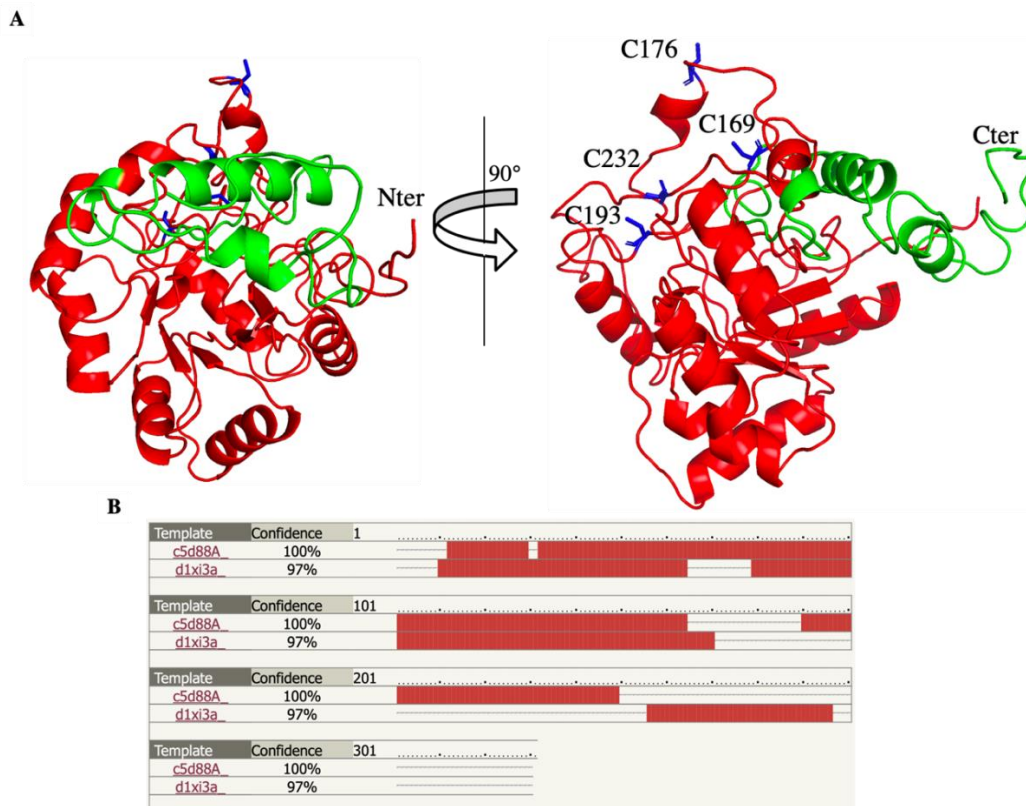


Figure 57. Modèle structural d’UbiU d’E.coli (Phyre2). (A) La partie N-ter (acides aminés 1-262, rouge) est caractéristique par un tonneau TIM composé de cinq hélices α entourés par sept feuillets β . La partie C-ter (acides aminés 263-331, rouge) est composée de deux hélices α connectées par les boucles sans structure caractéristiques. Les quatre

cystéines conservées (C169, C176, C193, C232) sont indiquées en bleu. **(B)** La construction de la partie N-ter se repose sur deux structures 2D88 et 3XI3 et celle de la partie C-ter par la modification *ab initio*.

II.2.4 Complexe UbiU-UbiV

II.2.4.1 Système de double hybride bactérien

Du fait que les protéines Ubi dépendantes de l'oxygène forme un méga-complexe (chapitre III), nous nous sommes demandé si UbiT, UbiU et UbiV interagissaient entre elles. Pour cela, nos collaborateurs marseillais ont effectué un système de double hybride afin de détecter une interaction physique entre ces protéines. Ce système, développé par Karimova et ses collègues (Karimova, Pidoux et al. 1998), est basé sur la reconstitution induite par interaction d'une cascade de signalisation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) chez *E. coli* (Fig. 58). Deux protéines d'intérêt sont génétiquement fusionnées à deux domaines complémentaires, T25 et T18, qui constituent le domaine catalytique de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. L'association des protéines bi-hybrides résulte d'une complémentarité fonctionnelle entre les fragments T25 et T18 et conduit à la synthèse de l'AMPc. L'AMPc déclenche ensuite l'activation de la transcription d'un gène rapporteur. Le gène *lacZ* d'*E. coli* (codant pour la β -galactosidase) sert au gène rapporteur car son expression est facilement mesurée à l'aide d'un dosage quantitatif.

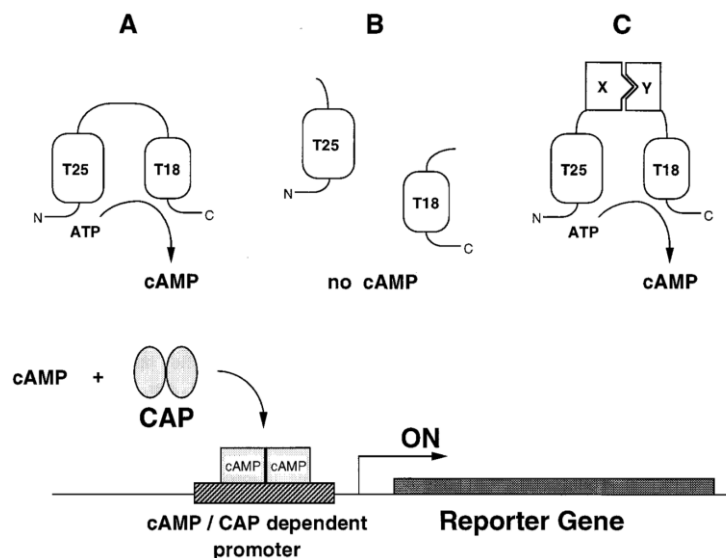


Figure 58. Principe du système de double hybride bactérien. La protéine CyaA de *B. pertussis* se compose de deux domaines fonctionnels, T18 (acides aminés 1 à 224) et T25 (acides aminés 225 à 399) (A). Comme la protéine est divisée en ses domaines, elle n'est plus capable de synthétiser l'AMPc (B). Introduite à proximité spatiale par l'interaction de deux protéines hybrides, la synthèse de l'AMPc est activée (C) en activant des gènes métaboliques dépendants de la CAP (protéine activatrice de catabolite) / AMPc, tels que les opérons *lac* et *mal*.

Basé sur cette technique, nos collaborateurs ont testé les domaines T18 et T25 fusionnés à UbiT, UbiU et UbiV de manière réciproque, c'est-à-dire qu'ils ont inversé les fusions des

deux protéines d'intérêt avec les deux extrémités de la protéine test. Ils ont vérifié alors qu'ils avaient bien obtenu le même résultat. En effet, UbiU interagit avec UbiV (Fig. 59A et 59B) et UbiT interagit fortement avec elle-même (Fig. 59C) et interagit probablement avec UbiU et UbiV. Cependant, l'interaction d'UbiT-UbiU et d'UbiT-UbiV reste à confirmer.

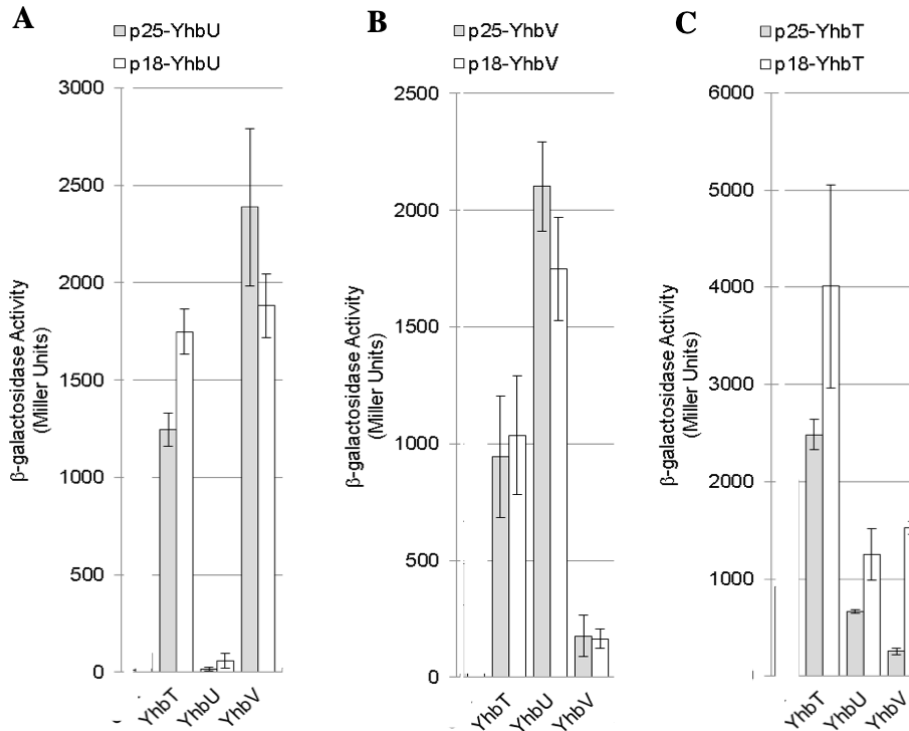


Figure 59. Interaction physique entre UbiT, UbiU et UbiV. Chaque protéine est fusionnée et testée de manière réciproque à deux domaines complémentaires, T25 et T18, qui constituent le domaine catalytique de l'adénylate cyclase de *B. pertussis* : UbiU (A), UbiV (B) et UbiT(C).

II.2.4.2 Expression et purification du complexe UbiU-UbiV

Basé sur les résultats *in vivo* qui montrent qu'UbiU et UbiV interagissent entre elles, nous avons construit le plasmide pACYCDuet- his₆-UbiU-UbiV codant pour his₆-UbiU et UbiV sans étiquette. Ces deux dernières sont solubles dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT mais elles ne sont pas accrochées à la colonne Ni²⁺ (données non montrées), suggérant que l'extrémité N-terminale d'UbiU est inaccessible et qu'elle pourrait se trouver à l'interface du site de liaison entre UbiU et UbiV.

Nous construisons donc le plasmide pETDuet-UbiU-UbiV-his₆ codant pour UbiU sans étiquette et UbiV-his₆. L'expression de ce plasmide est testée de même manière que le plasmide pET-22-UbiV (Fig. 60). Cette fois, les protéines sont solubles, et le complexe UbiU-UbiV est ensuite purifié à homogénéité par deux étapes de purification (Ni²⁺ et chromatographie d'exclusion Superdex 75) avec un rendement de 60 mg de protéines / L de culture.

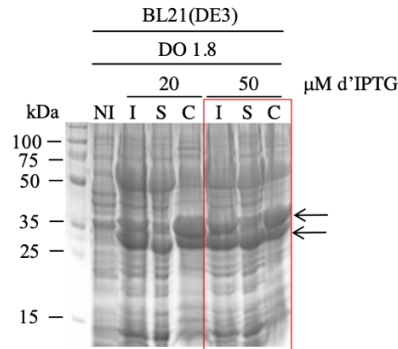


Figure 60. Expression du complexe UbiU-UbiV. Les cellules BL21(DE3) sont co-transformées par le plasmide pETDuet-UbiU-UbiV-his₆ codant pour UbiU sans étiquette et UbiV-his₆ et pGro7 codant pour les protéines chaperones GroEL (57.3 kDa) et GroES (10 kDa) et cultivées dans le milieu LB. Le plasmide est induit par IPTG (20 ou 50 μM) à une DO 1.8 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées, les lysats sont clarifiés par ultracentrifuge et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). Les bandes correspondantes aux UbiU et UbiV sont indiquées par les flèches ; le cadre rouge indique les conditions d'expression choisies pour la purification des protéines.

II.2.4.3 Caractérisations biochimiques

Les deux protéines sont co-purifiées sous forme d'un hétérodimère (Fig. 61A et 61B) et présentent des traces de centres Fe-S (Fig. 61C, ligne pointillée), avec des quantités sous-stœchiométriques de fer et de soufre (0.4 Fe et 0.4 S / hétérodimère).

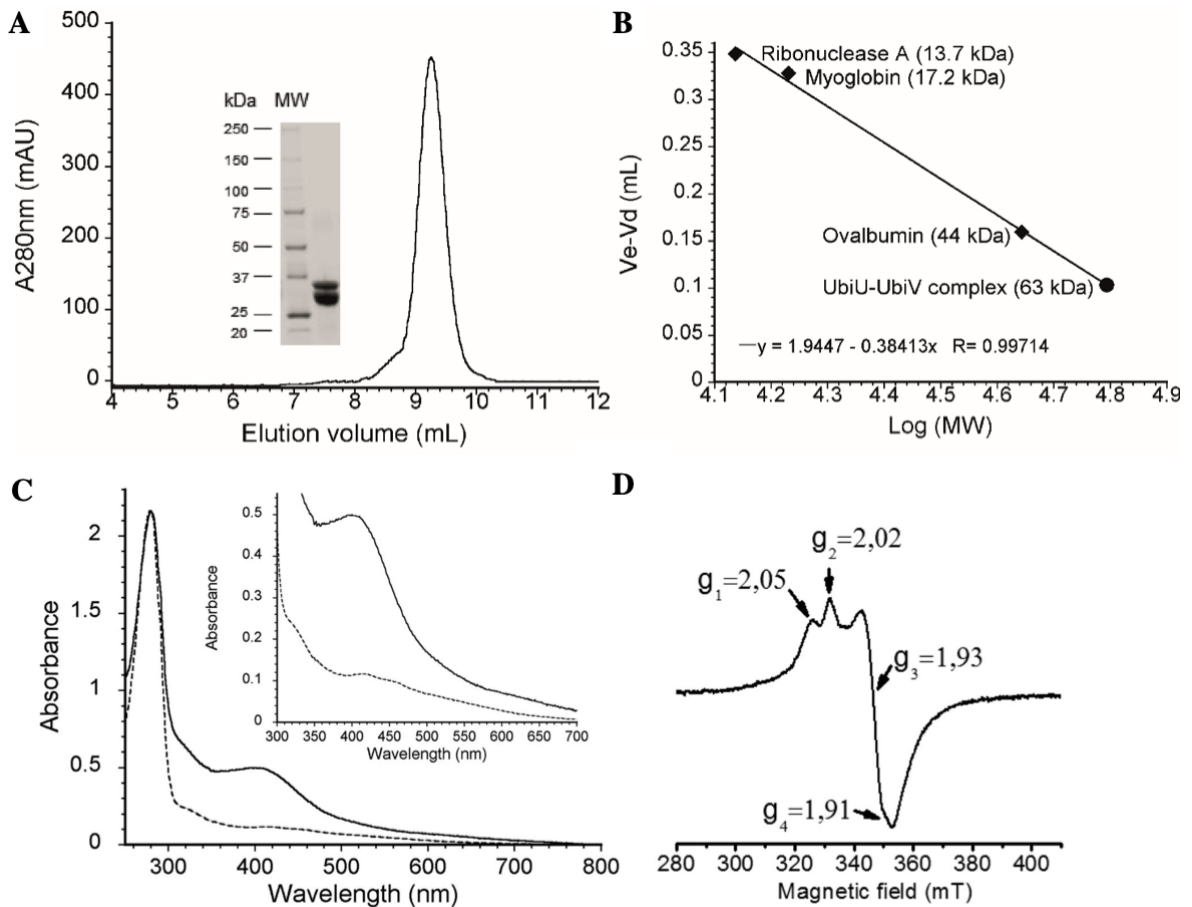


Figure 61. Purification et caractérisation biochimiques du complexe UbiU-UbiV d'*E. coli*. (A) Chromatogramme par filtration sur gel du complexe UbiU-UbiV purifié en aérobie sur une colonne Superdex 75 Increase10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie du complexe purifié en aérobie. (B) Courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, le complexe UbiU-UbiV en cercle. (C) Spectre d'absorption UV-vis du complexe UbiU-UbiV purifié en aérobie (ligne pointillée, 17 μ M) et de l'holo-UbiU-UbiV reconstitué en anaérobie (ligne continue, 15.5 μ M). L'insertion est un agrandissement de la région de 300 à 700 nm. (D) Spectre de RPE en bande X d'holo-UbiV à 339 μ M réduite par dithionite.

La reconstitution en anaérobie avec du fer et du soufre résulte en un hétérodimère qui contient environ 8 fer et 8 soufre (Tableau 11) et qui présente un spectre UV-visible caractéristique des centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (Fig. 61C, ligne continue). Le spectre de RPE du complexe UbiU-UbiV réduit en anaérobie est également cohérent avec la présence de deux centres $[4\text{Fe-4S}]$ différents, car il présente un signal composite qui reflète la présence de deux espèces différentes, chacune à l'état de spin $S = 1/2$ (Fig. 61D).

Les quatre cystéines conservées d'UbiU, C169, C176, C193 et C232, formant un motif $\text{CX}_6\text{CX}_{16}\text{CX}_{38}\text{C}$, sont probablement importantes pour la coordination du deuxième centre $[4\text{Fe-4S}]$, vu qu'il y en a deux dans le complexe UbiU-UbiV, dont un est lié par UbiV. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons purifié deux complexes [UbiV sauvage - UbiU C169A C176A] et [UbiV sauvage - UbiU C193A C232A] (Fig. 62A). Après la reconstitution en anaérobie, ces deux complexes mutants pour les paires de cystéines d'UbiU ne contiennent qu'environ la moitié du fer comparé au complexe sauvage (Tableau 11) et leurs rapports A_{280} / A_{410} sont également réduits d'environ 2 fois (Fig. 62B et Tableau 11).

Nos résultats démontrent clairement que chaque protéine du complexe hétérodimérique UbiU-UbiV lie un groupe $[4\text{Fe-4S}]$ et que les cystéines C169, C176, C193 et C232 sont importantes pour la coordination du centre $[4\text{Fe-4S}]$ d'UbiU. De plus, nous avons montré *in vivo* que la cystéine C176 était importante pour la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie (Fig. 62C). En effet, les cellules ΔubiU qui ont été transformées par les plasmides codant pour UbiU C176A ne sont plus capables de synthétiser l'ubiquinone en anaérobie, comparé à celles transformées par le plasmide codant pour UbiU sauvage. Cela suggère que le centre $[4\text{Fe-4S}]$ est également nécessaire pour l'activité enzymatique d'UbiU.

Des essais de cristallographie ont été réalisés avec des kits de cristallogénèse sur la forme quasi apo du complexe hétérodimérique UbiU-UbiV purifié en aérobie qui présente environ 20% de centres Fe-S, probablement sous forme $[2\text{Fe-2S}]$ ou bien sur la forme holo reconstitué en anaérobie qui contient deux centres $[4\text{Fe-4S}]$. Malheureusement aucun cristal n'a pu être observé pour le moment.

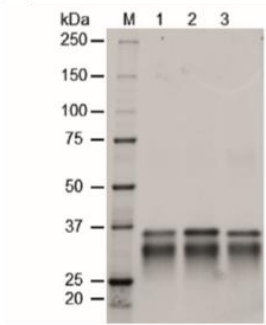
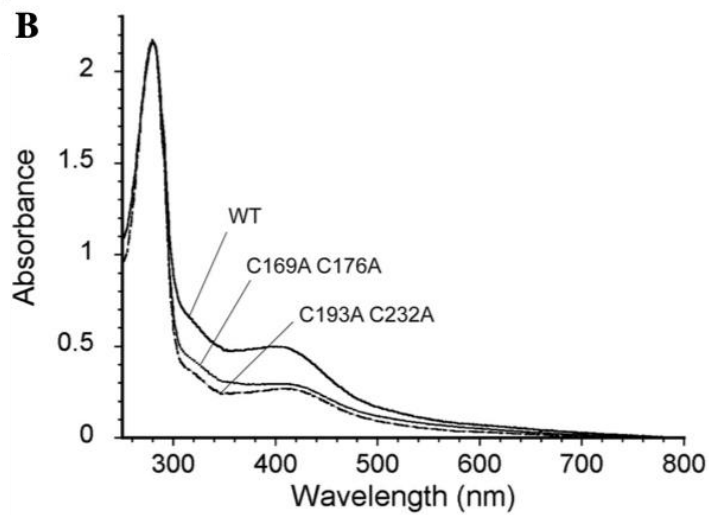
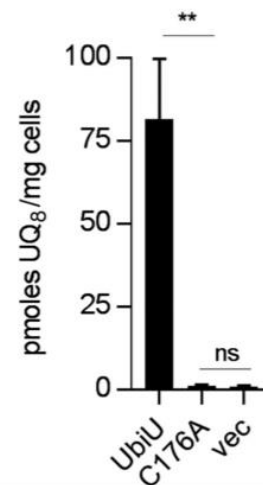
A**B****C**

Figure 62. Caractérisations biochimiques des mutants cystéines en alanines d'UbiU dans le complexe UbiU-UbiV. (A) Le gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie des purifications du complexe UbiU-UbiV et des variants. Puits : M, marqueur de masse moléculaire ; 1, Complexe UbiU-UbiV sauvage ; 2, Complexe UbiU C169A C176A-UbiV sauvage ; 3, Complexe UbiU C193A C232A-UbiV sauvage. (B) Comparaison des spectres d'absorption UV-vis du complexe UbiU-UbiV sauvage et de différents mutants cystéines en alanines d'UbiU dans le complexe UbiU-UbiV après reconstitution des centres [Fe-S] en anaérobiose. (C) Quantification de l'ubiquinone des cellules $\Delta ubiU$ transformés par pBAD-UbiU, pBAD-UbiU C176A ou pBAD vide et cultivés toute la nuit en anaérobiose.

II.3 La présence des centres Fe-S dans la plupart des membres de la famille peptidase U32

La présence des centres Fe-S dans UbiU et UbiV, deux membres de la famille des protéases U32, a amené nos collaborateurs bioinformaticiens (Sophie Abby, Grenoble) à évaluer la présence de motifs de cystéines conservés dans d'autres protéases U32. Kimura et ses collègues ont re-classifié 3521 protéases contenant des motifs de peptidase U32 dans 12 groupes, appartenant à 10 familles de protéases (Fig. 63A) (Kimura, Sakai et al. 2017, Sakai, Kimura et al. 2019). Nous avons extrait et aligné les séquences des 10 familles de protéases et avons trouvé que huit familles parmi ces 12 possèdent quatre résidus cystéines très conservés (97 à 100% de conservation) (Fig. 63B), suggérant un rôle fonctionnel important pour ces résidus, vu que les centres Fe-S sont importants pour l'activité enzymatique d'UbiU et

d'UbiV. Seule la famille PepU32#5 n'a pas de cystéines conservées et la famille PepU32#6 possède deux cystéines conservées modérément (60 à 80%) plus trois cystéines (40 à 65%) mal conservées dans leurs séquences. Les motifs de cystéine de chacune des huit sous-familles montrent un degré élevé de conservation et la plupart d'entre eux peut même être alignés les uns sur les autres, en particulier le motif CX₆CX₁₅CX₃₄C. UbiV possède un motif légèrement distinct, la première cystéine apparaissant loin en amont des trois autres et en dehors du domaine U32. Globalement, nos données suggèrent que la plupart des membres de la famille de la peptidase U32 contiennent un groupe [4Fe-4S] où le fer est coordonné par des cystéines conservées, similaire à celui que nous avons démontré pour UbiU et UbiV.

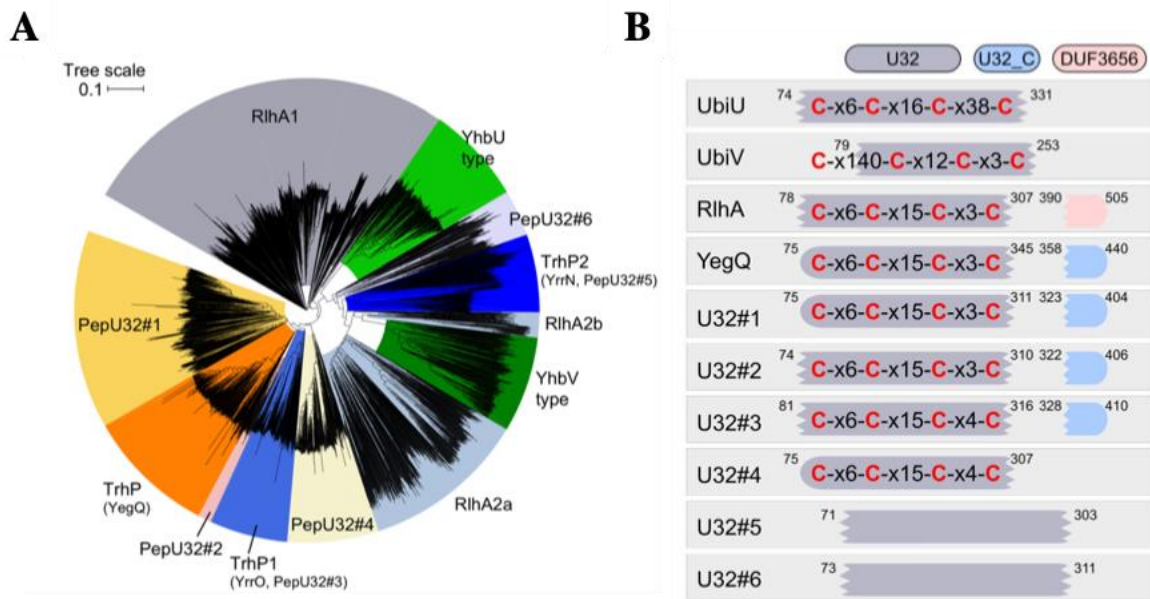


Figure 63. La plupart des protéines de la famille U32 est caractérisées par un motif des cystéines conservées. (A) Analyse phylogénétique des familles de peptidases U32. Les 12 groupes sont présentées en différentes couleurs (Sakai, Kimura et al. 2019). **(B)** Motifs conservés de quatre Cystéines de la famille des protéases U32 (Pelosi, Vo et al. 2019).

III. Conclusion

Bien que l'existence d'une voie alternative de la biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* soit proposé il y a plus de 40 ans (Alexander and Young 1978), elle restait très peu étudiée jusqu'à ce jour. Des preuves indirectes avaient déjà montré que quelques espèces comme *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans* et *Halorhodospira halophila* ont pu synthétiser l'ubiquinone dans des conditions anaérobies, comme démontré par des quantifications biochimiques de la teneur en quinone de cellules cultivées en anaérobie (Alexander and Young 1978, Matsumura, Kobayashi et al. 1983, Yen and Chiu 2007, Schoepp-Cothenet, Lieutaud et al. 2009). Ici, nous démontrons que les voies de biosynthèse de l'ubiquinone dépendantes et indépendante de l'oxygène ne diffèrent que par trois étapes

d'hydroxylation, et nous identifions trois gènes, *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*, qui sont essentiels pour la biosynthèse de l'ubiquinone en absence de l'oxygène chez *E. coli*.

Le fait que les protéines UbiT, UbiU et UbiV soient largement répandues dans les α , β - et γ -protéobactéries et coexistent avec les enzymes UbiA, UbiE et UbiG révèlent que UbiT, UbiU et UbiV sont des éléments clés de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. Ces résultats expliquent pourquoi de nombreuses protéobactéries sont capables de synthétiser de l'ubiquinone dans des conditions anaérobiques.

De nombreuses bactéries, y compris *E. coli*, sont des anaérobies facultatifs qui sont capables de se développer en présence (milieu aérobie) ou en l'absence d'oxygène moléculaire (milieu anaérobie). Dans les conditions dites microaérobie et anaérobie, l'ubiquinone, qui est le donneur d'électrons principal à travers la chaîne respiratoire chez *E. coli*, doit donc être synthétisé *via* la voie indépendante de l'oxygène. Nous proposons que la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène fonctionne non seulement dans des conditions anaérobies, mais également dans des conditions microaérobies, dans lesquelles l'ubiquinone est probablement cruciale pour la physiologie bactérienne. Les deux voies de biosynthèse de l'ubiquinone confèrent des avantages physiologiques, permettant la production de l'ubiquinone sur toute l'échelle des niveaux d'O₂ rencontrés par les aérobies facultatifs.

En plus de la bioénergétique en soi, les respirations anaérobiques et microaérobiques sont considérées comme importantes pour la pathogénicité (Wallace, Zani et al. 2016). En effet, la relation entre les homologues d'UbiT, d'UbiU et d'UbiV dans de nombreuses bactéries et leur pathogénicité a été présentée dans l'introduction de cette thèse. Basé sur nos résultats qui montrent que la délétion de *ubiT*, *ubiU* ou *ubiV* bloque la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène chez *E. coli*, nous suggérons que l'atténuation des mutants discutés ci-dessus résulte de leur déficience en ubiquinone dans des conditions microaérobiques / anaérobiques.

UbiT, similaire à UbiJ, contient un domaine SCP2. Récemment, nous avons montré qu'UbiJ était une protéine accessoire liant des intermédiaires de l'ubiquinone *via* son domaine SCP2 et maintenait le complexe multiprotéique des protéines Ubi (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019) (voir chapitre III). Étant donné qu'UbiJ est exclusivement impliquée dans la voie dépendante de l'oxygène, alors qu'UbiT est spécifique de la voie indépendante de l'oxygène, nous proposons donc qu'UbiT remplit, en anaérobie, les mêmes fonctions que UbiJ en aérobie. De plus, fait très intéressant, UbiT de *P. aeruginosa*, a été récemment démontré comme étant capable de lier à l'acide phosphatidique (Groenewold, Massmig et al. 2018), démontrant ainsi une affinité de UbiT pour les molécules lipidiques.

UbiU et UbiV forment un complexe hétérodimerique, suggérant que ces deux protéines fonctionnent ensemble. De plus, cette hypothèse est encore renforcée par le fait que les gènes *ubiU* et *ubiV* se retrouvent tous deux dans les génomes dans 99% des cas des protéobactéries et qu'ils se trouvent principalement l'un à côté de l'autre (Fig. 46). Nous montrons qu'UbiU et UbiV sont impliquées dans l'hydroxylation en position C6 du DMQ₈ (Fig. 47) de manière indépendante de l'oxygène. En plus, les cellules $\Delta ubiU$ et $\Delta ubiV$ accumulent de l'OPP, suggérant que ces deux protéines sont également nécessaires pour l'hydroxylation en position C5. Bien que les trois réactions d'hydroxylation dans la voie aérobie soient catalysées par les trois différentes hydroxylases (UbiI, UbiH et UbiF), il a été récemment démontré que *Neisseria meningitidis* ne possédait qu'une seule hydroxylase qui catalyse toutes les trois réactions d'hydroxylation (Pelosi, Ducluzeau et al. 2016). Cela suggère qu'il serait possible que UbiU et UbiV suffisent pour les trois réactions d'hydroxylation dans la voie de biosynthèse indépendante de l'oxygène.

Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré que les membres de la famille des peptidases U32 étaient capables de lier des centres Fe-S ou ne contenaient aucun des 30 motifs de cystéines trouvés dans des protéines Fe-S bien caractérisées (Estellon, Ollagnier de Choudens et al. 2014). L'expression, la purification et la caractérisation spectroscopique d'UbiV et du complexe hétérodimère UbiU-UbiV ont clairement montré que chaque protéine contenait un centre [4Fe-4S] (Fig. 51 et 61). La mutation des ligands de cystéine candidats, arrangés dans un motif CX₆CX₁₆CX₃₈C dans UbiU et dans un motif CX_nCX₁₂CX₃C dans UbiV, a perturbé la liaison des centres Fe-S et a supprimé la complémentation *in vivo*, suggérant une fonction cruciale des centres [4Fe-4S] dans ces protéines. La conservation d'un motif CX₆CX₁₅CX_{3/4}C dans d'autres membres de la famille U32 confirme que ces protéines se lient probablement aux centres [Fe-S]. Cette hypothèse permettrait la réévaluation des membres de la famille U32, dont très peu ont actuellement une fonction moléculaire établie (<http://www.ebi.ac.uk/merops/>) (Rawlings, Barrett et al. 2018). Il est intéressant de noter que la fonction de RlhA, un membre de la famille des protéases U32 impliqué dans la C-hydroxylation d'une cytidine de l'ARNr 23S d'*E. coli*, dépend directement au métabolisme du fer (Kimura, Sakai et al. 2017), corroborant ainsi notre suggestion que RlhA est également une protéine Fe-S. De plus, TrhP est récemment rapporté comme responsable de la C-hydroxylation d'une uridine de l'ARNt d'*E. coli* (Sakai, Kimura et al. 2019). Bien que les auteurs n'aient pas mentionné la relation entre l'activité de TrhP et les centres Fe-S, le motif des quatre cystéines dans la séquence nous laisse penser que TrhP est également une protéine Fe-S. Cette hypothèse a été confirmée par nos travaux qui sera présentée dans le chapitre VI.

Dans les systèmes biologiques, les centres Fe-S sont principalement impliqués dans les réactions de transfert d'électrons, ainsi que dans la liaison et l'activation de substrats, dans la régulation de la transcription, dans le stockage du fer et en tant que donneur de soufre (Johnson, Dean et al. 2005, Lill 2009, Roche, Aussel et al. 2013). Le rôle des centres Fe-S dans UbiU et UbiV est inconnu à ce stade. Notre hypothèse de travail actuelle est qu'ils joueraient un rôle de chaînes de transfert d'électrons entre le substrat (l'intermédiaire biosynthétique de l'ubiquinone à hydroxyler) et un accepteur d'électrons non identifié nécessaire à l'activation du substrat. Ensemble, nos résultats identifient UbiU et UbiV comme des prototypes d'une nouvelle classe d'hydroxylases indépendantes de l'oxygène et ouvrent une nouvelle porte pour l'étude des réactions d'hydroxylation indépendante de l'oxygène.

L'acide préphénique ou le préphénate a été récemment rapporté comme un facteur important pour l'activité d'RlhA et de TrhP (Kimura, Sakai et al. 2017, Sakai, Kimura et al. 2019). Le préphénate est un intermédiaire de la biosynthèse de deux acides aminés aromatiques phénylalanines et tyrosine dans la voie du shikimate. En effet, la délétion des gènes en amont du préphénate dans la voie du shikimate résulte d'une absence des produits hydroxylés d'RlhA et de TrhP. Les résultats génétiques préliminaires de nos collaborateurs montrent bien l'importance du préphénate dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie. Notre hypothèse actuelle est que le préphénate est un donneur d'oxygène moléculaire, car nos collaborateurs ont montré que l'eau n'était pas la source d'oxygène moléculaire (données à publier). Pour l'instant, nous sommes en train de mettre en place le test d'activité *in vitro* en anaérobie, en présence du complexe UbiU-UbiV reconstitué, l'homologue de substrat (farnésyl phénol) synthétisé au labo, le donneur d'hydroxyle (préphénate) et divers oxydants (iridium, cérium...) (Fig. 64).

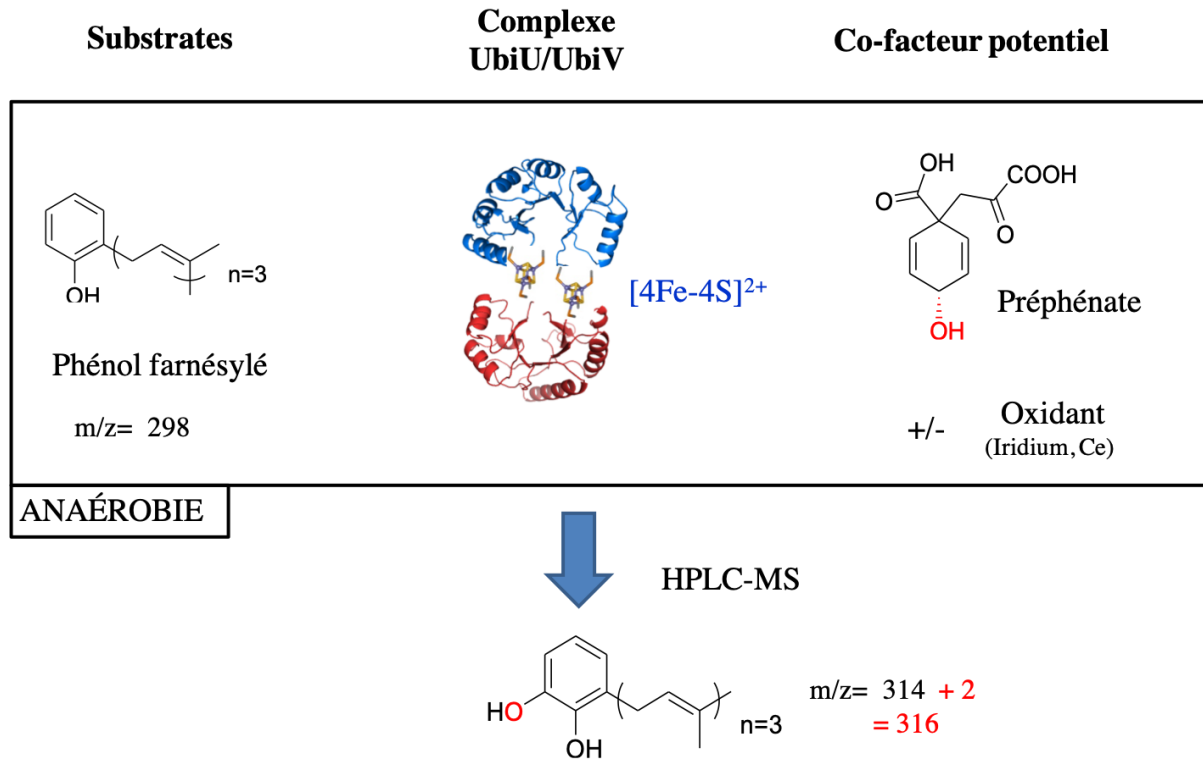


Figure 64. Mise en place du test d'activité du complexe UbiU-UbiV *in vitro*.

Les mélanges de réactions seront analysés par HPLC-MS pour détecter le produit (farnésyl catéchol) et par RMN, dans une grande quantité pour la confirmation. Si nécessaire, nous évaluerons l'implication potentielle d'une autre protéine ou métabolite en ajoutant des extraits cellulaires anaérobiques (fractions solubles et membranaires) de cellules $\Delta ubiU-ubiV$ d'*E. coli* cultivés en anaérobie. Nous envisagerons également d'ajouter à notre test de l'UbiT purifiée (prévu pour lier les intermédiaires de biosynthèse de l'ubiquinone) ou des bicouches lipidiques pour imiter l'environnement hydrophobe.



Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway

Ludovic Pelosi,^a Chau-Duy-Tam Vo,^b  Sophie Saphia Abby,^a Laurent Loiseau,^c Bérengère Rascalou,^a Mahmoud Hajj Chehade,^a Bruno Faivre,^b Mathieu Goussé,^a Clothilde Chenal,^a Nadia Touati,^d Laurent Binet,^d David Cornu,^e Cameron David Fyfe,^b Marc Fontecave,^b Frédéric Barras,^{c,f} Murielle Lombard,^b  Fabien Pierrel^a

^aCNRS, CHU Grenoble Alpes, Grenoble INP, TIMC-IMAG, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

^bLaboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, CNRS UMR 8229, PSL Research University, Sorbonne Université, Paris, France

^cCNRS, Laboratoire Chimie Bactérienne, Institut Microbiologie de la Méditerranée, Aix Marseille Université, Marseille, France

^dENSCP-Chimie ParisTech, Institut de Recherche de Chimie Paris, CNRS UMR 8247, Paris, France

^ePlateforme SiCaPS, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

^fSAME Unit, Department of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France

ABSTRACT Most bacteria can generate ATP by respiratory metabolism, in which electrons are shuttled from reduced substrates to terminal electron acceptors, via quinone molecules like ubiquinone. Dioxygen (O₂) is the terminal electron acceptor of aerobic respiration and serves as a co-substrate in the biosynthesis of ubiquinone. Here, we characterize a novel, O₂-independent pathway for the biosynthesis of ubiquinone. This pathway relies on three proteins, UbiT (YhbT), UbiU (YhbU), and UbiV (YhbV). UbiT contains an SCP2 lipid-binding domain and is likely an accessory factor of the biosynthetic pathway, while UbiU and UbiV (UbiU-UbiV) are involved in hydroxylation reactions and represent a novel class of O₂-independent hydroxylases. We demonstrate that UbiU-UbiV form a heterodimer, wherein each protein binds a 4Fe-4S cluster via conserved cysteines that are essential for activity. The UbiT, -U, and -V proteins are found in alpha-, beta-, and gammaproteobacterial clades, including several human pathogens, supporting the widespread distribution of a previously unrecognized capacity to synthesize ubiquinone in the absence of O₂. Together, the O₂-dependent and O₂-independent ubiquinone biosynthesis pathways contribute to optimizing bacterial metabolism over the entire O₂ range.

IMPORTANCE In order to colonize environments with large O₂ gradients or fluctuating O₂ levels, bacteria have developed metabolic responses that remain incompletely understood. Such adaptations have been recently linked to antibiotic resistance, virulence, and the capacity to develop in complex ecosystems like the microbiota. Here, we identify a novel pathway for the biosynthesis of ubiquinone, a molecule with a key role in cellular bioenergetics. We link three uncharacterized genes of *Escherichia coli* to this pathway and show that the pathway functions independently from O₂. In contrast, the long-described pathway for ubiquinone biosynthesis requires O₂ as a substrate. In fact, we find that many proteobacteria are equipped with the O₂-dependent and O₂-independent pathways, supporting that they are able to synthesize ubiquinone over the entire O₂ range. Overall, we propose that the novel O₂-independent pathway is part of the metabolic plasticity developed by proteobacteria to face various environmental O₂ levels.

KEYWORDS bioenergetics, facultative anaerobes, hydroxylases, iron-sulfur, oxygen, peptidase U32, proteobacteria, quinones, respiration, ubiquinone

Citation Pelosi L, Vo C-D-T, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Goussé M, Chenal C, Touati N, Binet L, Cornu D, Fyfe CD, Fontecave M, Barras F, Lombard M, Pierrel F. 2019. Ubiquinone biosynthesis over the entire O₂ range: characterization of a conserved O₂-independent pathway. *mBio* 10:e01319-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01319-19>.

Editor Dianne K. Newman, California Institute of Technology

Copyright © 2019 Pelosi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Murielle Lombard, murielle.lombard@college-de-france.fr, or Fabien Pierrel, fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr.

L.P. and C.-D.-T.V. contributed equally to the work.

Received 21 May 2019

Accepted 7 June 2019

Published 9 July 2019

Since the oxygenation of the Earth's atmosphere some 2.3 billion years ago, many organisms adopted dioxygen (O_2) as a terminal electron acceptor of their energy-producing respiratory chains (1). Indeed, oxygenic (aerobic) respiration has an energetic output superior to that of anaerobic respiration or fermentation, which are both O_2 -independent processes (1). In fact, several microorganisms, including many important human pathogens, are facultative anaerobes that are able to adopt either an aerobic or an anaerobic lifestyle depending on the environmental conditions (2, 3). In the laboratory, bacteria are usually cultured and studied under fully aerobic or completely anaerobic conditions (absence of O_2) (4), whereas natural habitats cover the entire range of O_2 concentrations (5). For instance, large O_2 gradients are typically encountered in the human large intestine, in biofilms, or in transition zones between oxic and anoxic environments (5). Moreover, bacteria can experience rapid transitions between environments with vastly different O_2 contents, such as during the infection process of enteric pathogens that progress along the gastrointestinal tract (3).

To maximize their bioenergetic capacities according to the various levels of O_2 encountered in their environment, bacteria modulate the composition of their respiratory chains, notably the quinone species and the terminal reductases (3, 4, 6). Quinones are lipophilic redox molecules that fuel electrons to terminal reductases, which reduce O_2 whenever available, or alternative electron acceptors, for instance, nitrate, dimethyl sulfoxide (DMSO), and trimethylamine N-oxide (7). Naphtoquinones (menaquinone [MK] and demethylmenaquinone [DMK]) and ubiquinone (UQ) are the two main groups of bacterial quinones. (D)MK and UQ differ by the nature of their head group and the value of their redox midpoint potential (8). (D)MK are considered anaerobic quinones, since they function primarily in anaerobic respiration, whereas UQ is considered an aerobic quinone, because it supplies electrons mostly to the reductases that reduce O_2 (1, 8, 9). Accordingly, UQ is the main quinone of the facultative anaerobe *Escherichia coli* under aerobic conditions, whereas the naphtoquinones are predominant in the absence of O_2 (10, 11), with UQ nevertheless being present.

The biosynthesis of UQ requires a total of eight reactions to modify the aromatic ring of the precursor, 4-hydroxybenzoic acid (4-HB): one prenylation, one decarboxylation, three hydroxylation, and three methylation reactions (Fig. 1A) (12). In addition to the enzymes that catalyze the various steps, three accessory factors, UbiB, UbiJ, and UbiK, are also needed. UbiB has an ATPase activity (13), and we showed that UbiJ and UbiK (14, 15) belong to a multiprotein UQ biosynthesis complex, in which the SCP2 domain (sterol carrier protein 2) of UbiJ binds the hydrophobic UQ biosynthetic intermediates (16). This UQ biosynthetic pathway is dependent upon O_2 , since all three hydroxylases, UbiL, UbiH, and UbiF, use O_2 as a cosubstrate (Fig. 1A) (17, 18). We showed recently that other hydroxylases, UbiL, UbiM, and Coq7, replace UbiL, UbiH, and UbiF in some proteobacteria (19). The six hydroxylases have in common their dependence on O_2 and, thus, function in UQ biosynthesis only when sufficient O_2 is available. Interestingly, Alexander and Young established 40 years ago that *E. coli* was able to synthesize UQ anaerobically (20), suggesting the existence of an O_2 -independent biosynthesis pathway, which is still uncharacterized.

In this study, we describe the O_2 -independent UQ biosynthetic pathway in *E. coli* and identify three essential components, the UbiT, UbiU, and UbiV proteins, formerly called YhbT, YhbU, and YhbV. We show that the O_2 -independent UQ biosynthetic pathway is widely conserved in proteobacteria. UbiT likely functions as an accessory factor in the O_2 -independent UQ biosynthetic pathway, and we show that UbiU and UbiV are involved in at least one O_2 -independent hydroxylation reaction. Moreover, we demonstrate that both UbiU and UbiV bind a [4Fe-4S] cluster essential for activity, which identifies these proteins as prototypes of a new class of O_2 -independent hydroxylases. Our results highlight that many proteobacterial species use two different and complementary molecular pathways to produce UQ over the entire continuum of environmental O_2 .

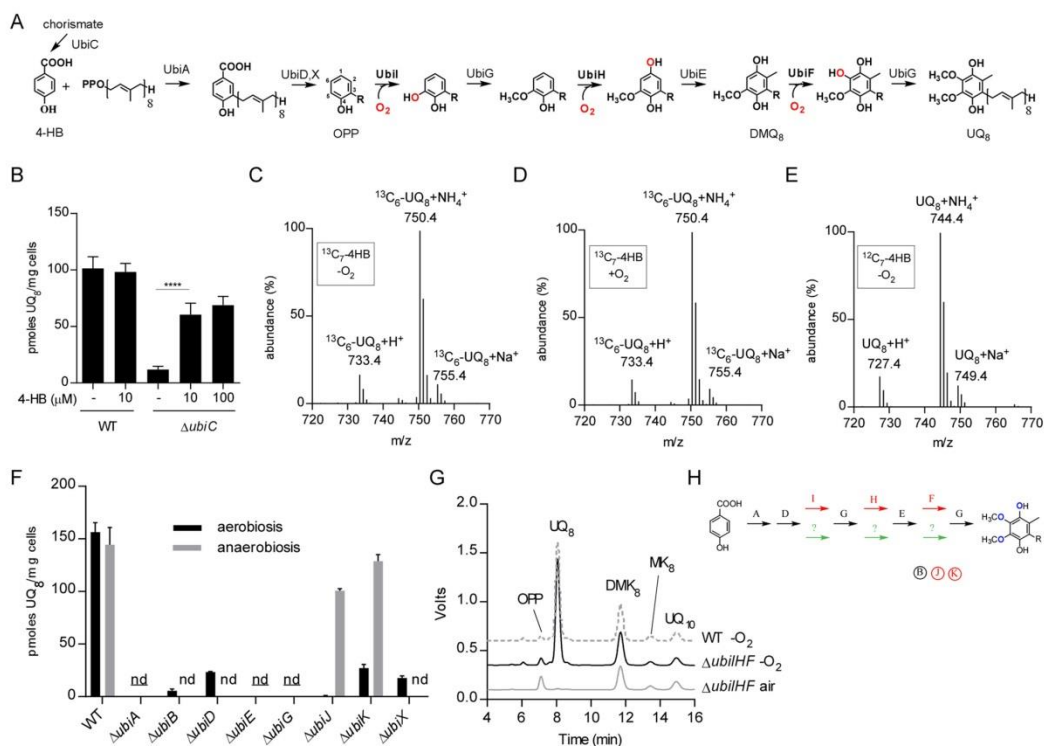


FIG 1 Aerobic and anaerobic UQ biosynthetic pathways differ only in the hydroxylation steps. (A) O₂-dependent UQ biosynthesis pathway in *E. coli*. The octaprenyl tail is represented by R on the biosynthetic intermediates, and the numbering of the aromatic carbon atoms is shown on OPP. Abbreviations used are 4-HB for 4-hydroxybenzoic acid, OPP for octaprenylphenol, DMQ₈ for C6-demethoxy-ubiquinone 8, and UQ₈ for ubiquinone 8. (B) UQ₈ quantification of WT and Δ*ubiC* cells grown anaerobically in glycerol-nitrate medium supplemented with the indicated concentrations of 4-HB or left unsupplemented. Values are means ± standard deviations (SD) (*n* = 3 to 6). ****, *P* < 0.0001 by unpaired Student's *t* test. (C to E) Mass spectra of UQ₈ obtained by HPLC-MS analysis of lipid extracts from cells grown with ¹³C₇-4-HB either anaerobically (C) or aerobically (D) or anaerobically with unlabeled 4-HB (E). (F) UQ₈ quantification from WT and Δ*ubi* cells grown anaerobically in SMGN medium overnight or aerobically in LB medium until an OD of 0.8 was reached. nd, not detected under aerobic and anaerobic conditions; nd, not detected under anaerobic conditions. Values are means ± SD (*n* = 3 to 4). (G) HPLC-ECD analyses (mobile phase 1) of lipid extracts from 1 mg of WT or Δ*ubiIHF* cells grown in LB medium under air or anaerobic conditions (-O₂). Chromatograms are representative of *n* = 3 independent experiments (UQ₁₀ used as a standard). (H) UQ biosynthesis represented with Ubi enzymes specific to the O₂-dependent pathway (red), to the O₂-independent pathway (green), or common to both pathways (black). The same color code applies to the accessory factors (circled).

RESULTS

4-HB is the precursor of UQ synthesized under anaerobic conditions. 4-HB is the precursor of UQ synthesized under aerobic conditions (21). Accordingly, an *E. coli* Δ*ubiC* mutant impaired in 4-HB biosynthesis (22) is deficient in UQ₈ and is complemented by addition of 4-HB to the growth medium (23). In order to evaluate whether 4-HB is also the precursor of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway, we grew a Δ*ubiC* strain anaerobically. The Δ*ubiC* strain showed a diminished level of UQ₈, which was partially recovered by supplementation with 4-HB (Fig. 1B). Furthermore, we grew the Δ*ubiC* strain in medium supplemented with ¹³C₇-4-HB and analyzed the labeling of biosynthesized UQ₈ by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). In cells grown under aerobic or anaerobic conditions, the labeled form of UQ represented 98.3% and 97.3% (±0.2%), respectively, of the total UQ₈ pool (Fig. 1C and D). As expected, Δ*ubiC* cells grown anaerobically with unlabeled 4-HB did not show any ¹³C₆-UQ₈ (Fig. 1E). Together, these results establish that 4-HB is the precursor of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway.

Ubi enzymes, except hydroxylases, are common to the aerobic and anaerobic UQ biosynthesis pathways.

The above-described result suggests that the UQ biosynthetic pathways decorate 4-HB with the same chemical groups irrespective of the presence of environmental O₂. Thus, we evaluated whether the enzymes of the aerobic pathway are also involved in the O₂-independent pathway by measuring the UQ₈ content of knockout (KO) strains grown under aerobic and anaerobic conditions. Deletion of *ubiA*, *ubiE*, or *ubiG* abrogated UQ₈ biosynthesis under both conditions, whereas *ΔubiB*, *ΔubiD*, and *ΔubiX* strains synthesized a limited amount of UQ₈ but only under aerobic conditions (Fig. 1F). In contrast, *ubiJ* and *ubiK* had no effect on UQ biosynthesis under anaerobic conditions (Fig. 1F).

Under aerobic conditions, the hydroxylation reactions are catalyzed by the flavin monooxygenases (FMOs) UbiF, UbiH, and UbiI that use dioxygen as a cosubstrate (17, 18, 24) (Fig. 1A). We previously reported that cells deleted for a single O₂-dependent hydroxylase (*ΔubiF*, *ΔubiI*, or *ΔubiH* cells) were deficient in UQ when cultured in the presence of air but synthesized UQ under anaerobic conditions (17), consistent with the existence of an alternative hydroxylation system in the O₂-independent pathway (20). Indeed, we confirmed that all three FMOs are dispensable for the O₂-independent UQ biosynthetic pathway, since a *ΔubiF ΔubiI ΔubiH* triple mutant was deficient for UQ when grown in air but synthesized wild-type (WT) levels of UQ₈ under anaerobic conditions (Fig. 1G). Together, our results demonstrate that the O₂-dependent and O₂-independent UQ biosynthetic pathways share the enzymes involved in the prenylation (UbiA), decarboxylation (UbiX and UbiD), and methylation (UbiE and UbiG) reactions but differ in their hydroxylases and the accessory factors UbiJ and UbiK (Fig. 1H).

Identification of three genes required for UQ biosynthesis under anaerobic conditions.

To identify genes involved in the O₂-independent UQ biosynthetic pathway, we cultivated anaerobically a collection of ~200 *E. coli* strains that contained deletions covering multiple open reading frames (ORFs) (25, 26), and we analyzed their UQ₈ content by HPLC-electrochemical detection (HPLC-ECD). We found a complete absence of UQ₈ in strains ME4561, ME5034, and ME4746 that carry deletions encompassing *ubiE-ubiJ-ubiB-ubiD*, *ubiG*, and *ubiX*, respectively (see Table S1 in the supplemental material). Several other strains had a low UQ₈ content and poor growth in synthetic medium supplemented with glycerol and nitrate (SMGN). However, those strains showed better growth and higher UQ₈ content in LB medium (Table S1). Thus, we did not investigate them further, as a genetic defect affecting directly the O₂-independent UQ pathway was unlikely. In contrast, ME4641 showed a profound UQ₈ deficiency and robust anaerobic growth in LB and SMGN media (Table S1). Importantly, ME4641 had a WT UQ₈ level when grown aerobically, suggesting that only the O₂-independent pathway was altered (Fig. 2A). ME4641 contains a deletion named OCL30-2 that covers 9 genes, 5 of them lacking an identified function (Fig. 2B). To find the candidate gene involved in the anaerobic biosynthesis of UQ, we obtained 8 single-gene KO strains from the Keio collection (27) and analyzed their quinone content after anaerobic growth (Fig. 2C). The *ΔyhbT* and *ΔyhbU* strains were strongly deficient in UQ₈. We then transduced the *ΔyhbT* and *ΔyhbU* mutations from the Keio strains into an MG1655 genetic background and also constructed the *ΔyhbV* strain, which was not available in the Keio collection. We found that all three strains had very low levels of UQ₈ when grown under anaerobic conditions but showed normal levels after aerobic growth (Fig. 2D, Table 1). In addition, the mutant strains showed a 2-fold decrease in MK₈ and a 2-fold increase in DMK₈ after anaerobic growth (Table 1). This effect might indirectly result from the UQ₈ deficiency, as it was also observed in the *ΔubiG* strain (Fig. S1A).

Deletion of *yhbT*, *yhbU*, or *yhbV* causes UQ₈ deficiency specifically under anaerobic conditions.

We then transformed the mutant strains with an empty vector or a vector carrying a WT allele of the studied gene. In *yhb* KO strains expressing the corresponding gene from the plasmid, we observed a complementation of the UQ₈ deficiency (Table 1) and a normalization of the levels of octaprenylphenol (OPP), an

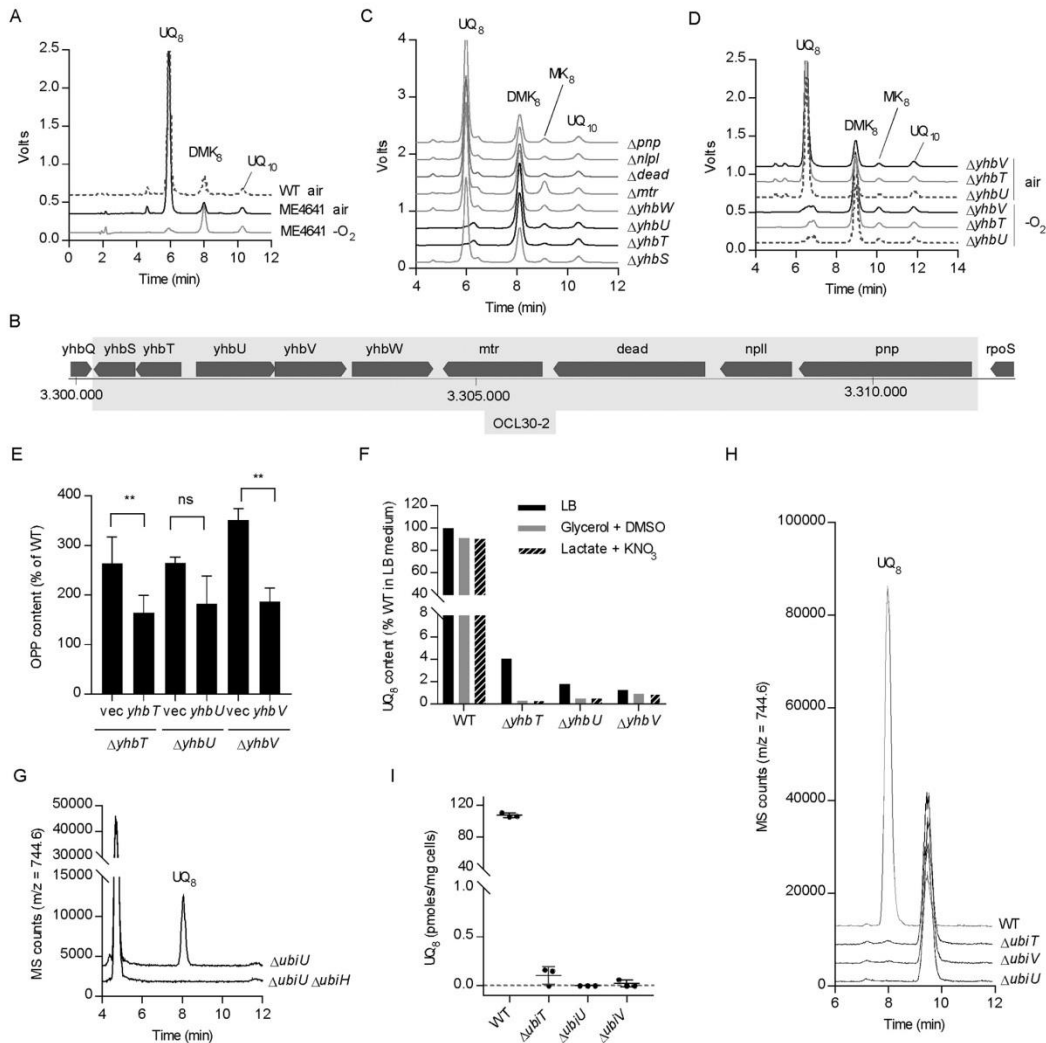


FIG 2 *yhbT*, *yhbU*, and *yhbV* are essential to the anaerobic biosynthesis of UQ. (A) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from ME4641 strain grown in SMGN either aerobically or anaerobically (–O₂). (B) Genomic region covered by the OCL30-2 deletion in the ME4641 strain. (C) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from knockout strains of the individual genes covered by the OCL30-2 deletion grown in SMGN anaerobically. (D) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from $\Delta yhbT$, $\Delta yhbU$, and $\Delta yhbV$ strains constructed in the MG1655 background and grown in SMGN either aerobically or anaerobically. HPLC-ECD analyses with mobile phase 2 (A, C, and D). (E) OPP content (as a percentage of the WT, mass detection M+NH₄⁺) in cells from Table 1. The Δyhb strains contain either an empty plasmid or a plasmid carrying the indicated gene and were cultured anaerobically in SMGN containing 0.02% arabinose. Values are means \pm SD ($n = 3$ to 5). **, $P < 0.01$ by unpaired Student's *t* test. (F) UQ₈ content (as a percentage of the WT grown in LB medium) of cells cultured anaerobically in SM containing the indicated carbon sources and electron acceptors. (G) Single-ion monitoring for UQ₈ (M+NH₄⁺) in HPLC-MS analysis (mobile phase 1) of lipid extracts from 1 mg of $\Delta ubiU$ or $\Delta ubiU \Delta ubiH$ cells grown in SMGN under anaerobic conditions. (H) Single-ion monitoring in HPLC-MS analysis (mobile phase 1) of lipid extracts from 1.6 mg of cells grown in LB medium under strict anaerobic conditions and quenched in methanol. Chromatograms are representative of $n = 3$ independent experiments (G and H). (I) UQ₈ content of cells described for panel H (quantification of the signal at 8 min with m/z 744.6). Values are means \pm SD ($n = 3$).

early UQ₈ biosynthetic intermediate (Fig. 2E). The ~3-fold elevation of OPP in the *yhbT*, *-U*, and *-V* KO mutants suggested that the O₂-independent UQ biosynthetic pathway was blocked downstream of OPP in these strains. In these experiments, no cross-complementation was observed, for example, the plasmid with *yhbV* had no effect on

Downloaded from <http://mbio.asm.org/> on September 6, 2019 at College de France - Institut Biologie

TABLE 1 Quinone content of WT and *Δyhb* strains cultured in SMGN either aerobically or anaerobically^a

Culture condition	Strain	Quinone content		
		UQ ₈ (pmol/mg cells)	DMK ₈ (247-nm peak area/mg cells)	MK ₈ (247-nm peak area/mg cells)
Air	WT	208 ± 9.4	0.94 ± 0.26	0.15 ± 0.09
Air	<i>ΔyhbT</i>	193.9 ± 12.4	1.34 ± 0.05	0.13 ± 0.03
Air	<i>ΔyhbU</i>	233.8 ± 16.2	0.9 ± 0.26	0.16 ± 0.09
Air	<i>ΔyhbV</i>	227.9 ± 25.1	0.93 ± 0.15	0.13 ± 0.04
Anaerobic	WT	114.2 ± 19.1	1.28 ± 0.4	0.41 ± 0.15
Anaerobic	<i>ΔyhbT</i>	3.3 ± 0.4	2.88 ± 0.47	0.17 ± 0.01
Anaerobic	<i>ΔyhbU</i>	6.1 ± 3.3	2.55 ± 0.55	0.19 ± 0.01
Anaerobic	<i>ΔyhbV</i>	7.3 ± 4.7	2.61 ± 0.49	0.21 ± 0.01
Anaerobic	<i>ΔyhbT</i> +pK	2 ± 0.4	2.46 ± 0.33	0.16 ± 0.04
Anaerobic	<i>ΔyhbT</i> +pK-yhbT	64.6 ± 16.1	1.77 ± 0.29	0.3 ± 0.04
Anaerobic	<i>ΔyhbU</i> +pBAD	1 ± 0.6	2.29 ± 0.58	0.18 ± 0.04
Anaerobic	<i>ΔyhbU</i> +pBAD-yhbU	82 ± 15.9	1.2 ± 0.18	0.27 ± 0.04
Anaerobic	<i>ΔyhbV</i> +pBAD	2.2 ± 3.5	2.14 ± 0.15	0.23 ± 0.01
Anaerobic	<i>ΔyhbV</i> +pBAD-yhbV	120.4 ± 18.5	1.87 ± 0.19	0.42 ± 0.06

^an = 3 to 5. For strains containing pK or pBAD vectors, SMGN was supplemented with 0.02% arabinose.

ΔyhbT or *ΔyhbU* strains, suggesting the absence of redundancy in the function of each gene. We also measured a profound UQ₈ deficiency when the *ΔyhbT*, *ΔyhbU*, and *ΔyhbV* strains were grown anaerobically in various media (glycerol plus DMSO, lactate plus KNO₃) (Fig. 2F), showing that the UQ₈ biosynthetic defect is not linked to a particular carbon source or electron acceptor. Altogether, our results demonstrate that the *yhbT*, *yhbU*, and *yhbV* genes are part of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway, so we propose to rename them *ubiT*, *ubiU*, and *ubiV*, respectively.

Complete absence of UQ biosynthesis in *ΔubiT*, *ΔubiU*, and *ΔubiV* mutants grown under strict anaerobic conditions. As the *ΔubiT*, *ΔubiU*, and *ΔubiV* strains still contained small amounts of UQ₈ after growth under anaerobic conditions (Table 1 and Fig. 2F), we wondered how this UQ₈ was synthesized. To verify if the O₂-dependent pathway contributed to this synthesis, we inactivated the *ubiH* gene in the *ΔubiU* strain. Sensitive HPLC-MS detection established that UQ₈ was completely absent from extracts from the *ΔubiH ΔubiU* cells (Fig. 2G). This result supported that the residual UQ₈ synthesized in *ΔubiU* cells originated from the O₂-dependent pathway and suggested that our anaerobic media contain trace amounts of O₂ or that O₂-dependent UQ biosynthesis occurs during the handling of cells, under normal atmosphere, prior to quinone extraction.

To eliminate the traces of O₂, we took extra precautions in the degassing and inoculation of our media (see Materials and Methods) and also added a reductant (L-cysteine). In addition, we used the redox indicator resazurin to verify strict anaerobiosis during the entire culture. We also modified our sampling procedure to rapidly quench the anaerobic cells in ice-cold methanol in order to prevent any O₂-dependent UQ biosynthesis prior to quinone extraction. HPLC-MS analysis of extracts from cells cultivated and handled under such strict anaerobic conditions showed the nearly complete absence of UQ₈ in *ΔubiT*, *ΔubiU*, and *ΔubiV* strains (Fig. 2H and I). In contrast, the UQ₈ level of the WT strain (Fig. 2I) was comparable to those we measured previously in WT cells cultivated under suboptimal anaerobic conditions (Table 1) (14), establishing that UQ biosynthesis occurred independently from O₂. Together, our results show that *ΔubiT*, *ΔubiU*, and *ΔubiV* cells are unable to synthesize UQ under strict anaerobic conditions, unlike WT cells. Furthermore, our results support that the low residual UQ content previously observed in *ΔubiT*, *ΔubiU*, and *ΔubiV* strains (Table 1 and Fig. 2F) resulted from the function of the O₂-dependent pathway.

***ubiT*, *-U*, and *-V* strongly cooccur exclusively in genomes with potential for UQ biosynthesis.** We investigated the distribution of *ubiT*, *-U*, and *-V* in a large genome data set of 5,750 genomes of bacteria and archaea. We found no evidence of genomes harboring matches for more than one of the three genes of interest outside of *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria* and three genomes

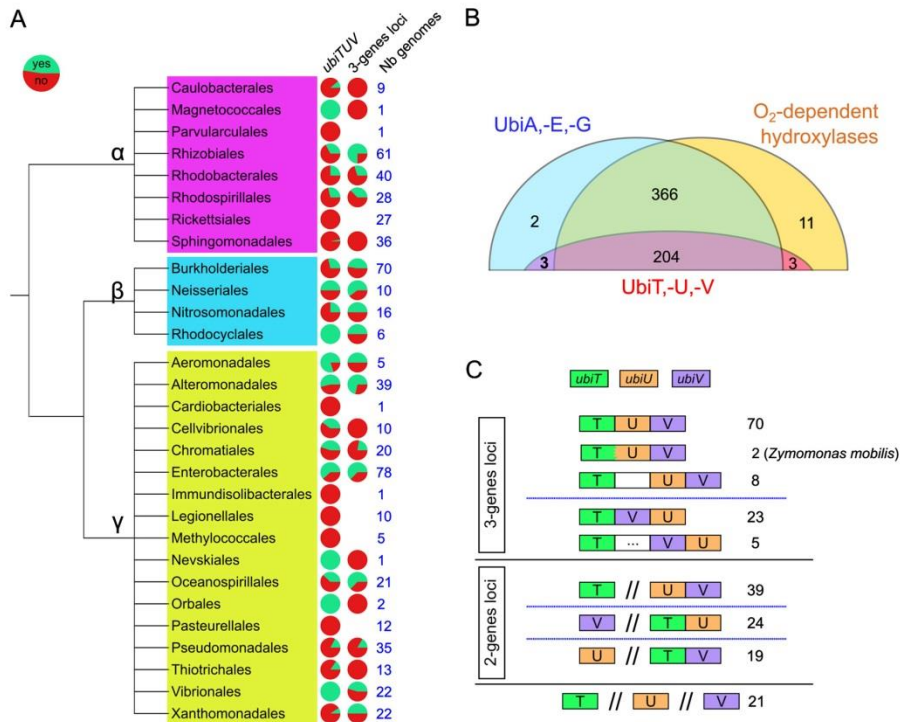


FIG 3 *ubiT*, -*U*, and -*V* occurrence and genetic architecture in proteobacterial genomes. (A) The proportion of genomes with (green) and without (red) all three genes, *ubiTUV* (left column), is indicated for each proteobacterial order known to synthesize UQ. The middle column, labeled 3-genes loci, displays the proportion of genomes with the three genes either at a single locus (green) or at different loci (red). The number of genomes analyzed for each order is given in the right column (Nb genomes). (B) Occurrence in the reference proteobacterial genomes of the marker proteins (UbiA, -E, and -G), of the O₂-dependent hydroxylases, and of the UbiT, -U, and -V proteins. The number in boldface represents the 3 genomes (*P. fulvum*, *M. marinus*, and *O. formigenes*) containing exclusively the O₂-independent pathway. (C) The distinct genetic architectures found for *ubiT*, -*U*, and -*V* in genomes where the three genes were present are displayed as boxes with different colors. The numbers of cases corresponding to each depicted architecture are given on the right. A white box corresponds to a gene found between the genes of interest, and a white box with dots corresponds to two to five genes between the genes of interest.

of *Acidithiobacillia* (Table S2A). Interestingly, the three former classes are the only ones known so far to be able to produce UQ (1, 8), consistent with a specific link between UbiT, -U, and -V and UQ biosynthesis.

This was confirmed by analyzing in more detail the distribution of *ubiT*, -*U*, and -*V* and three marker genes of the UQ biosynthetic pathway (*ubiA*, *ubiE*, and *ubiG*) in 611 representative and reference genomes of alpha-, beta-, and gammaproteobacteria (Table S2B). We chose *ubiA*, -*G*, and -*E* because they have a higher conservation than other genes, like *ubiC*, -*D*, and -*X* (28), and because they are part of the O₂-dependent and O₂-independent pathways (Fig. 1H). A total of 575 genomes had positive matches for *ubiA*, -*G*, and -*E*, and 589 had positive matches for at least two of them. Regarding the distribution of *ubiT*, -*U*, and -*V*, 221 genomes had matches for at least one of the three genes, and in 210 cases (95%) the three genes were present. Importantly, all genomes with *ubiT*, -*U*, and -*V* harbored at least two of the three marker genes for the UQ biosynthetic pathway (Table S2B). In addition, we found that 22 out of the 29 proteobacterial orders analyzed had up to 50% of genomes harboring a complete set of the *ubiT*, -*U*, and -*V* genes (Fig. 3A), demonstrating a wide taxonomic distribution.

Overall, our analysis indicates a strong pattern of cooccurrence of *ubiT*, *-U*, and *-V* and demonstrates that they are uniquely found in genomes showing signs of UQ production.

We found *ubiA*, *-G*, and *-E* and O₂-dependent hydroxylase genes in 570 genomes, of which 204 also contained *ubiT*, *-U*, and *-V* (Table S2B and Fig. 3B). Only 3 species, *Phaeospirillum fulvum*, *Magnetococcus marinus*, and *Oxalobacter formigenes*, seem to rely exclusively on the O₂-independent pathway for UQ production, as their genomes contain the *ubiT*, *-U*, and *-V* genes but no O₂-dependent hydroxylases (Fig. 3B). We noticed that the *ubiT*, *-U*, and *-V* genes are found next to other *ubi* genes in *M. marinus* (Fig. S1B). Interestingly, *P. fulvum* and *M. marinus* were described to synthesize UQ under microaerobic conditions (29–31), and *O. formigenes* has been documented as an obligate anaerobe (32). Together, our results show that the O₂-independent UQ biosynthesis pathway is widespread in alpha-, beta-, and gammaproteobacterial orders and coexists with the O₂-dependent pathway in 98% of the cases.

We then looked into the relative positioning of *ubiT*, *-U*, and *-V* in the 210 genomes harboring the three genes. We found 106 cases, covering alpha-, beta-, and gammaproteobacterial orders, where they were located next to each other (termed 3-gene loci) and 82 cases of a 2-gene locus, with the third gene being elsewhere in the genome (Fig. 3C). Evaluation of the genetic architecture of *ubiT*, *-U*, and *-V* revealed that *ubiU* and *ubiV* were found exactly next to each other in 69% of the loci (in all 3-gene loci and in 39/82 of the 2-gene loci) and that the three genes were located in three separate parts of the genome in only 21 cases (Fig. 3C). Interestingly, as an additional support for their involvement in the same function, we found an example of a gene fusion between *ubiT* and *ubiU* in two genomes from *Zymomonas mobilis* strains (alphaproteobacteria), which also contain a *ubiV* gene directly downstream of the fused gene (Fig. 3C).

UbiT is an SCP2 protein, and UbiU-UbiV are required for the O₂-independent hydroxylation of DMQ₈. We then analyzed the sequences of the UbiT, UbiU, and UbiV proteins. The major part of UbiT (amino acids [aa] 45 to 133, from a total of 174 aa in the *E. coli* protein) corresponds to an SCP2 domain (Pfam entry PF02036) (Fig. S2). SCP2 domains typically form a hydrophobic cavity that binds various lipids (33), and our sequence alignment indeed showed the conservation of hydrophobic amino acids at several positions in the SCP2 domain of UbiT (Fig. S2). Recently, we reported that UbiJ binds UQ biosynthetic intermediates in its SCP2 domain and organizes a multiprotein complex composed of several Ubi enzymes (16). We propose that UbiT and its SCP2 domain fulfill similar functions in the O₂-independent UQ pathway, as UbiJ is required exclusively for the O₂-dependent biosynthesis of UQ (Fig. 1F).

UbiU and UbiV have ~330 and 300 aa, respectively, and contain an uncharacterized motif called peptidase U32 (PF01136) (Fig. S3 and S4). Since only the hydroxylation reactions are uncharacterized in the O₂-independent pathway (Fig. 1H), we hypothesized that UbiU and UbiV function in these steps. To test our hypothesis, we developed an *in vivo* assay based on the O₂-independent conversion of labeled DMQ₈ into labeled UQ₈. This assay monitors the C6-hydroxylation and the subsequent O6-methylation (Fig. 4A). *ΔubiC ΔubiF* cells grown aerobically with ¹³C₇-4-HB synthesized DMQ₈, 73% of which was labeled with ¹³C₆. Upon transfer to anaerobic conditions, the cells gradually converted a significant part of (¹³C₆)-DMQ₈ into (¹³C₆)-UQ₈ (Fig. 4B). Inactivation of either *ubiU* or *ubiV* in *ΔubiC ΔubiF* cells did not perturb the accumulation of (¹³C₆)-DMQ₈ but prevented its conversion into (¹³C₆)-UQ₈ (Fig. 4C and D). This result demonstrates that UbiU and UbiV are essential for the C6-hydroxylation reaction of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway.

UbiV contains a [4Fe-4S] cluster. To gain insights into the potential presence of cofactors in UbiU and UbiV, we attempted to characterize them biochemically. UbiU was not soluble but we purified UbiV_{6His}, which behaved as a monomer in solution (Fig. S5A and B). UbiV was slightly pink-colored and had a UV-visible (UV-Vis) absorption spectrum with features in the 350- to 550-nm region (Fig. 5A, dotted line), suggesting

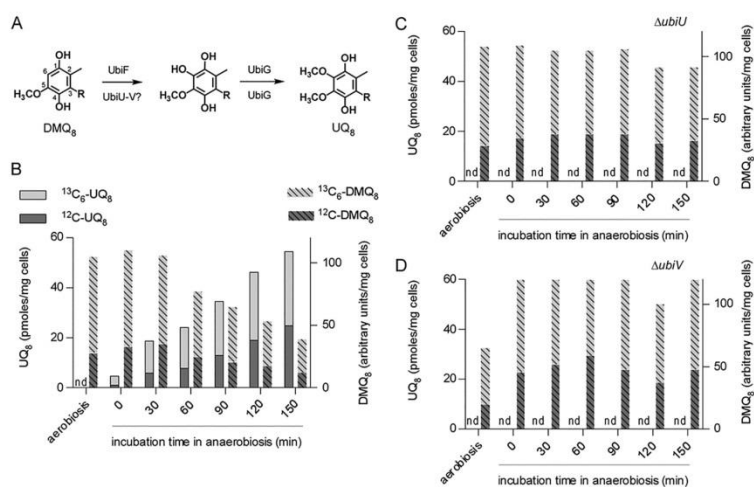


FIG 4 UbiU and UbiV are necessary for the anaerobic conversion of DMQ₈ into UQ₈. (A) Conversion of DMQ₈ to UQ₈ with enzymes of the O₂-dependent and the O₂-independent pathways, indicated above and below arrows (numbering of carbon atoms shown on DMQ₈ and polyprenyl tail represented by R). (B) Quantification by HPLC-MS (monitoring of Na⁺ adducts) of unlabeled (¹²C) DMQ₈ and UQ₈ in $\Delta ubiC \Delta ubiF$ cells after aerobic growth and transition to anaerobiosis. (C and D) Same as panel B but with $\Delta ubiC \Delta ubiF \Delta ubiU$ cells (C) and $\Delta ubiC \Delta ubiF \Delta ubiV$ cells (D). nd, not detected. Results are representative of two independent experiments (B to D).

the presence of iron-sulfur (Fe-S) species (34–36). We indeed detected substoichiometric amounts of iron and sulfur (0.2 Fe and 0.2 S/monomer), indicating oxidative degradation of the [Fe-S] cluster during aerobic purification, as already observed with many other Fe-S proteins (37, 38). Consistent with this hypothesis, anaerobic reconstitution of the [Fe-S] cluster yielded a UbiV protein with 3.9 iron and 3.3 sulfur/monomer (Table 2) and with a UV-Vis spectrum characteristic of a [4Fe-4S]²⁺ cluster (39) (Fig. 5A, solid line) that was affected by exposure to air (Fig. 55C). The electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum of the cluster reduced anaerobically displayed features characteristic of a [4Fe-4S]¹⁺ cluster in the spin state $S = 1/2$ (Fig. 5B) (38, 40). Overall, we conclude that, under anaerobic conditions, UbiV is able to bind one air-sensitive, redox-active [4Fe-4S] cluster.

[Fe-S] clusters are typically coordinated by cysteine residues (41, 42), and we obtained evidence that the [4Fe-4S] cluster in UbiV is coordinated by four conserved cysteines arranged in a CX_nCX_{1,2}CX₃C motif (Fig. 54). Indeed, combinatorial elimination of C39, C180, C193, and C197 in double, triple, and quadruple mutants resulted in proteins incapable of binding [Fe-S] clusters *in vivo*, as shown by the absence of absorption bands in the 350- to 550-nm region of their UV-Vis spectra (Fig. 55D). Furthermore, after anaerobic reconstitution of the cluster, the Fe and S contents and the absorbance at 410 nm were largely decreased in the double and triple mutants and were undetectable in the quadruple mutant (Table 2 and Fig. 5C). Finally, we found that the mutation of C180 or C193 altered the function of UbiV *in vivo* (Fig. 5D), suggesting that the [4Fe-4S] cluster is important for activity.

UbiU contains a [4Fe-4S] cluster and forms a complex with UbiV. We succeeded in purifying UbiU after coexpressing it with UbiV_{6His} (Fig. S6A). The two proteins copurified in the form of a heterodimer (Fig. S6A and B) that showed traces of [Fe-S] clusters (Fig. 6A, dotted line), with substoichiometric amounts of iron and sulfide (0.4 Fe and 0.4 S/heterodimer). Reconstitution with iron and sulfide yielded a heterodimer with about 8 iron and 8 sulfur (Table 2) and a UV-visible spectrum characteristic of [4Fe-4S]²⁺ clusters (Fig. 6A, solid line). The EPR spectrum of reduced UbiU-UbiV was

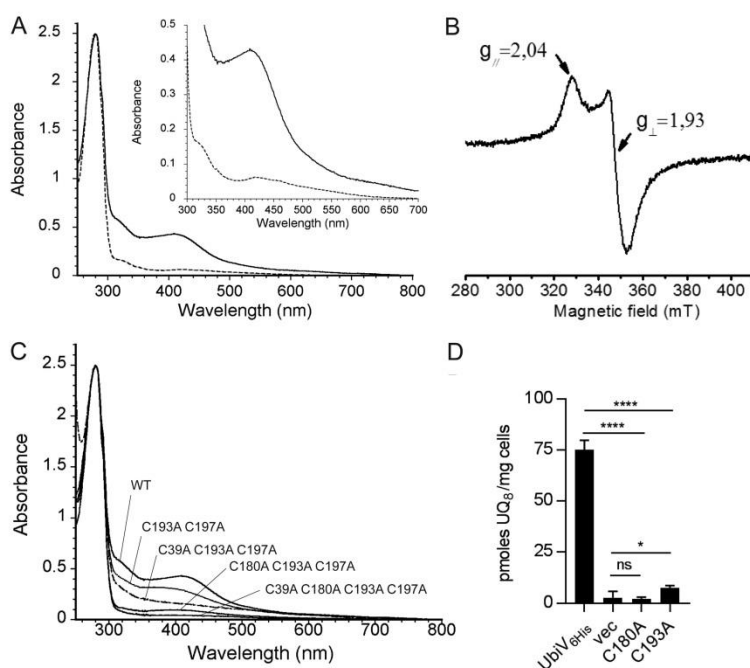


FIG 5 UbiV binds a [4Fe-4S] cluster. (A) UV-visible absorption spectra of as-purified UbiV (dotted line, 47 μ M) and reconstituted holo-UbiV (solid line, 41 μ M). The inset is an enlargement of the 300- to 700-nm region. The molar extinction coefficient, ϵ_{410nm} , was determined to be $10.8 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for holo-UbiV. (B) X-band EPR spectrum of 785 μ M dithionite-reduced holo-UbiV. Recording conditions were the following: temperature, 10K; microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 0.6 mT. (C) Comparative UV-visible absorption spectra of WT and different Cys-to-Ala mutants of UbiV after [Fe-S] cluster reconstitution, with the following concentrations: 41 μ M WT, 44 μ M C193A C197A, 46 μ M C39A C193A C197A, 47 μ M C180A C193A C197A, and 54 μ M C39A C180A C193A C197A. (A to C) Proteins were in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl, 15% glycerol, 1 mM DTT. (D) UQ₈ quantification of Δ ubiV cells transformed with pBAD-UbiV^{OHIS}, pBAD-UbiV^{OHIS} C180A, pBAD-UbiV^{OHIS} C193A, or empty pBAD and grown overnight in anaerobic 5MGN plus 0.02% arabinose. Values are means \pm SD ($n = 4$ to 5). *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$; both by unpaired Student's t test.

also consistent with the presence of 2 different [4Fe-4S] clusters since it showed a composite signal, which reflects the presence of two different $S = 1/2$ species (Fig. 6B).

Four strictly conserved cysteines are also found in UbiU (Fig. S3), and we hypothesized that they bind the [4Fe-4S] cluster. We eliminated these cysteines in pairs and

TABLE 2 Characterization of UbiV proteins and UbiU-UbiV heterodimeric complexes^a

Proteins	A_{280}/A_{410}	Content (nmol/nmol of protein)	
		Iron	Sulfur
UbiV WT	5.8	3.9 ± 0.13	3.3 ± 0.18
UbiV C193A C197A	8.4	2.4 ± 0.02	2.2 ± 0.13
UbiV C39A C193A C197A	15.5	1.9 ± 0.01	1.5 ± 0.4
UbiV C180A C193A C197A	26.7	0.7 ± 0.05	0.6 ± 0.1
UbiV C39A C180A C193A C197A	57.4	0.1 ± 0.04	0
UbiU WT-UbiV WT	4.3	7.9 ± 0.05	7.5 ± 0.06
UbiU C169A C176A-UbiV WT	7.3	4.7 ± 0.03	5.8 ± 0.1
UbiU C193A C232A-UbiV WT	8	3.9 ± 0.05	5.8 ± 0.1

^aShown are metal content and UV-Vis properties after attempts of anaerobic reconstitution of their Fe-S centers for both wild-type and mutant proteins.

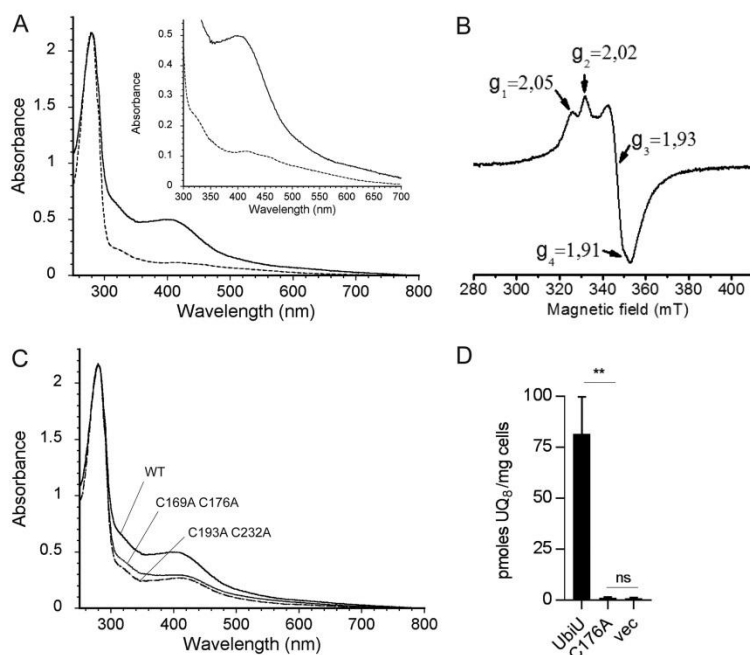


FIG 6 UbiU-V complex binds two [4Fe-4S] clusters. (A) UV-visible absorption spectra of as-purified UbiU-UbiV (dotted line, 17 μ M) and reconstituted holo-UbiU-UbiV (solid line, 15.5 μ M). The inset shows an enlargement of the 300- to 700-nm region. (B) X-band EPR spectrum of 339 μ M dithionite-reduced holo-UbiU-UbiV. Recording conditions were the following: temperature, 10K; microwave power, 2 mW; modulation amplitude, 0.6 mT. (C) Comparative UV-visible absorption spectra of Cys-to-Ala mutants of UbiU in the UbiU-UbiV complex after metal cluster reconstitution with the following concentrations: 15.5 μ M WT, 16.0 μ M UbiU C169A C176A, and 16.0 μ M UbiU C193A C232A. (A to C) Proteins were in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% glycerol, 1 mM DTT. (D) UQ₉ quantification of Δ ubiU cells transformed with pBAD-UbiU ($n = 4$), pBAD-UbiU C176A ($n = 2$), or pBAD empty vector ($n = 3$) and grown overnight in anaerobic SMGN plus 0.02% arabinose. Values are means \pm SD. **, $P < 0.01$; ns, not significant; both by unpaired Student's t test.

purified heterodimers composed of WT UbiV_{6His} and mutant UbiU (Fig. S6C). After reconstitution, UbiU C169A C176A-UbiV and UbiU C193A C232A-UbiV had about half the iron as the WT heterodimer (Table 2), and their A_{280}/A_{410} ratios were also diminished about 2-fold (Fig. 6C and Table 2). Altogether, our data clearly demonstrate that each protein of the heterodimeric UbiU-UbiV complex binds one [4Fe-4S] cluster and that the iron-chelating cysteines in UbiU are C169, C176, C193, and C232. Finally, an *in vivo* complementation assay demonstrated that C176 was important for the function of UbiU (Fig. 6D).

Many U32 proteases display motifs of four conserved cysteines. The presence of [Fe-S] clusters in UbiU and UbiV, two U32 protease family members, led us to evaluate the presence of conserved Cys motifs in other U32 proteins. Kimura et al. reported a phylogenetic tree of 3,521 peptidase U32 domains which formed 12 groups, belonging to 10 protein families (43). We extracted and aligned the sequences of the 10 protein families and found highly conserved 4-cysteine clusters (97 to 100% conservation) in eight of them (Fig. 7), suggesting an important functional role for these residues. Only families PepU32#5 and PepU32#6 had no conserved cysteines (PepU32#5) and two mildly (60 to 80%) plus three poorly (40 to 65%) conserved cysteines (PepU32#6) in their sequences. The cysteine motifs for each of the eight families showed a high degree of conservation, and strikingly, most of them could even be aligned with each

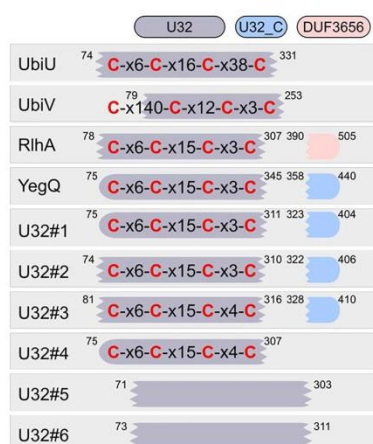


FIG 7 Conserved four-cysteine motifs in the U32 protease family. The conserved 4-cysteine motifs and Pfam domains (colored boxes) found in each U32 protease family are displayed for a set of reference sequences. These motifs were obtained by aligning the sequences listed by Kimura et al. (43). Conserved cysteines are in red, and x6 indicates that 6 residues were found between two conserved cysteines. Positions of the domains are displayed on the outside of the boxes for the reference sequences. Scrambled extremities show interrupted matches for the Pfam domain. No conserved cysteines were found for U32#5 and U32#6 (see the main text). Reference sequences were from *E. coli* for UbiU, UbiV, YegQ, and RlhA (YHBU_ECOLI, YHBV_ECOLI, YEGQ_ECOLI, and YDCP_ECOLI for RlhA). For the rest of the families, the sequence accession numbers were the following: R7JVPV1_9FIRM for U32#1, R6XKQ3_9CLOT for U32#2, S1NZZ5_9ENTE for U32#3, H1YXA1_9EURY for U32#4, H3NJ45_9LACT for U32#5, and D5MIQ1_9BACT for U32#6.

other, with the $CX_6CX_{15}CX_{3/4}C$ patterns appearing recurrently (Fig. 7). Note that UbiV had a slightly distinct motif, with the first cysteine occurring far upstream of the three others and outside of the U32 domain. Overall, our data suggest that most members of the U32 peptidase family contain a [4Fe-4S] cluster coordinated by conserved cysteines, similar to what we demonstrated for UbiU and UbiV.

DISCUSSION

The O_2 -independent UQ biosynthesis pathway is widespread in proteobacteria. The evidence for an O_2 -independent synthesis of UQ by *E. coli* was reported more than forty years ago (20), yet this pathway remained uncharacterized until now. Circumstantial evidence had been obtained that a few species, limited, to our knowledge, to *E. coli* (20), *Rhodobacter sphaeroides* (44), *Paracoccus denitrificans* (45), and *Halorhodospira halophila* (46), were able to synthesize UQ under anaerobic conditions, as demonstrated by biochemical measurements of the quinone content of cells grown anaerobically. Here, we demonstrate that the O_2 -dependent and O_2 -independent UQ biosynthesis pathways differ by only three hydroxylation steps (Fig. 1), and we identify three genes, *ubiT*, *-U*, and *-V*, that are essential for the O_2 -independent biosynthesis of UQ in *E. coli* (Fig. 2). The facts that the *ubiT*, *-U*, and *-V* proteins are widespread in alpha-, beta-, and gammaproteobacterial clades (Fig. 3) and cooccur with UbiA, *-E*, and *-G* enzymes (Table S2B) reveal *ubiT*, *-U*, and *-V* as key elements of the broadly distributed, O_2 -independent UQ pathway. Overall, our data support that many proteobacteria have the previously unrecognized capacity to synthesize UQ independently from O_2 .

Physiological possibilities offered by UQ biosynthesis over the entire O_2 range. In our set of reference genomes, only three species (*P. fulvum*, *M. marinus*, and *O. formigenes*) seem to rely exclusively on the O_2 -independent pathway for UQ production (Table S2B). Indeed, the vast majority of proteobacteria with the O_2 -independent UQ

biosynthesis pathway also possess the O₂-dependent hydroxylases of the aerobic pathway (207 out of 210) (Fig. 3B). This result supports that both pathways confer physiological advantages, allowing production of UQ over the entire spectrum of O₂ levels encountered by facultative aerobes.

So-called microaerobes, able to respire O₂ under microaerobic conditions, are very abundant in nature (5), and *E. coli* is known to respire nanomolar O₂ concentrations (47). To sustain O₂ respiration in the microaerobic range, these organisms are equipped with high-affinity O₂ reductases (5, 47, 48). These enzymes reduce efficiently the low levels of environmental O₂ present at the cell's membrane, leaving the cytoplasm devoid of any O₂ (49). Under such conditions, UQ, which is the main electron donor for the high-affinity O₂ reductases *bdl* and *bdlI* of *E. coli* (9), therefore must be synthesized via the O₂-independent pathway. Overall, we believe that the O₂-independent UQ biosynthesis pathway operates not only under anaerobic conditions but also under microaerobic conditions, in which UQ is likely crucial for bacterial physiology.

The O₂-independent UQ biosynthesis pathway may also confer a significant advantage to facultative bacteria in the case of a rapid transition from an anaerobic to an aerobic environment. Indeed, anaerobic biosynthesis of UQ will result in cellular membranes containing UQ at the time of the transition, allowing an immediate switch to the energetically favorable metabolism of O₂ respiration. Our identification of the anaerobic UQ pathway provides the unique opportunity to selectively disrupt UQ biosynthesis depending on O₂ levels and should foster new research on bacterial physiology in the microaerobic range. Indeed, apart from *E. coli*, which was thoroughly studied over the microaerobic range (4, 49, 50), details on bacterial physiology in microaerobiosis are scarce.

***ubiT*, *-U*, and *-V* mutants and pathogenicity.** In addition to bioenergetics *per se*, anaerobic and microaerobic respirations are thought to be important for pathogenicity (3, 51). Interestingly, homologs of UbiT, -U, and -V have been linked to pathogenicity in several bacterial models. Indeed, the inactivation of *ubiU-ubiV* homologs in *Proteus mirabilis* leads to a decreased infection of the urinary tract of mice (52) and to a diminished virulence of *Yersinia ruckeri* (53), a pathogen that develops in the gut of fish, an environment with a notoriously low O₂ content. Furthermore, inactivation of PA3911 (54) (*ubiT*) and PA3912-PA3913 (55) (*ubiU-ubiV*) in *Pseudomonas aeruginosa* abolished nitrate respiration, the main anaerobic metabolism used by the bacterium in the lungs of cystic fibrosis patients (56, 57). Based on our results showing that the deletion of *ubiT*, *ubiU*, or *ubiV* abrogates the O₂-independent biosynthesis of UQ in *E. coli*, we suggest that the attenuation of the mutants discussed above results from their UQ deficiency under microaerobic/anaerobic conditions.

Proposed roles for UbiT, UbiU, and UbiV. UbiT possesses an SCP2 domain, similar to that of UbiJ, which we recently demonstrated to be an accessory factor that binds the hydrophobic UQ biosynthetic intermediates and structures a multiprotein Ubi complex (16). Since UbiJ functions exclusively in the O₂-dependent pathway whereas UbiT is important only for the O₂-independent pathway, we propose that UbiT fulfills, in anaerobiosis, the same functions as UbiJ in aerobiosis. Whether UbiT is part of a complex and is able to bind UQ biosynthetic intermediates will be addressed in future studies. Interestingly, PA3911, the homolog of UbiT in *P. aeruginosa*, was recently shown to bind phosphatidic acid (54), demonstrating an affinity of UbiT for lipid molecules.

UbiU and UbiV form a tight heterodimer, suggesting that the proteins function together, as further supported by the fact that the *ubiU* and *ubiV* genes cooccur in genomes in 99% of the cases and that they are mostly found next to each other (Fig. 3). We demonstrated that UbiU and UbiV are both required for the O₂-independent C6-hydroxylation of DMQ, and the accumulation of OPP in *ΔubiU* or *ΔubiV* mutants suggests that the two proteins also function in C5-hydroxylation. We want to emphasize our recent demonstration that a single hydroxylase catalyzes all three hydroxylation steps in the O₂-dependent UQ pathway of *Neisseria meningitidis* (19). This result

showed that three different enzymes are not necessarily required and opens the possibility that UbiU-UbiV in fact catalyze all three hydroxylation reactions of the O₂-independent UQ biosynthesis pathway. Establishing the hydroxylase activity and the regioselectivity of UbiU-UbiV will require the development of an *in vitro* assay, a challenging task given that the oxygen donor of the reaction is currently unknown and that the substrates are not commercial and are highly hydrophobic. Of note, one of the O₂-dependent hydroxylases was shown to hydroxylate DMQ₀, a substrate analog with no polyprenyl side chain (58), suggesting that an *in vitro* assay for UbiU-UbiV can be developed with soluble analogs.

[Fe-S] clusters in UbiU-UbiV and other members of the U32 peptidase family.

Until now, members of the peptidase family U32 had not been shown to bind [Fe-S] clusters or to contain any of the ~30 cysteine motifs found in well-characterized iron-sulfur proteins (59). The expression, purification, and spectroscopic characterization of UbiU and of the UbiU-UbiV heterodimeric complex clearly showed that each protein contains one [4Fe-4S] cluster (Fig. 5 and 6). Mutation of the candidate cysteine ligands, arranged in a CX₆CX₁₆CX₃₈C motif in UbiU and in a CX_nCX₁₂CX₃C motif in UbiV, disrupted Fe-S binding and abolished *in vivo* complementation, suggesting a crucial function of the [4Fe-4S] clusters in these proteins. The conservation of a CX₆CX₁₅CX_{3/4}C motif in other U32 proteases supports that these proteins likely bind [Fe-S] clusters. This hypothesis should guide and stimulate investigations of U32 members, very few of which currently have an established molecular function (<http://www.ebi.ac.uk/merops/>) (60). Interestingly, RlhA, a member of the U32 protease family involved in the C-hydroxylation of a cytidine on *E. coli* 23S rRNA, was recently shown to be connected to iron metabolism (43), corroborating our suggestion that RlhA is also an Fe-S protein.

In biological systems, [Fe-S] clusters are mainly known to be involved in electron transfer reactions as well as in substrate binding and activation, in transcription regulation, in iron storage, and as a sulfur donor (41, 61–63). The role of the [Fe-S] clusters in UbiU and UbiV is unknown at this stage. Our current working hypothesis is that they have a role as electron transfer chains between the substrate (the UQ biosynthetic intermediate to be hydroxylated) and an unidentified electron acceptor required for the activation of the substrate. Clearly, the [Fe-S] clusters of UbiU-UbiV are distinct from the molybdenum cofactor present in molybdenum-containing hydroxylases, the only family currently known to catalyze O₂-independent hydroxylation reactions (64). Together, our results identify UbiU and UbiV as prototypes of a novel class of O₂-independent hydroxylases and extend the framework of the chemically fascinating O₂-independent hydroxylation reactions.

MATERIALS AND METHODS

Strain construction. Strains used in this study are listed in Table S3 in the supplemental material. We obtained the collection of *E. coli* strains containing large and medium deletions from the National BioResource Project, National Institute of Genetics, Japan (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/>).

The *ΔubiA::cat*, *ΔubiD::cat*, *ΔubiT::cat*, and *ΔubiV::cat* mutations were constructed in a one-step inactivation of *ubi* genes as described previously (65). A DNA fragment containing the *cat* gene flanked with 5' and 3' regions bordering the *E. coli ubi* genes was amplified by PCR using pKD3 as a template and oligonucleotides 5wanner and 3wanner (Table S3). Strain BW25113, carrying the pKD46 plasmid, was transformed by electroporation with the amplified fragment and Cat^r colonies were selected. The replacement of chromosomal *ubi* by the *cat* gene was verified by PCR amplification in the Cat^r clones. Mutations (including *ubiU::kan* from the Keio strain) were introduced into MG1655 strains by P1 *vir* transduction (66), selecting for the appropriate antibiotic resistance. The antibiotic resistance cassettes were eliminated when needed using plasmid pCP20 as described previously (67).

Plasmid construction. All plasmids generated in this study were verified by DNA sequencing. The *yhbU*, *yhbT*, and *yhbV* inserts (UniProtKB entries P45527, P64599, and P45475) were obtained by PCR amplification using *E. coli* MG1655 as the template and the oligonucleotide pairs *yhbU5-yhbU3*, *yhbT5-yhbT3*, and *yhbV5-yhbV3*, respectively (Table S3). *yhb* inserts were EcoRI-Sall digested and inserted into EcoRI-Sall-digested pBAD24 plasmids, yielding the pBAD-*yhbU*, pK-*yhbT*, or pBAD-*yhbV* plasmid, respectively.

To create a plasmid expressing the *ubiV* (*yhbV*) ORF as a C-terminally His-tagged protein, the *ubiV* gene was amplified using pET-22-UbiV-FW (introducing the NdeI site) and pET-22-UbiV-RV (introducing the XhoI site) as primers and pBAD-*yhbV* as the template. The NdeI- and XhoI-digested amplicon was ligated to NdeI- and XhoI-digested pET-22b(+) plasmid to obtain pET-22-UbiV.

The plasmid pETDUET-UbiUV, containing UbiU in multiple cloning site 1 (MCS1) and UbiV in MCS2, was obtained as follows. *ubiU* was amplified from pBAD-*yhbU* using pETDUET-UbiU-FW (introducing the NcoI site) and pETDUET-UbiU-RV (introducing the EcoRI site) as primers. The NcoI- and EcoRI-digested amplicon was ligated to NcoI- and EcoRI-digested pETDUET-1 plasmid to obtain pETDUET-UbiU. The *ubiV* gene was then cloned from pET-22-UbiV into MCS2 of pETDUET-UbiU by PCR amplification with pET-22-UbiV-FW and pETDUET-UbiV-RV (introducing the C-terminal His₆ tag) as primers. The NdeI- and XhoI-digested amplicon was ligated to NdeI- and XhoI-digested pETDUET-UbiU to obtain pETDUET-UbiUV.

A hexahistidine tag was fused at the N-terminal extremity of UbiV to create pBAD-UbiV_{6His}. The *ubiV*_{6His} gene was obtained by PCR amplification (Phusion high-fidelity DNA polymerase) using pBAD-UbiV as a template and 6HisV5 (introducing the NcoI site) and 6HisV3 (introducing the HindIII site and the DNA sequence of the 6× His tag) as primers. The NcoI/HindIII-digested amplicon was cloned into the NcoI/HindIII-digested pBAD plasmid.

Variants of UbiV and UbiU were constructed using the Q5 site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's specifications. The plasmids (pET-22b-UbiV, pETDUET-UbiUV, pBAD-*yhbU*, and pBAD-*yhbV*) were used as templates in conjunction with the appropriate primers for each respective amino acid substitution.

Culture conditions. *E. coli* strains were grown at 37°C in lysogeny broth (LB) medium or in synthetic medium (SM) containing either 0.4% (wt/vol) glycerol, 0.4% (wt/vol) lactate, or 0.2% (wt/vol) glucose as carbon sources. Autoclaved SM medium was supplemented with 0.5% (wt/vol) Casamino Acids and with a 1/100 volume of a filter-sterilized solution of 1 mM CaCl₂, 200 mM MgCl₂, 1% (wt/vol) thiamine (68). Ampicillin (50 mg/liter), kanamycin (25 mg/liter), and chloramphenicol (25 mg/liter) were added from stocks (1,000× solution sterilized through 0.22-μm filters and stored at -20°C) when needed. When needed, 0.02% arabinose was added to induce the expression of genes carried on pBAD and pK plasmids. External electron acceptors like KNO₃ (100 mM) or dimethyl sulfoxide (DMSO; 50 mM) were added to SM for anaerobic cultures. Anaerobic cultures were performed in Hungate tubes containing 12 ml medium deoxygenated by argon (O₂ < 0.1 ppm) bubbling for 25 min before autoclaving (in the case of LB medium, 0.05% antifoam [Sigma] was added). Hungate tubes were inoculated through the septum with 100 μl of overnight precultures taken with disposable syringes and needles from closed Eppendorf tubes filled to the top. Aerobic cultures were performed in Erlenmeyer flasks filled to 1/10 the maximal volume and shaken at 180 rpm.

For the initial screen, we grew ME strains anaerobically in SMGN (SM medium supplemented with glycerol and nitrate). Strains that presented a severe growth defect or a low UQ₈ content were subsequently grown anaerobically in LB medium.

Cultures were cooled on ice before transferring 5- to 10-ml volumes into 15-ml Falcon tubes for centrifugation at 3,200 × *g* at 4°C for 10 min. Cell pellets were washed in 1 ml ice-cold phosphate-buffered saline and transferred to preweighed 1.5-ml Eppendorf tubes. After centrifugation at 12,000 × *g* at 4°C for 1 min and elimination of supernatant, the cell wet weight was determined (~10 to 20 mg), and pellets were stored at -20°C prior to quinone extraction. We note that these steps were conducted under normal atmosphere and allowed limited O₂-dependent UQ biosynthesis in cells grown anaerobically. Thus, modifications (detailed below) were adopted in additional experiments conducted under strict anaerobic conditions.

Culture under strict anaerobic conditions and cell quenching. LB medium was supplemented with 100 mg/liter L-cysteine (adjusted to pH 6 with NaOH) and 2.5 mg/liter resazurin. The medium was distributed in Hungate tubes and was deoxygenated by argon (O₂ < 0.1 ppm) bubbling for 45 min at 60°C. The resazurin was initially purple and then quickly turned to pink, and it eventually became colorless. The Hungate tubes were sealed and autoclaved. Two sequential precultures were performed in order to dilute the UQ present in the initial aerobic inoculum. The first preculture was performed overnight and used Eppendorf tubes filled to the top and inoculated with cells grown aerobically on LB agar. The second preculture was performed for 8 h in Hungate tubes and was used to inoculate Hungate tubes that were subsequently incubated overnight at 37°C. Disposable syringes (1 ml) and needles were flushed 5 times with argon prior to inoculating 50 μl of preculture through the septum of the Hungate tubes. The resazurin remained colorless at all steps of the culture, indicating that the medium in the Hungate tubes was strictly anaerobic. At the end of the culture, the Hungate tubes were cooled on ice for 45 min, and 2 ml medium was sampled through the septum with argon-flushed syringes (2 ml) fitted with needles. The cells were immediately quenched by transfer to -20°C precooled glass tubes containing 6 ml methanol, 0.5-ml glass beads (0.5-mm diameter), and 20 mM KCl. The tubes were homogenized by vortex for 30 s and kept at -20°C prior to quinone extraction. In parallel, we also centrifuged 2 ml of culture from the Hungate tubes in order to determine the weight of the cells and normalized the UQ content of the quenched cells that was subsequently measured.

For the experiments conducted under strict anaerobic conditions (Fig. 2H and I), we used LB medium instead of SMGN, since nitrite, produced during the anaerobic respiration of nitrate in SMGN medium, is able to oxidize resazurin (69).

Lipid extraction and quinone analysis. Quinone extraction from cell pellets was performed as previously described (17).

The method for quinone extraction from cells quenched in methanol was slightly adapted from reference 9. Briefly, 4 μl of a 10 μM UQ₁₀ solution was added as an internal standard to the cell-methanol mixture. Four ml of petroleum ether (boiling range, 40 to 60°C) was added, the tubes were vortexed for 30 s, and the phases were separated by centrifugation for 1 min at 600 rpm. The upper petroleum ether layer was transferred to a fresh glass tube. Petroleum ether (4 ml) was added to the glass beads and

methanol-containing tube, and the extraction was repeated. The petroleum ether layers were combined and dried under nitrogen.

The dried lipid extracts were resuspended in 100 μ l ethanol, and a volume corresponding to 1 mg of cell wet weight was analyzed by HPLC-electrochemical detection-mass spectrometry (ECD-MS) with a BetaBasic-18 column at a flow rate of 1 ml/min with mobile phases composed of methanol, ethanol, acetonitrile, and a mix of 90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), 0.1% trifluoroacetic acid, mobile phase 1 (50% methanol, 40% ethanol, and 10% mix), and mobile phase 2 (40% acetonitrile, 40% ethanol, and 20% mix). Mobile phase 1 was used in MS detection on an MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe temperature, 400°C; cone voltage, 80 V). Single-ion monitoring (SIM) detected the following compounds: OPP ($M+NH_4^+$), m/z 656.0 to 656.8, 5 to 10 min, scan time of 0.2 s; DMQ₈ ($M+Na^+$), m/z 719 to 720, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; ¹³C₆-DMQ₈ ($M+Na^+$), m/z 725 to 726, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; UQ₈ ($M+NH_4^+$), m/z 744 to 745, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; UQ₈ ($M+Na^+$), m/z 749 to 750, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; ¹³C₆-UQ₈ ($M+Na^+$), m/z 755.0 to 756, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; UQ₁₀ ($M+NH_4^+$), m/z 880.2 to 881.2, 10 to 17 min, scan time of 0.2 s. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time of 0.3 s. UV detection at 247 nm was used to quantify DMK₈ and MK₈. ECD, MS, and UV peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis of the recovery of the UQ₁₀ internal standard and were then normalized to cell wet weight. The peak of UQ₈ obtained with electrochemical detection was quantified with a standard curve of UQ₁₀ (17). The absolute quantification of UQ₈ based on the m/z 744.6 signal at 8 min (Fig. 2H and I) was performed with a standard curve of UQ₈ ranging from 0.5 to 150 pmol UQ₈ (the detection limit was around 0.1 pmol).

Anaerobic ¹³C₆-UQ₈ biosynthesis activity assay. *ΔubiC ΔubiF* cells containing or not containing the additional *ΔubiU* or *ΔubiV* deletion were grown overnight in MS medium supplemented with 0.2% glucose. This preculture was used to inoculate, at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1, 100 ml of fresh medium supplemented with 10 μ M ¹³C₇-4-HB. The culture was grown at 37°C, 180 rpm, until an OD₆₀₀ of 1, at which point 100 μ M 4-HB was added. The cells were pelleted by centrifugation at 3,200 \times *g* at 4°C for 10 min and suspended in 100 ml SMGN medium. A 10-ml aliquot was taken for quinone extraction (Fig. 4B to D, aerobic biosynthesis), and the rest of the culture was placed at 37°C in an anaerobic bottle with a two-port cap fitted with plastic tubing used to inject argon (O₂ < 0.1 ppm) throughout the experiment in order to create and maintain anaerobiosis. After 5 min of bubbling, a 10-ml sample was taken corresponding to 0-min anaerobiosis, and then samples were taken every 30 min and analyzed for quinone content.

Overexpression and purification of proteins. (i) Overexpression and purification of *E. coli* wild-type UbiV and variants. The pET-22b(+) plasmid, encoding wild-type UbiV or variants, was cotransformed with pGro7 plasmid (TaKaRa Bio, Inc.) into *E. coli* BL21(DE3) competent cells. Single colonies obtained from transformation were grown overnight at 37°C in LB medium supplemented with ampicillin (50 μ g/ml) and chloramphenicol (12.5 μ g/ml). Ten ml of preculture was used to inoculate 1 liter of LB medium with the same antibiotics, and the bacteria were cultured further at 37°C with shaking (200 rpm). At an OD₆₀₀ of 1.2, D-arabinose was added to the cultures at a final concentration of 2 mg/ml. At an OD₆₀₀ of 1.8, the culture was cooled in an ice-water bath, and isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 0.1 mM. Cells were then allowed to grow further at 16°C overnight. All subsequent operations were carried out at 4°C. Cells were harvested in an Avanti J-26XP high-performance centrifuge from Beckman Coulter with a JLA-8.1000 rotor at 5,000 \times *g* for 10 min. The cell pellets were resuspended in 5 volumes of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% [vol/vol] glycerol, 1 mM dithiothreitol [DTT]) containing Complete protease inhibitor cocktail (one tablet per 50 ml) (Roche) and disrupted by sonication (amplitude of 40% for 10 min; Branson digital sonifier). Cell debris was removed by ultracentrifugation in an Optima XPN-80 ultracentrifuge from Beckman Coulter with a 50.2 Ti rotor at 35,000 \times *g* for 60 min. The resulting supernatant was loaded onto a HisTrap FF crude column (GE Healthcare) preequilibrated with buffer A. The column was washed with 10 column volumes of buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 15% [vol/vol] glycerol, 1 mM DTT, 10 mM imidazole) to remove nonspecifically bound *E. coli* proteins and then eluted with a linear gradient of 10 column volumes of buffer B containing 500 mM imidazole. Fractions containing WT UbiV or variants were pooled, and phenylmethylsulfonyl fluoride was added at a final concentration of 1 mM. The proteins were then loaded on a HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) preequilibrated in buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl, 15% [vol/vol] glycerol, 1 mM DTT). The purified proteins were concentrated to 30 to 40 mg/ml using Amicon concentrators (30-kDa cutoff; Millipore), aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Overall, a high yield of 150 mg UbiV per liter of culture was obtained.

(ii) Overexpression and purification of UbiU-UbiV complex and variants. The overexpression of wild-type UbiU-UbiV complex or variants in *E. coli* BL21(DE3) competent cells was performed by following the same protocol as that for UbiV. The expression of these proteins was induced by addition of IPTG to a final concentration of 0.05 mM. Wild-type UbiU-UbiV complex or variants were purified with the same procedure as that for UbiV, with the exception that the proteins were loaded on the HiLoad 16/600 Superdex 75 pg with buffer A.

[Fe-S] cluster reconstitution. The [Fe-S] cluster(s) reconstitution of holo-UbiV and holo-UbiU/V was conducted under anaerobic conditions in an MBraun LabStar glove box containing less than 0.5 ppm O₂. Classically, a solution containing 100 μ M as purified UbiV or UbiU/V complex was treated with 5 mM DTT for 15 min at 20°C and then incubated for 1 h with a 5-fold molar excess of both ferrous ammonium sulfate and L-cysteine. The reaction was initiated by the addition of a catalytic amount of the *E. coli* cysteine desulfurase CsdA (1 to 2% molar equivalent) and monitored by UV-visible absorption spectroscopy.

copy. The holo-UbiV or holo-UbiU/V complexes then were loaded onto a Superdex 75 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare) preequilibrated with buffer C or A, respectively, to remove all excess iron and L-cysteine. The fractions containing the holoproteins were pooled and concentrated to 20 to 30 mg/ml on a Vivaspin concentrator (30-kDa cutoff).

Quantification methods. Protein concentrations were determined using the method of Bradford (Bio-Rad) with bovine serum albumin as the standard. The levels of iron and acid-labile sulfide were determined according to the method of Fish (70) and Beinert (71), respectively.

UV-Vis spectroscopy. UV-visible spectra were recorded in a 1-cm-optic-path quartz cuvette under aerobic conditions on a Cary 100 UV-Vis spectrophotometer (Agilent) and under anaerobic conditions in a glove box on a XL-100 Uvikon spectrophotometer equipped with optical fibers.

EPR spectroscopy. EPR spectra of frozen solutions were recorded on a Bruker Continuous Wave X-band ELEXSYS E500 spectrometer operating at 9.39 GHz, equipped with an SHQE cavity cooled by a helium flow cryostat (ESR 900; Oxford Instruments) under nonsaturating conditions and using the following parameters: microwave power in the range of 2 to 10 mW and modulation of the magnetic field at 100 kHz, with a modulation amplitude of 0.6 mT. Holo-UbiV or holo-UbiU-UbiV complex was treated with a 10-fold molar excess of dithionite to reduce the [Fe-S] cluster. Each solution was introduced into EPR quartz tubes in a glove box and frozen with liquid nitrogen before the EPR measurements.

Genome data sets. The protein sequences from 5,750 complete genomes (extended data set) were downloaded from the NCBI RefSeq database (bacteria and archaea; last accessed in November 2016) (Table S2A). A representative set of complete genomes from a monophyletic group of bacteria that potentially harbor the ubiquinone biosynthesis pathway was also created: "reference" and "representative" genomes were downloaded from the NCBI RefSeq database for 204 *Alphaproteobacteria*, 103 *Betaproteobacteria*, and 303 *Gammaproteobacteria* (last accessed in November 2018). In addition to these 610 genomes, the genome of *Phaeosporillum fulvum* (99.5% estimated completeness according to CheckM; http://gtdb.ecogenomic.org/genomes?gid=GCF_900108475.1) was included (Table S2B).

HMM protein profile creation. An initial set of protein sequences (so-called curated set) was retrieved from genomes manually and from a publication (72) to cover the diversity of UQ-producing organisms. The curated set included 48 pairs of YhbU and YhbV from 10 alpha-, 19 beta-, and 19 gammaproteobacteria, 17 sequences for YhbT, and 64, 181, 69, and 189 sequences for UbiA, MenA, UbiG, and UbiE, respectively (Table S4). For each gene family these sequences then were aligned with Mafft (v7.313, linsi) (73), and each alignment was trimmed at its N-terminal and C-terminal extremities based on the filtering results of BMGE (BLOSUM 30) (74). The core of the alignments were kept as is, and hidden Markov model (HMM) profiles were created directly from the trimmed alignments using the Hmmbuild program (Hmmer suite, version 3.1b2) (75).

To ensure a more sensitive search and good delineation between homologs, phylogenetic curation was used, as YhbU and YhbV are known to be part of the larger U32 protease gene family (43). A search using the YhbU and YhbV HMM profiles was performed with Hmmssearch (Hmmer suite) on the extended 5,750-genome data set, and sequences with an *i*-value (independent *e*-value) lower than 10E-20 and a coverage of the profiles higher than 90% were selected. The 4,212 sequences obtained were dereplicated using Uclust from the Usearch program suite (80% identity level) (76). A phylogenetic tree was built by maximum likelihood with the IQ-Tree program (best evolutionary model) based on the alignment (Mafft linsi, BMGE with BLOSUM30) of the 480 selected sequences, including all curated YhbU and YhbV sequences (73, 74, 77). YhbU and YhbV proteobacterial sequences formed two separate monophyletic groups, giving credit to our curated set (100% and 80% UF-Boot support, respectively). The other sequences that formed a large monophyletic group of bacterial sequences were categorized as U32 proteases (98% UF-Boot support; <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7800614.v1>). The 98 sequences from this U32 protease group (Table S4) were used to recreate an HMM profile as described above and served as an outgroup for the profile search.

For YhbT, the first profile obtained from the curated set of sequences was used together with the YhbU, YhbV, and U32 protease profiles for a search in the data set of 611 proteobacterial genomes. A second profile was created from YhbT sequences (YhbT2) (Table S4) that were colocalizing with YhbU and YhbV hits (10E-20 *i*-value and 80% profile coverage). The two YhbT profiles matched complementary sets of sequences and therefore were both used for annotating YhbT in genomes.

A similar approach was taken in order to identify the six known aerobic hydroxylases. Fifty-one Coq7, 73 UbiF, 80 UbiH, 58 UbiL, 24 UbiL, and 32 UbiM sequences were extracted manually and from publications (19, 72) (Table S4, version 1) to serve as a reference, annotated set of sequences. Profiles were created as described above. To ensure their specificity, we ran the HMM profiles against our 5,570-genome data set and selected the sequences that had an *i*-value lower than 10E-20 and a coverage of the profiles higher than 90%. We built two phylogenetic trees as described above, one for Coq7 and another one for UbiFHILM, which are known to be part of the large FMO protein family (19). In the latter case, we dereplicated the 1,619 sequences obtained for the FMO protein family before performing the alignment, alignment filtering, and tree reconstruction steps (using Uclust at the 60% identity level). The Coq7 tree obtained showed our reference Coq7 sequences covered the whole diversity of retrieved sequences, suggesting that they all could be bona fide Coq7 (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7800680>). The FMO tree showed a monophyletic group containing all reference FMO ubiquinone hydroxylases, forming subgroups for the different homologs (UbiFHILM) in proteobacteria (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7800620>). Further, a large set of sequences formed an outgroup consisting of sequences from various clades of bacteria, many being found outside of proteobacteria, robustly separated from the ubiquinone hydroxylases. We split this large clade into four subtrees and

extracted the corresponding sequences to obtain four new HMM profiles (as described above) to be used for precise discrimination between ubiquinone hydroxylases and other members of the FMO family (AlloFMO_1 to AlloFMO_4 in Table S4, version 2). FMO ubiquinone hydroxylase subtrees were also used to redesign improved HMM profiles for UbiFHILM (36, 168, 198, 139, and 65 sequences; see Table S4, version 2).

Evaluation of genomic distributions with HMMER and MacSyFinder. Two MacSyFinder models were created to (i) search sequences of interest in genomes using Hmmer and (ii) investigate their genetic architecture (78). A first model was created to focus only on YhbTUV-related genes. In this model, the YhbTUV components were defined as mandatory and U32 protease as accessory. A second, more comprehensive model, Ubi+YhbTUV, was designed to list the families corresponding to the 9 profiles obtained (UbiA, MenA, UbiE, UbiG, 2 YhbT, YhbU, YhbV, and U32 proteases). For both models, the two YhbT profiles were set as exchangeable. The parameter *inter_gene_max_space* was set to 5 in the YhbTUV model and 10 in the Ubi+YhbTUV model. MacSyFinder was set to run HMMER with the options *-i-evalue-select* 10E-20 and *-coverage-profile* 0.8. Independently of their genetic context, sequences corresponding to selected HMMER hits were listed for all profiles in all genomes analyzed in order to establish the genomic distribution for each of the protein families of interest. When several profiles matched a sequence, only the best hit (best *i-evalue*) was considered.

U32 protease sequence analysis. We retrieved from the UniProt-KB database 3,460 protein sequences of U32 proteases that were categorized in 12 families by Kimura et al. (43) and created a FASTA file for each of these families. Fifty sequences from different families could not be retrieved, as they had been deleted from the UniProt-KB database (46 were obsolete) or were not found based on the published accession numbers. As the RlhA1 and RlhA2 families mostly corresponded to two domains from the same protein sequences that had been split, we put whole sequences together into a single FASTA file for sequence analysis of the overall RlhA family. For each of the 10 families, sequences were dereplicated at the 80% identity level with Uclust in order to limit any potential taxonomic sampling bias, and sequences were aligned (Mafft, linsi). The alignments were visualized in Jalview (79) and used to create the logo sequences. Images of alignments were created using the ESPript webserver (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) (80).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.01319-19>.

FIG S1, JPG file, 0.1 MB.

FIG S2, JPG file, 0.8 MB.

FIG S3, JPG file, 0.6 MB.

FIG S4, JPG file, 0.5 MB.

FIG S5, TIF file, 2.3 MB.

FIG S6, TIF file, 0.2 MB.

TABLE S1, XLSX file, 0.02 MB.

TABLE S2, XLSX file, 0.5 MB.

TABLE S3, XLSX file, 0.02 MB.

TABLE S4, XLSX file, 0.05 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), ANR Blanc (An)aeroUbi ANR-15-CE11-0001-02, to F.P. We thank Amélie Amblard for technical assistance, Louis Givelet for preliminary bioinformatic analyses, Barbara Schoepp-Cothenet for providing accession numbers to sequences of UbiA, -G, -E and for critical reading of the manuscript, and the GEM team at TIMC for discussions and suggestions. C.-D.-T.V., M.L., and M.F. acknowledge support from the French National Research Agency (Labex program DYNAMO, ANR-11-LABX-0011). C.C. was funded by the Grenoble Alpes Data Institute, supported by the French National Research Agency under the "Investissements d'Avenir" program (ANR-15-IDEX-02). We thank the National Bioresource Project, National Institute of Genetics, for providing ME strains from the medium- and large-deletion *E. coli* collection. We have no competing interests to declare.

REFERENCES

- Schoepp-Cothenet B, van Lis R, Atteia A, Baymann F, Capowiez L, Ducluzeau A-L, Duval S, ten Brink F, Russell MJ, Nitschke W. 2013. On the universal core of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1827:79–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.005>.
- Marteyn B, Scorza FB, Sansonetti PJ, Tang C. 2011. Breathing life into pathogens: the influence of oxygen on bacterial virulence and host responses in the gastrointestinal tract. *Cell Microbiol* 13:171–176. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01549.x>.

3. Wallace N, Zani A, Abrams E, Sun Y. 2016. The impact of oxygen on bacterial enteric pathogens, p 179–204. In Sariastani S, Gadd GM (ed), *Advances in applied microbiology*, vol 95. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, CA.
4. Bettenbrock K, Bai H, Ederer M, Green J, Hellingwerf KJ, Holcombe M, Kunz S, Rolfe MD, Sanguinetti G, Sawodny O, Sharma P, Steinsiek S, Poole RK. 2014. Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. *Adv Microb Syst Biol* 64:65–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800143-1.00002-6>.
5. Morris RL, Schmidt TM. 2013. Shallow breathing: bacterial life at low O₂. *Nat Rev Microbiol* 11:205–212. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2970>.
6. Marreiros BC, Calisto F, Castro PJ, Duarte AM, Sena FV, Silva AF, Sousa FM, Teixeira M, Rejojo PN, Pereira MM. 2016. Exploring membrane respiratory chains. *Biochim Biophys Acta Bioenerget* 1857:1039–1067. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.028>.
7. Lecomte SM, Achouak W, Abrouk D, Heulin T, Nesme X, Haichar FE. 2018. Diversifying anaerobic respiration strategies to compete in the rhizosphere. *Front Environ Sci* 6:16. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00139>.
8. Nowicka B, Kruk J. 2010. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta* 1797:1587–1605. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.007>.
9. Sharma P, Teixeira de Mattos MJ, Hellingwerf KJ, Bekker M. 2012. On the function of the various quinone species in *Escherichia coli*. *FEBS J* 279:3364–3373. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08608.x>.
10. Shestopalov AJ, Bogachev AV, Murtazina RA, Viryasov MB, Skulachev VP. 1997. Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*—evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett* 404:272–274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00143-9).
11. Nitzsche A, Bettenbrock K. 2018. All three quinone species play distinct roles in ensuring optimal growth under aerobic and fermentative conditions in *E. coli* K12. *PLoS One* 13:e0194699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194699>.
12. Aussel L, Pierrel F, Loiseau L, Lombard M, Fontecave M, Barras F. 2014. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1837:1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.015>.
13. Reidenbach AG, Kemmerer ZA, Aydin D, Jochem A, McDevitt MT, Hutchins PD, Stark JL, Stefely JA, Reddy T, Hebert AS, Wilkerson EM, Johnson IE, Bingman CA, Markley JL, Coon JJ, Dal Peraro M, Pagliarini DJ. 2018. Conserved lipid and small-molecule modulation of COQ8 reveals regulation of the ancient kinase-like UbiB family. *Cell Chem Biol* 25:154–165. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.11.001>.
14. Loiseau L, Fyfe C, Aussel L, Hajj Chehade M, Hernández SB, Favier B, Hamdane D, Mellot-Draznieks C, Rascalou B, Pelosi L, Velours C, Cornu D, Lombard M, Casadesús J, Pierrel F, Fontecave M, Barras F. 2017. The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *J Biol Chem* 292:11937–11950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789164>.
15. Aussel L, Loiseau L, Hajj Chehade M, Pocachard B, Fontecave M, Pierrel F, Barras F. 2014. ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 196:70–79. <https://doi.org/10.1128/JB.01065-13>.
16. Hajj Chehade M, Pelosi L, Fyfe CD, Loiseau L, Rascalou B, Brugière S, Kazemzadeh K, Vo C-D-T, Ciccone L, Aussel L, Couté Y, Fontecave M, Barras F, Lombard M, Pierrel F. 2019. A soluble metabolite synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone. *Cell Chem Biol* 26:482–492. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>.
17. Hajj Chehade M, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M, Golinelli-Pimpaneau B, Mellot-Draznieks C, Hamelin O, Aussel L, Kieffer-Jaquinod S, Labessan N, Barras F, Fontecave M, Pierrel F. 2013. ubiL, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. *J Biol Chem* 288:20085–20092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480368>.
18. Alexander K, Young IG. 1978. Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17:4745–4750. <https://doi.org/10.1021/bi00615a023>.
19. Pelosi L, Ducluzeau AL, Loiseau L, Barras F, Schneider D, Junier I, Pierrel F. 2016. Evolution of ubiquinone biosynthesis: multiple proteobacterial enzymes with various regioselectivities to catalyze three contiguous aromatic hydroxylation reactions. *mSystems* 1:e00091-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00091-16>.
20. Alexander K, Young IG. 1978. Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17:4750–4755. <https://doi.org/10.1021/bi00615a024>.
21. Cox GB, Gibson F. 1964. Biosynthesis of vitamin K and ubiquinone. Relation to the Shikimic acid pathway in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 93:204–206. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90285-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90285-5).
22. Siebert M, Severin K, Heide L. 1994. Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the ubiC gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase. *Microbiology* 140:897–904. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-4-897>.
23. Payet LA, Leroux M, Willison JC, Kihara A, Pelosi L, Pierrel F. 2016. Mechanistic details of early steps in coenzyme Q biosynthesis pathway in yeast. *Cell Chem Biol* 23:1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.08.008>.
24. Kwon O, Kotsakis A, Meganathan R. 2000. Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the ubiF gene. *FEMS Microbiol Lett* 186:157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09097.x>.
25. Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, Tanaka K, Fujimitsu K, Keyamura K, Ote T, Yamakawa T, Yamazaki Y, Mori H, Katayama T, Kato J-I. 2004. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol* 55:137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04386.x>.
26. Mizoguchi H, Sawano Y, Kato J, Mori H. 2008. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Res* 15:277–284. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn019>.
27. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
28. Esposti MD. 2017. A journey across genomes uncovers the origin of ubiquinone in cyanobacteria. *Genome Biol Evol* 9:3039–3053. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx225>.
29. Hiraishi A, Hoshino Y, Kitamura H. 1984. Isoprenoid quinone composition in the classification of rhodospirillaceae. *J Gen Appl Microbiol* 30:197–210. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.197>.
30. Imhoff JF, Petri R, Suling J. 1998. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the alpha-Proteobacteria: description of the new genera *Rhodospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodothalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomense* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigenis* to *Rhodothalassium salexigenis* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48:793–798. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-793>.
31. Bazylinski DA, Williams TJ, Lefevre CT, Berg RJ, Zhang CL, Bowser SS, Dean AJ, Beveridge TJ. 2013. *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov., Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038927-0>.
32. Stewart CS, Duncan SH, Cave DR. 2004. *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. *FEMS Microbiol Lett* 230:1–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00864-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00864-4).
33. Burgardt NI, Gianotti AR, Ferreyra RG, Ermacora MR. 2017. A structural appraisal of sterol carrier protein 2. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1865:565–577. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.002>.
34. Yano T, Yagi T, Sled VD, Ohnishi T. 1995. Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 270:18264–18270. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18264>.
35. Ollagnier S, Mulliez E, Gaillard J, Eliasson R, Fontecave M, Reichard P. 1996. The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J Biol Chem* 271:9410–9416. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9410>.
36. Ollagnier de Choudens S, Barras F. 2017. Genetic, biochemical, and

- biophysical methods for studying FeS proteins and their assembly. *Methods Enzymol* 595:1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.07.015>.
37. M NM, Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y, Abdel-Ghany SE, Rousset C, Ye H, Fontecave M, Pilon-Smits EA, Pilon M. 2007. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis. *J Biol Chem* 282:18254–18264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200>.
 38. Ollagnier-De Choudens S, Sanakis Y, Hewitson KS, Roach P, Baldwin JE, Münck E, Fontecave M. 2000. Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase. *Biochemistry* 39:4165–4173. <https://doi.org/10.1021/bi992090u>.
 39. Ollagnier-de Choudens S, Loiseau L, Sanakis Y, Barras F, Fontecave M. 2005. Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Lett* 579:3737–3743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.065>.
 40. Hewitson KS, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Shaw NM, Baldwin JE, Münck E, Roach PL, Fontecave M. 2002. The iron-sulfur center of biotin synthase: site-directed mutants. *J Biol Inorg Chem* 7:83–93. <https://doi.org/10.1007/s007750100268>.
 41. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74:247–281. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518>.
 42. Fontecave M, Py B, Ollagnier de Choudens S, Barras F. 2008. From iron and cysteine to iron-sulfur clusters: the biogenesis protein machineries. *EcoSal Plus* 2008. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.14>.
 43. Kimura S, Sakai Y, Ishiguro K, Suzuki T. 2017. Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic Acids Res* 45:12974–12986. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx969>.
 44. Yen HW, Chiu CH. 2007. The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on CoQ(10) production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter. *Enzyme Microb Technol* 41:600–604. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.005>.
 45. Matsumura M, Kobayashi T, Aiba S. 1983. Anaerobic production of ubiquinone-10 by *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17:85–89. <https://doi.org/10.1007/BF00499856>.
 46. Schoepp-Cothenet B, Lieutaud C, Baymann F, Verméglio A, Friedrich T, Kramer DM, Nitschke W. 2009. Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8549–8554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813173106>.
 47. Stolper DA, Revsbech NP, Canfield DE. 2010. Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18755–18760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013435107>.
 48. D'Mello R, Hill S, Poole RK. 1996. The cytochrome bd quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition. *Microbiology* 142:755–763. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-755>.
 49. Rolfe MD, Ocone A, Stapleton MR, Hall S, Trotter EW, Poole RK, Sanguinetti G, Green J. 2012. Systems analysis of transcription factor activities in environments with stable and dynamic oxygen concentrations. *Open Biol* 2:120091. <https://doi.org/10.1098/rsob.120091>.
 50. Rolfe MD, Beek AT, Graham AI, Trotter EW, Asif HMS, Sanguinetti G, de Mattos JT, Poole RK, Green J. 2011. Transcript profiling and inference of *Escherichia coli* K-12 ArcA activity across the range of physiologically relevant oxygen concentrations. *J Biol Chem* 286:10147–10154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211144>.
 51. Lee KM, Park Y, Bari W, Yoon MY, Go J, Kim SC, Lee HI, Yoon SS. 2012. Activation of cholera toxin production by anaerobic respiration of trimethylamine N-oxide in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 287:11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394932>.
 52. Zhao H, Li X, Johnson DE, Mobley H. 1999. Identification of protease and rpoN-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Microbiology* 145:185–195. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-1-185>.
 53. Navais R, Mendez J, Perez-Pascual D, Cascales D, Guisjarro JA. 2014. The yrpAB operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions. *Virulence* 5:619–624. <https://doi.org/10.4161/viru.29363>.
 54. Groenewold MK, Massmig M, Hebecker S, Danne L, Magnowska Z, Nimitz M, Narberhaus F, Jahn D, Heinz DW, Jänsch L, Moser J. 2018. A phosphatidic acid binding protein is important for lipid homeostasis and adaptation to anaerobic biofilm conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 475:1885–1907. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180257>.
 55. Filiatrault MJ, Picardo KF, Ngai H, Passador L, Iglewski BH. 2006. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infect Immun* 74:4237–4245. <https://doi.org/10.1128/IAI.02014-05>.
 56. Schober M, Jahn D. 2010. Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300:549–556. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.007>.
 57. Line L, Alhede M, Kolpen M, Kuhl M, Ciofu O, Bjarnsholt T, Moser C, Toyofuku M, Nomura N, Høiby N, Jensen PØ. 2014. Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum. *Front Microbiol* 5:554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00554>.
 58. Behan RK, Lippard SJ. 2010. The aging-associated enzyme CLK-1 is a member of the carboxylate-bridged diiron family of proteins. *Biochemistry* 49:9679–9681. <https://doi.org/10.1021/bi101475z>.
 59. Estellon J, Ollagnier de Choudens S, Smadja M, Fontecave M, Vandembrouck Y. 2014. An integrative computational model for large-scale identification of metalloproteins in microbial genomes: a focus on iron-sulfur cluster proteins. *Metallomics* 6:1913–1930. <https://doi.org/10.1039/C4MT00156G>.
 60. Rawlings ND, Alan J, Thomas PD, Huang XD, Bateman A, Finn RD. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46:D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.
 61. Rouault TA. 2015. Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:45–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3909>.
 62. Lill R. 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460:831–838. <https://doi.org/10.1038/nature08301>.
 63. Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F. 2013. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim Biophys Acta* 1827:455–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.010>.
 64. Hille R. 2005. Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* 433:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.012>.
 65. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
 66. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 67. Cherepanov PP, Wackernagel W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-A).
 68. Alberge F, Espinosa L, Seduk F, Sylvi L, Toci R, Walburger A, Magalon A. 2015. Dynamic subcellular localization of a respiratory complex controls bacterial respiration. *Elife* 4:e05357. <https://doi.org/10.7554/eLife.05357>.
 69. Jenneman GE, Montgomery AD, McInerney MJ. 1986. Method for detection of microorganisms that produce gaseous nitrogen oxides. *Appl Environ Microbiol* 51:776–780.
 70. Fish WW. 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158:357–364. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)58067-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)58067-9).
 71. Beinert H. 1978. Micro methods for the quantitative determination of iron and copper in biological material. *Methods Enzymol* 54:435–445. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)54027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)54027-5).
 72. Ravcheev DA, Thiele I. 2016. Genomic analysis of the human gut microbiome suggests novel enzymes involved in quinone biosynthesis. *Front Microbiol* 7:128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00128>.
 73. Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
 74. Criscuolo A, Gribaldo S. 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* 10:210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>.
 75. Eddy SR. 2011. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* 7:e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
 76. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
 77. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood

- phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
78. Abby SS, Neron B, Menager H, Touchon M, Rocha EP. 2014. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS One* 9:e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>.
79. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
80. Robert X, Gouet P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42:W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>.
81. Garcia PS, Jauffrit F, Grangeasse C, Brochier-Armanet C. 2019. GeneSpy, a user-friendly and flexible genomic context visualizer. *Bioinformatics* (Oxford, England) 35:329–331. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty459>.

Chapitre V
Caractérisation biochimique
d’UbiT, d’UbiU et d’UbiV de
Pseudomonas aeruginosa

I. Introduction

La bactérie gram-négative *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène humain opportuniste qui est capable de se développer dans diverses conditions environnementales telles que le sol et l'eau, ainsi que dans des environnements associés à l'hôte, aux humains et aux plantes (Stover, Pham et al. 2000). Cette espèce est responsable de nombreuses infections aiguës et chroniques et pose un problème dramatique aux patients souffrant de brûlures graves, de fibrose kystique (mucoviscidose) et d'états immunodéprimés (Magill, Edwards et al. 2014, Crull, Somayaji et al. 2018). Ces infections sont difficiles à éradiquer en raison de la résistance intrinsèque développée de *P. aeruginosa* aux antibiotiques et de sa capacité à développer une résistance au cours du traitement (Kang, Kim et al. 2003). Une fois infectés des hôtes, *P. aeruginosa* peut s'y croître en mode de vie de biofilms, ce qui protège davantage les cellules bactériennes du traitement antimicrobien (Hoyle and Costerton 1991). Dans les biofilms, la concentration en oxygène est considérablement réduite, voire nulle (Worlitzsch, Tarran et al. 2002). En raison de la diminution de l'oxygène, le métabolisme cellulaire repose principalement sur la respiration anaérobie utilisant NO_3^- ou NO_2^- comme accepteur alternatif d'électrons (Zumft 1997). Ce processus, appelé dénitrification, permet de réduire les nitrates et les nitrites solubles en protoxyde d'azote (N_2O) ou en azote moléculaire (N_2). Bien que la respiration aérobie et l'implication de l'ubiquinone chez *P. aeruginosa* soient mises en évidence depuis les années soixantes (Page, Gale et al. 1960, Matsushita, Yamada et al. 1980), le pool de quinones anaérobies de *P. aeruginosa* reste encore assez peu étudié.

Étant donné qu'*E. coli* est génétiquement programmé pour une croissance dans les conditions anaérobies via la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène, nous pensons qu'il existe également une telle voie chez *P. aeruginosa*, vu que l'ubiquinone est aussi importante pour la croissance de *P. aeruginosa* (Matsushita, Yamada et al. 1980). Fait très intéressant, dans le génome de *P. aeruginosa*, sont présents 3 gènes : PA3911, PA3912 et PA3913, homologues des gènes UbiT, UbiU et UbiV d'*E. coli*, nommés dans cette partie de la thèse UbiT_{PA}, UbiU_{PA}, UbiV_{PA}, qui pourraient être impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone (Q₉) en absence d'oxygène chez *P. aeruginosa*. Les trois protéines UbiU, UbiV et UbiT d'*E. coli* sont appelées dans ce chapitre UbiU_{EC}, UbiV_{EC} et UbiT_{EC}.

La première partie de ce chapitre concerne la découverte et la caractérisation génétique *in vivo* de trois gènes PA3911 (*ubiT_{PA}*), PA3912 (*ubiV_{PA}*) et PA3913 (*ubiU_{PA}*), effectués toujours par nos collaborateurs, tandis que la deuxième partie du chapitre concerne la

caractérisation biochimique de ces trois protéines UbiT_{PA}, UbiU_{PA}, UbiV_{PA}. Les résultats de ce chapitre vont être soumis à publication dans les prochains mois.

II. Résultats

II.1 Découverte et caractérisation génétique des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*

Les résultats principaux de la première partie sont présentés ci-dessous :

II.1.1 *P. aeruginosa* PAO1 possède uniquement une quinone prédominante correspondant à l'ubiquinone (UQ₉)

La teneur en quinone de *P. aeruginosa* PAO1 a été déterminée par HPLC-ECD des extraits lipidiques des cellules cultivées en aérobie ou en anaérobie (dénitrification). Quelles que soient les conditions de croissance, une seule espèce de quinone étudiée est présente dans les analyses des extraits lipidiques de *P. aeruginosa* (Fig. 65A et 65B). L'analyse par spectrométrie de masse a indiqué que ce produit est l'UQ₉ (Fig. 65C).

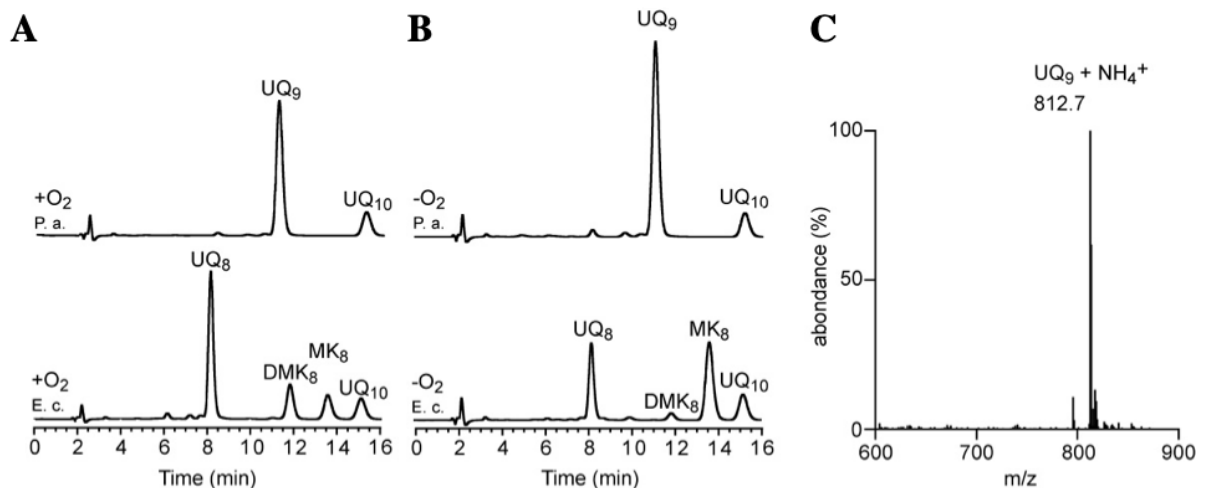


Figure 65. UQ₉ est la quinone unique produite par *P. aeruginosa* dans les conditions aérobie et anaérobie. Les analyses par HPLC-ECD des extraits lipidiques des cellules d'*E. coli* MG1655 (E. c.) et de *P. aeruginosa* PAO1 (P. a.) cultivées en aérobie (A) ou en anaérobie (B). Les pics correspondant à l'UQ₈, l'UQ₉, la déméthylmenaquinone (DMK₈), la ménaquinone (MK₈) et le standard UQ₁₀ sont indiqués. (C) Le spectre de masse de la quinone étudiée dans (A) et (B).

Comme nous avons vu, les membranes d'*E. coli* contiennent de l'UQ₈ et des naphtoquinones (DMK₈ et MK₈). L'absence des naphtoquinones dans les extraits lipidiques de *P. aeruginosa* (Fig. 65A et 65B) est en cohérence avec l'absence de voies de biosynthèse (voies de MK ou de fualosine) dans les génomes de *P. aeruginosa* (Redfearn 1966). Il est intéressant de noter que la teneur en ubiquinone d'*E. coli* est plus importante en aérobie qu'en anaérobie (97 ± 4 versus 42 ± 6 pmol d'UQ₈ par mg de poids humide), alors que c'est le contraire chez *P. aeruginosa* (95 ± 4 versus 126 ± 4 pmol d'UQ₉ par mg de poids humide).

Ensemble, nos résultats démontrent que l'UQ₉ est la quinone prédominante de *P. aeruginosa* PAO1 et suggèrent que l'UQ₉ est employé dans les conditions de dénitrification.

II.1.2 Identification des gènes *ubi* dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1

Pour identifier les protéines Ubi de *P. aeruginosa*, les gènes correspondant aux protéines IspB, UbiX et UbiA à UbiK d'*E. coli* MG1655 ont d'abord été criblés pour rechercher des homologues dans la base de données des protéines chez *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>) en utilisant le logiciel BLASTP. La plupart des gènes *ubi* présents chez *E. coli* ont leurs homologues chez *P. aeruginosa*. Globalement, nous proposons donc que la biosynthèse de l'ubiquinone dépendante de l'oxygène chez *P. aeruginosa* et chez *E. coli* partagent la même voie (Fig. 66A).

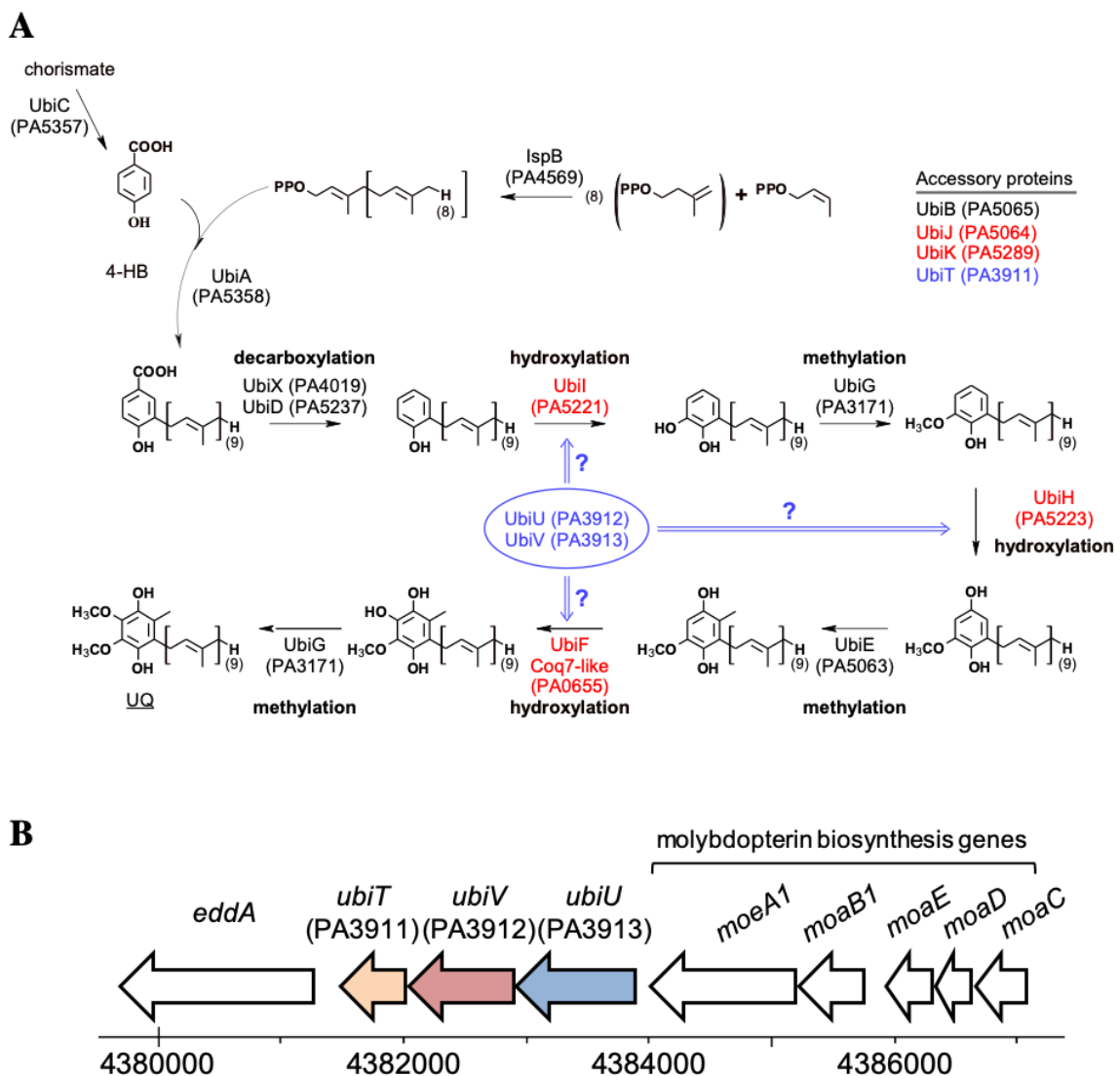


Figure 66. (A) Les voies de biosynthèse putatives de l'ubiquinone chez *E. coli* MG1655 et chez *P. aeruginosa* PAO1. Les protéines communes aux deux voies de biosynthèse (aérobie et anaérobie) sont indiquées en noir. Les protéines impliquées uniquement en aérobie ou en anaérobie sont indiquées en rouge ou en bleu, respectivement. Les gènes correspondants chez *P. aeruginosa* sont indiqués entre parenthèses. (B) Localisation génomique des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* chez *P. aeruginosa* PAO1. Les ORF des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* sont représentés par les flèches verte, bleue et orange, respectivement.

Comme nous avons vu dans le chapitre IV, *E. coli* est capable de synthétiser l'ubiquinone en anaérobiose et les trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* sont importants pour cette voie indépendante de l'oxygène. Des homologues d'*ubiT*, *ubiU* et *ubiV* ont également été identifiés dans *P. aeruginosa* PAO1 et correspondent aux ORF PA3911, PA3913 et PA3912, respectivement (Fig. 66A). Ces gènes sont appelés par la suite *ubiT_{PA}*, *ubiU_{PA}* et *ubiV_{PA}*. Fait notable, les trois gènes sont regroupés et situés en aval des gènes *moaA1*, *moaB1*, *moaE*, *moaD* et *moaC* qui sont impliqués dans la biosynthèse du cofacteur à molybdoptérine (MoCo) (Fig. 66B). Ce dernier est important pour l'activité enzymatique de plusieurs enzymes, dont la nitrate réductase qui est impliqué dans la dénitrification en anaérobiose (Coelho and Romao 2015).

II.1.3 Les mutants transposables des gènes *ubiV_{PA}* et *ubiU_{PA}* présentent un défaut de croissance en dénitrification en accord avec une altération du contenu en UQ₉

Le rôle physiologique des protéines UbiT_{PA}, UbiU_{PA} et UbiV_{PA} a tout d'abord été étudié à l'aide des mutants transposables (Tn) PW7609 (*ubiT_{PA}*), PW7610 (*ubiV_{PA}*), PW7611 (*ubiV_{PA}*), PW7612 (*ubiU_{PA}*) et PW7613 (*ubiU_{PA}*). Ces souches ont une croissance similaire à la souche sauvage MPAO1 (Fig. 67A) et le niveau de l'UQ₉ synthétisé par ces mutants est comparable à celui des cellules sauvages (Fig. 67B). Ainsi, UbiT_{PA}, UbiU_{PA} et UbiV_{PA} ne sont pas impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone dépendante de l'oxygène chez *P. aeruginosa*. Au contraire, les mutants *ubiV_{PA}* et *ubiU_{PA}* ne sont pas capables de croître en conditions de dénitrification (Fig. 67C) et leur teneur en UQ₉ est fortement diminué (Fig. 67B). Ces résultats suggèrent que les gènes *ubiV_{PA}* et *ubiU_{PA}* sont nécessaires pour la dénitrification chez *P. aeruginosa*, supposément via leur implication dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. De manière surprenante, la croissance du mutant Tn PW7609 (*ubiT_{PA}*) n'est pas affectée (Fig. 67C) et il est encore capable de synthétiser 60% d'UQ₉ par rapport aux cellules sauvages (Fig. 67B). Dans ce mutant, le transposon est inséré à la cinquième base du gène *ubiT_{PA}*, ce qui peut-être n'est pas suffisant pour inactiver complètement l'expression du gène. Nous avons remarqué dans les études précédentes que 20% d'ubiquinone étaient suffisants pour maintenir la croissance des mutants *ubi* d'*E. coli* à un niveau similaire que celle des cellules sauvages (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013, Loiseau, Fyfe et al. 2017).

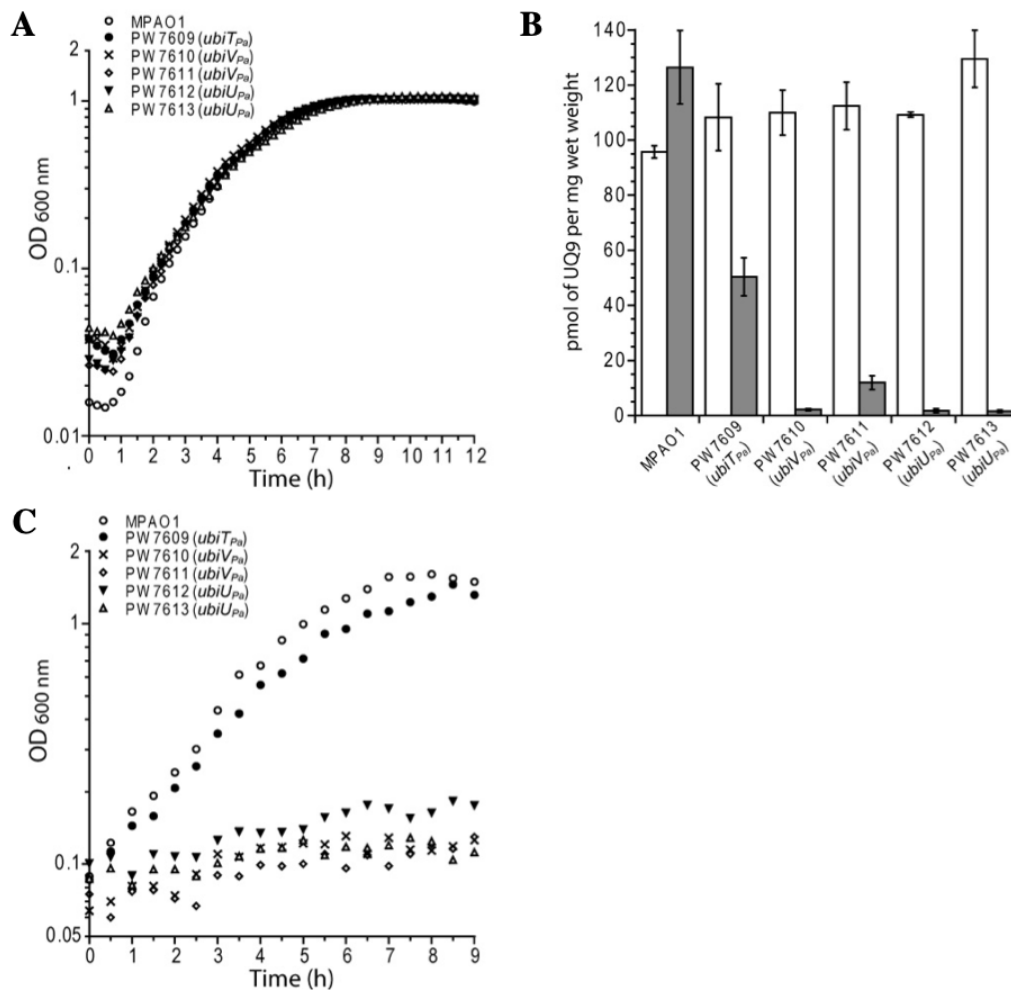


Figure 67. La croissance et la teneur en UQ₉ sont affectées dans les mutants Tn d'*ubiU_{PA}*, d'*ubiV_{PA}* et d'*ubiT_{PA}* dans les conditions de dénitrification. Courbes de croissance représentatives de la souche sauvage (MPAO1) et les mutants Tn cultivés en aérobie (A) ou en anaérobie (C). (B) Quantification de la teneur en UQ₉ des extraits lipidiques des cellules sauvages MPAO1 et des mutants Tn cultivés en aérobie (barres blanches) ou en anaérobie (barres grises).

II.1.4 La dénitrification dépend des gènes *ubiT_{PA}*, *ubiV_{PA}* et *ubiU_{PA}* via leur implication dans la biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène

Comme les gènes *ubiT_{PA}*, *ubiU_{PA}* et *ubiV_{PA}* sont localisés l'un à côté de l'autre dans le génome de PAO1 (Fig. 66B), le transposon inséré dans les mutants étudiés précédemment pourrait avoir un impact sur l'expression des gènes voisins. De plus, le mutant de Tn PW7609 n'inactive pas correctement le gène *ubiT_{PA}*. Nous avons donc supprimé ces trois gènes (des mutants KO) et testé leur complémentation par des plasmides codant pour les protéines correspondantes. La délétion des trois gènes résulte en un défaut de croissance et une forte diminution du contenu en UQ₉ par rapport aux cellules sauvages dans les conditions de dénitrification (Fig. 68A et 68B), alors que ces souches mutantes ont une croissance normale et produisent l'UQ₉ à un niveau normal quand elles sont cultivées en aérobie (Fig. 68B et 68C). Nos collaborateurs ont ensuite transformé les souches mutantes avec un vecteur vide

(pSW196) ou le même vecteur portant des gènes correspondants. Dans les souches complémentées par les plasmides, la croissance bactérienne et le taux d'UQ₉ synthétisé sont restaurés aux niveaux de la souche sauvage PAO1 (Fig. 68D). Pour confirmer que l'UQ₉ est directement impliqué dans la restauration de la croissance anaérobie des souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$, $\Delta ubiV$, une solution de UQ₄ dans du méthanol est ajoutée au milieu de dénitrification à des concentrations finales de 5 et 50 μM . Après 24h d'incubation en anaérobiose, les unités de formation de colonies par mL (UFC / mL, en anglais, Colony Forming Unit) de chaque souche KO sont estimées et comparées à la même souche cultivée sans UQ₄. Les résultats les plus significatifs sont obtenus avec 50 μM d'UQ₄, où l'on observe une augmentation de 8-15 fois des UFC dans les souches KO (Fig. 68E). Nous avons noté une toxicité importante du méthanol dans la souche sauvage, ce qui suggère que les résultats obtenus avec les souches KO après addition de l'UQ₄ sont probablement sous-estimés. Tous ces résultats montrent que les gènes *ubiT*_{PA}, *ubiU*_{PA} et *ubiV*_{PA} sont nécessaires à la dénitrification *via* leur implication dans la biosynthèse de l'UQ₉.

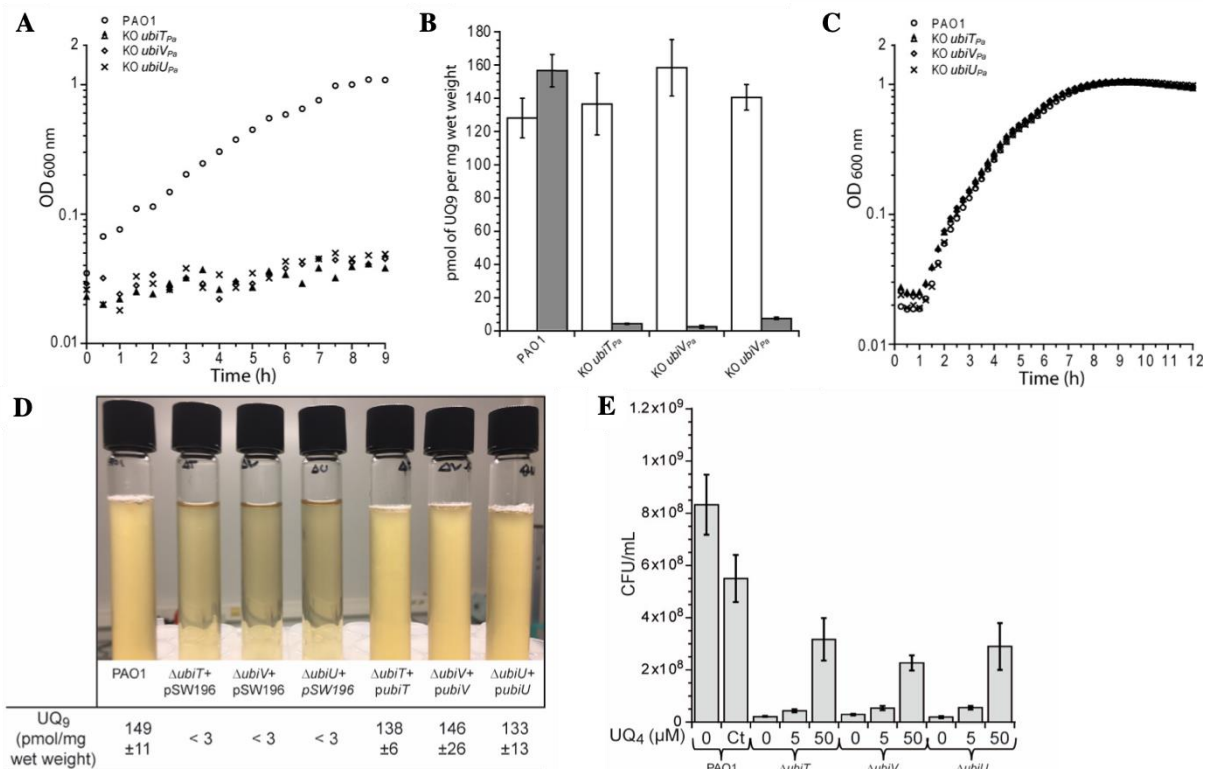


Figure 68. Les gènes *ubiU*_{PA}, *ubiV*_{PA} et *ubiT*_{PA} sont essentiels à la biosynthèse de l'UQ₉ en anaérobiose et à la dénitrification. Courbes de croissance représentatives de la souche sauvage PAO1 et des mutants KO $\Delta ubiU$ _{PA}, $\Delta ubiV$ _{PA} et $\Delta ubiT$ _{PA} cultivées dans un milieu de dénitrification (A) ou en aérobie (C). (B) Quantification de l'UQ₉ dans des extraits lipidiques des cellules sauvages PAO1 et des mutants KO cultivés en aérobie (barres blanches) ou dans des milieux de dénitrification (barres grises). (D) Photographies de tubes de culture après une nuit de croissance en anaérobiose dans un milieu de dénitrification de la souche sauvage PAO1 et des souches $\Delta ubiU$ _{PA}, $\Delta ubiV$ _{PA} et $\Delta ubiT$ _{PA} transformées par le vecteur vide pSW196 ou le même vecteur portant les gènes correspondants. (E) Les souches $\Delta ubiU$ _{PA}, $\Delta ubiV$ _{PA} et $\Delta ubiT$ _{PA} sont cultivées

dans un milieu de dénitrification additionné de l'UQ₄ solubilisé dans du méthanol à une concentration finale de 5 ou 50 µM. Après 24h d'incubation, les unités de formation de colonies par mL (CFU / mL) de chaque souche KO sont estimées et comparées à la même souche en croissance sans UQ₄. En tant que témoin, la toxicité du méthanol a été testée sur la souche sauvage cultivée dans le même milieu complété avec 50 µM en UQ₄.

II.1.5 UbiT_{PA}, UbiU_{PA} et UbiV_{PA} sont probablement essentiels pour le processus complet de dénitrification

Les besoins en dioxygène et en nitrates des souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$, $\Delta ubiV$ transformées par les plasmides portant les gènes correspondants sont étudiés par des expériences sur gélose molle. La gélose molle est préparée de manière anaérobie dans du milieu LB contenant du KNO₃ à une concentration finale de 100 mM, puis exposée à l'air ambiant. L'oxygène diffuse à travers la gélose pour former un gradient, la concentration la plus élevée se trouve au sommet de la gélose (Fig. 69C, piste 1). La souche sauvage PAO1 et les souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$, $\Delta ubiV$ transformées par le plasmide surexprimant le gène muté correspondant poussent tout le long du tube car elles sont capables de s'adapter aussi facilement à la respiration aérobie qu'à la dénitrification (Fig. 69). Au contraire, les souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$, $\Delta ubiV$ portant le vecteur vide sont limitées à la partie oxygénée du milieu qui se trouve dans la couche supérieure (Fig. 69). Les bulles observées dans la gélose molle correspondent à un dégagement des gaz de N₂O et / ou de N₂ (Zumft 1997), suggérant une restauration de la dénitrification de la manière dépendante des protéines Ubi au niveau de la NO réductase et / ou de la N₂O réductase. Tous ces résultats mettent en évidence la nécessité des gènes *ubiT*_{PA}, *ubiU*_{PA} et *ubiV*_{PA} pour la réduction des nitrates et confirment que l'UQ₉ est probablement essentielle pour le processus complet de dénitrification chez *P. aeruginosa*.

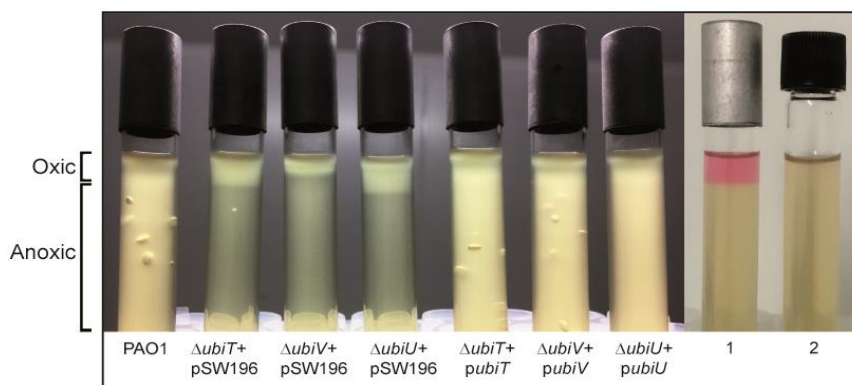


Figure 69. UbiT_{PA}, UbiU_{PA} et UbiV_{PA} sont probablement essentiels pour le processus complet de dénitrification. Photographies de tubes de culture en gélose molle après une nuit de croissance en anaérobie de la souche sauvage PAO1 et des souches $\Delta ubiU$ _{PA}, $\Delta ubiV$ _{PA} et $\Delta ubiT$ _{PA} transformées par le vecteur vide pSW196 ou le même vecteur portant les gènes correspondants. Toutes les souches étudiées ont été inoculées dans les tubes anaérobiques puis exposés à l'air ambiant pour créer un gradient d'oxygène. Les témoins correspondent à des tubes en gélose molle supplémentés avec 2,5 µg / mL de résazurine puis incubés avec (1) ou sans air (2). Les parties aérobie et anaérobie de la gélose sont indiquées.

II.1.6 Les cofacteurs à molybdoptérine ne sont pas impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie

Nous avons vu que le cluster des gènes *ubiTVU_{PA}* était situé en aval des gènes *moaA1*, *moaB1*, *moaE*, *moaD* et *moaC* qui sont impliqués dans la biosynthèse de MoCo (Fig. 66B). Actuellement, la famille des hydroxylases contenant du MoCo est la seule famille connue pour la catalyse des réactions d'hydroxylation indépendantes de l'oxygène (Hille 2005). Comme trois réactions d'hydroxylation indépendantes de l'oxygène sont nécessaires pour la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie (Pelosi, Vo et al. 2019), nos collaborateurs ont voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle le MoCo pourrait être impliqué dans ce processus, ce qui justifierait la co-localisation des gènes *ubi* et *moa / moe*. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons évalué la capacité de biosynthèse de l'UQ₉ des mutants Tn PW7614, PW7615 / PW7616, PW7618 / PW2470, PW7619 / PW1920 et PW7621 / PW7622 correspondant respectivement aux insertions de Tn dans les ORF *moaA1*, *moaB1* (deux mutants), *moaE* (deux mutants), *moaD* (deux mutants) et *moaC* (deux mutants) (Fig. 70). Tous les mutants Tn présentent un défaut de croissance dans les conditions de dénitrification (données non présentées), car le MoCo est un composant essentiel de la nitrate réductase (Coelho and Romao 2015). Cependant, leur croissance anaérobique est restaurée par addition de l'arginine comme décrit précédemment (Filiatrault, Picardo et al. 2006), mais ça n'est pas le cas des souches $\Delta ubiT$, $\Delta ubiU$, $\Delta ubiV$ (données non présentées). Dans un milieu contenant de l'arginine, la teneur en UQ₉ des mutants Tn des gènes de la biosynthèse du MoCo est comparable à celle de la souche sauvage, ce qui suggère que le MoCo n'est pas impliqué dans la biosynthèse anaérobique de l'UQ₉.

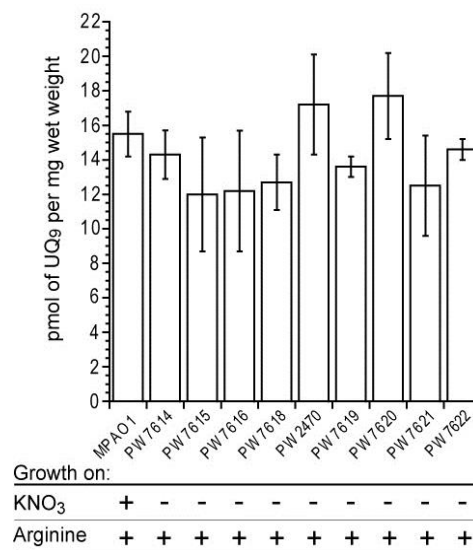


Figure 70. Les cofacteurs de molybdoptérine ne sont pas nécessaires pour la biosynthèse de l'UQ₉ en anaérobie chez *P. aeruginosa*. Panel en haut, quantification de la teneur en UQ₉ dans les extraits lipidiques de la souche sauvage MPAO1 et des mutants Tn des gènes du MoCo cultivés en anaérobie dans le milieu LB additionné d'arginine. Panel en bas, croissance

anaérobie de la souche sauvage MPAO1 et des mutants Tn dans un milieu de dénitrification ou dans le LB supplémenté en arginine (concentration finale 40 mM) après 48h d'incubation. (+), croissance ; (-) pas de croissance.

II.2 Expression et purifications des protéines UbiT_{PA}, UbiU_{PA}, UbiV_{PA}

II.2.1 UbiV_{PA}

La protéine UbiV_{PA}-his₆ est tout d'abord exprimée dans les cellules BL21(DE3) et purifiée avec le protocole établi pour UbiV_{EC}. Le chromatogramme de filtration sur gel d'UbiV_{PA}-his₆ présente deux pics (Fig. 7A). Le premier pic contient deux protéines, qui sont identifiées par spectrométrie de masse comme UbiV_{PA} et UbiU endogène d'*E. coli*, suggérant que UbiV_{PA} est copurifiée avec UbiU endogène d'*E. coli* ; et le deuxième pic contient uniquement UbiV_{PA} (Fig. 71A). Bien que nous ayons réussi à purifier UbiV_{PA} jusqu'à homogénéité, le rendement final de la purification est faible à cause du complexe hétérodimérique UbiV_{PA} - UbiU_{EC} endogène (10 mg / L de culture).

Cela nous a donc amené à purifier UbiV_{PA} dans les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV. Et en effet, UbiV_{PA}-his₆ est purifiée jusqu'à homogénéité sans co-purifier avec UbiU endogène d'*E. coli* grâce aux deux étapes de purification (Ni²⁺ et filtration sur gel) avec un rendement de 20 mg / L de culture. UbiV_{PA}-his₆ se comporte comme un monomère en solution (Fig. 71B).

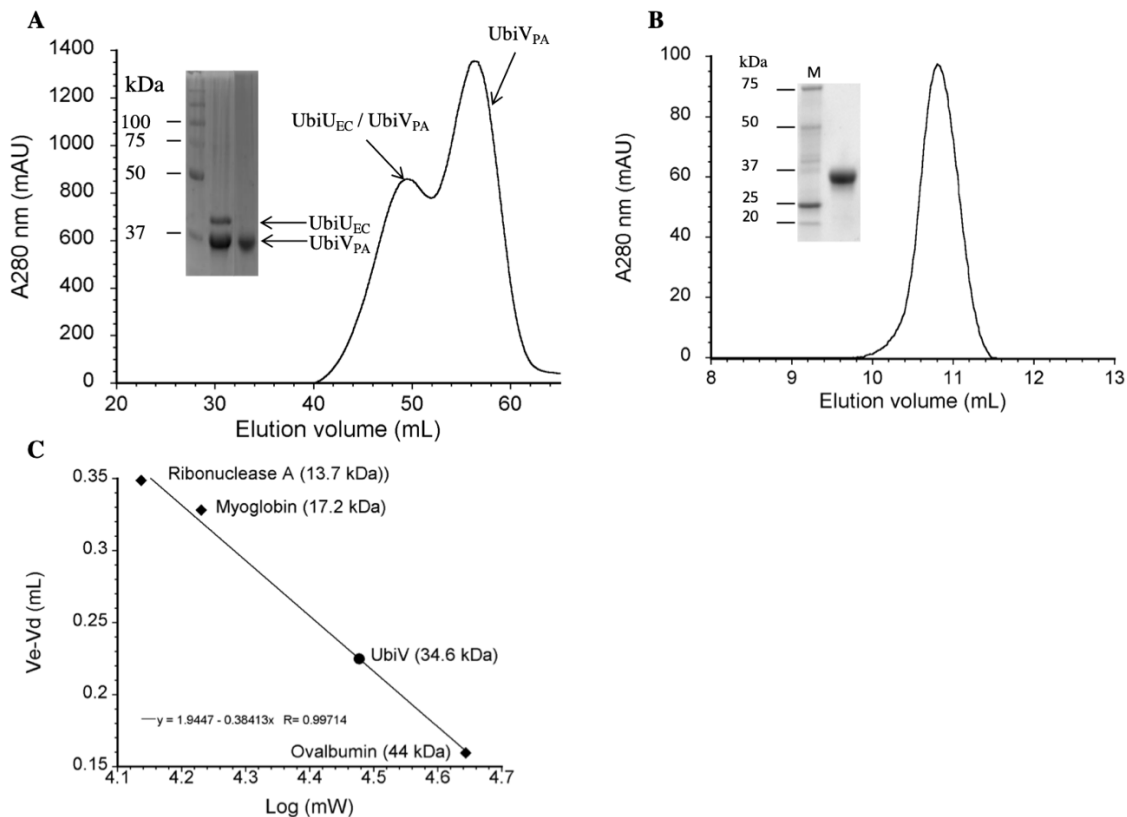


Figure 71. Purification d'UbiV_{PA}. (A) Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiV_{PA} purifié en aérobie sur une colonne Superdex 75 16/60 (GE Healthcare). Deux pics contenant différentes protéines sont indiqués. L'insertion montre un gel de

SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie du complexe UbiV_{PA} - UbiU_{EC} endogène et UbiV_{PA} seule purifié en aérobie. (B) Identique au panneau (A), sauf que UbiV_{PA} a été exprimé et purifié dans les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV. L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiV_{PA} purifié en aérobie. (C) Courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, UbiV_{PA} en cercle.

II.2.2 UbiU_{PA}

La protéine UbiU_{PA}-his₆ est exprimée dans les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV et purifiée avec le protocole établi pour UbiU_{EC}. Le chromatogramme de filtration sur gel d'UbiV_{PA}-his₆ présente trois pics (Fig. 72A). Le premier pic, correspondant au volume mort de la colonne, et il contient UbiU_{PA}, appelé UbiU_{PA1}; le deuxième et troisième, correspondant à 194.6 kDa et 71.4 kDa respectivement en contiennent également, appelés donc UbiU_{PA2} et UbiU_{PA3} (Fig. 72B).

Le contenu en quinone des 3 fractions UbiU_{PA1}, UbiU_{PA2} et UbiU_{PA3} a été analysé à Grenoble par HPLC couplé à une détection électrochimique. De façon très intéressante, nous observons que la fraction de haut poids moléculaire (protéines agrégées ou mal foldées) UbiU_{PA1} ne contient pas de quinone, tandis que la fractions UbiU_{PA2} contient une très large quantité de UQ₈ et que UbiU_{PA3} en contient très peu (Fig. 72C).

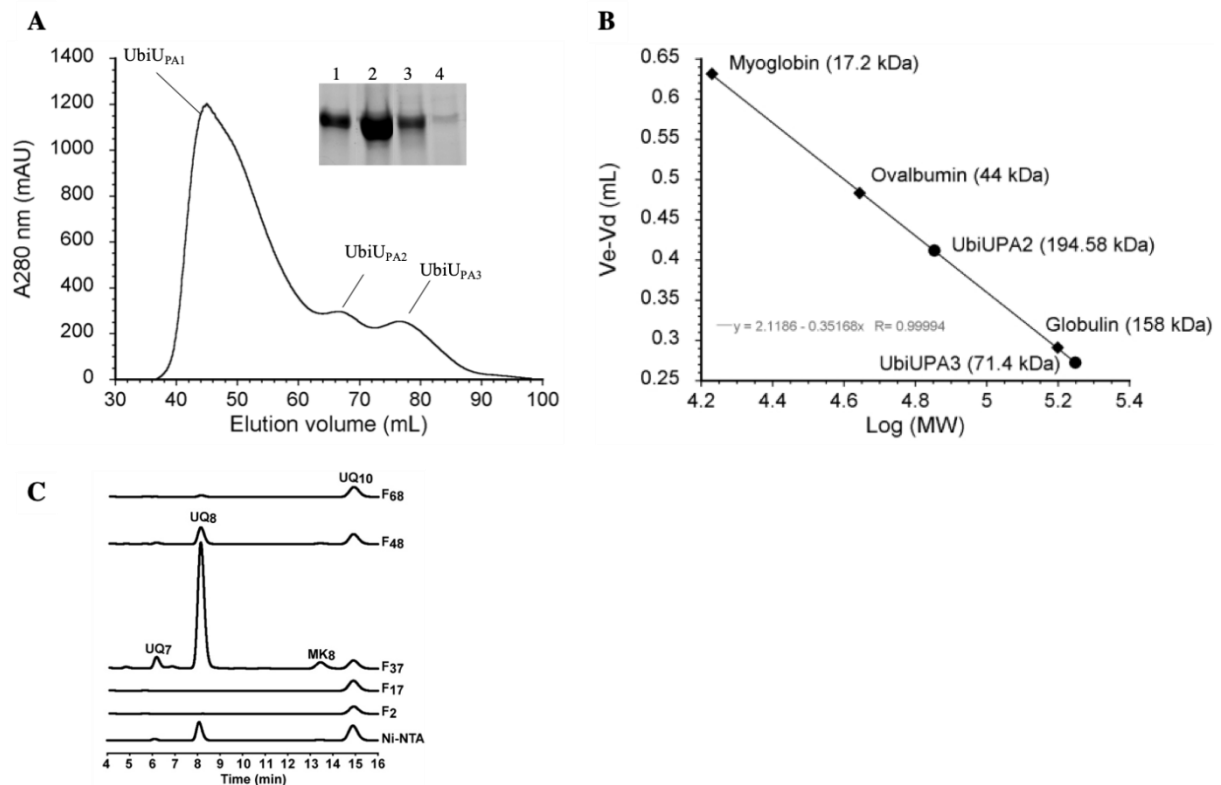


Figure 72. Purification d'UbiU_{PA}. (A) Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiU_{PA} purifié en aérobie sur une colonne Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). Trois pics contenant différentes protéines sont indiqués : UbiU_{PA1}, UbiU_{PA2} et UbiU_{PA3}. L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiU_{PA}. Puits : 1, Ni²⁺; 2, UbiU_{PA1}; 3, UbiU_{PA2}; 4, UbiU_{PA3}. (B) Courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, UbiU_{PA} en cercle. (C) Chromatogramme HPLC-ECD des différentes fractions de purification (Ni-NTA et Superdex 200) d'UbiU_{PA}. La fraction F17 correspond au pic

UbiU_{PA1}, la fraction F37 correspond au pic UbiU_{PA2}, la fraction F48 correspond au pic UbiU_{PA3} et les fractions F2 et F68 correspondent aux fractions de début et de fin de colonne qui ne contiennent pas de protéine : c'est le contrôle du tampon.

II.2.3 Complexe UbiU_{PA}-UbiV_{PA}

Nous avons tout d'abord acheté chez Gene Universal le plasmide pCDFDuet-UbiU_{PA}-UbiV_{PA}-his₆ codant pour UbiU_{PA} sans étiquette et UbiV_{PA}-his₆. Les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV, co-transformées par ce plasmide et le plasmide pGro7, sont cultivées à 37 °C jusqu'à une DO 1.2 où le plasmide pGro7 est induit par du L-arabinose. Les cellules, cultivées jusqu'à une DO₆₀₀ = 1.8, sont refroidies et le plasmide pCDFDuet-UbiU_{PA}-UbiV_{PA}-his₆ est induit par 50 μ M d'IPTG à 16 °C toute la nuit. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT par sonication et les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation. Différentes fractions (culot, surnageant), analysées par gel SDS-PAGE, montrent que UbiU_{PA} et UbiV_{PA}-his₆ sont exprimés mais insolubles (donnés non montrés). Le protocole est donc optimisé en ajoutant différents détergents dans le tampon de lyse (5% cholate, 0.6% DDM, 5 mM LDAO, 1% triton, 0.2% sarkosyl) (Fig. 73A).

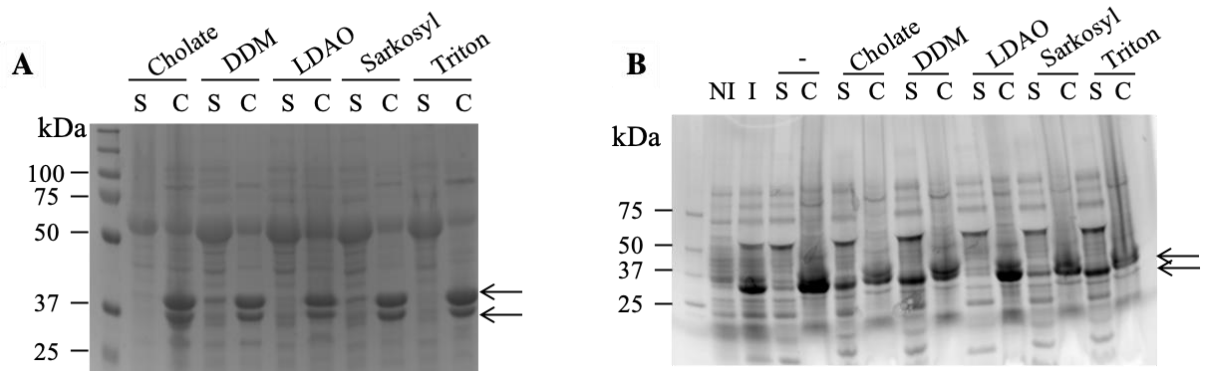


Figure 73. Expression du complexe UbiU_{PA}-UbiV_{PA}. Les cellules BL21(DE3) Δ ubiU-ubiV sont co-transformées par le plasmide pCDFDuet-UbiU_{PA}-UbiV_{PA}-his₆ (A) ou pETduet-UbiU_{PA}-UbiV_{PA}-his₆ (B) codant pour UbiU_{PA} sans étiquette et UbiV_{PA}-his₆ avec le plasmide pGro7 et cultivées dans le milieu LB. Les plasmides sont induits par IPTG (50 μ M) à une DO 1.8 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT avec différents détergents (5% cholate, 0.6% DDM, 5 mM LDAO, 1% triton, 0.2% sarkosyl). Les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). Les bandes correspondantes à UbiU_{PA} et UbiV_{PA} sont indiquées par les flèches.

UbiU_{PA} et UbiV_{PA} se trouvent toujours dans le culot dans la plupart des conditions. Ces résultats nous ont amenés à changer de plasmide d'expression et à construire le plasmide pETduet-UbiU_{PA}-UbiV_{PA}-his₆. Bien que l'expression de ce plasmide soit testée dans différents tampons (Tris ou Phosphate) aux différents pH variés de 6.8 à 8.5, en présence de

différents détergents (5% cholate, 0.6% DDM, 6 mM LDAO), uniquement UbiV_{PA} est soluble (Fig. 73B). Nous sommes en train d'optimiser le protocole de la purification du complexe UbiU_{PA}-UbiV_{PA}.

Au vu de la difficulté à exprimer UbiU et UbiV de *P. aeruginosa* chez *E.coli*, alors que UbiU et UbiV d'*E.coli* s'expriment très bien dans la fraction soluble quand elles sont produites chez *E.coli*, une des hypothèses possibles pour expliquer cela est que la formation d'un complexe UbiU_{PA}-UbiV_{PA} soit empêché car les chaperonnes nécessaires à la formation du complexe ne sont pas compatibles avec un système hétérologue *E.coli* / *P.aeruginosa*.

On note d'ailleurs que lorsque l'on produit UbiV_{PA} dans une souche WT d'*E.coli*, elle est co-purifiée avec UbiU_{EC}, ce qui pourrait être dû au fait que les chaperonnes d'*E.coli* reconnaissent UbiU_{EC} et entraîne donc la solubilisation du complexe hétérologue.

II.2.4 UbiT_{PA}

Les cellules BL21(DE3) $\Delta ubiU-ubiV$, transformées par le plasmide pET32-UbiT_{PA} codant pour UbiT_{PA} fusionnée à l'extrémité N-ter la thiorédoxine (Trx) et une étiquette de six histine (appelé Trx-UbiT_{PA}), sont cultivées à 37 °C. A une DO₆₀₀ = 0.5, les cultures sont refroidies et le gène est induit par 20 μ M ou 50 μ M d'IPTG à 16°C sur la nuit. Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse contenant 50 mM phosphate de sodium pH 7 / 300 mM NaCl par sonication et les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation. Différentes fractions (soluble et culot) sont analysées sur gel SDS-PAGE (Fig. 74A). La partie soluble devient rapidement trouble, suggérant une précipitation des protéines dans le tampon.

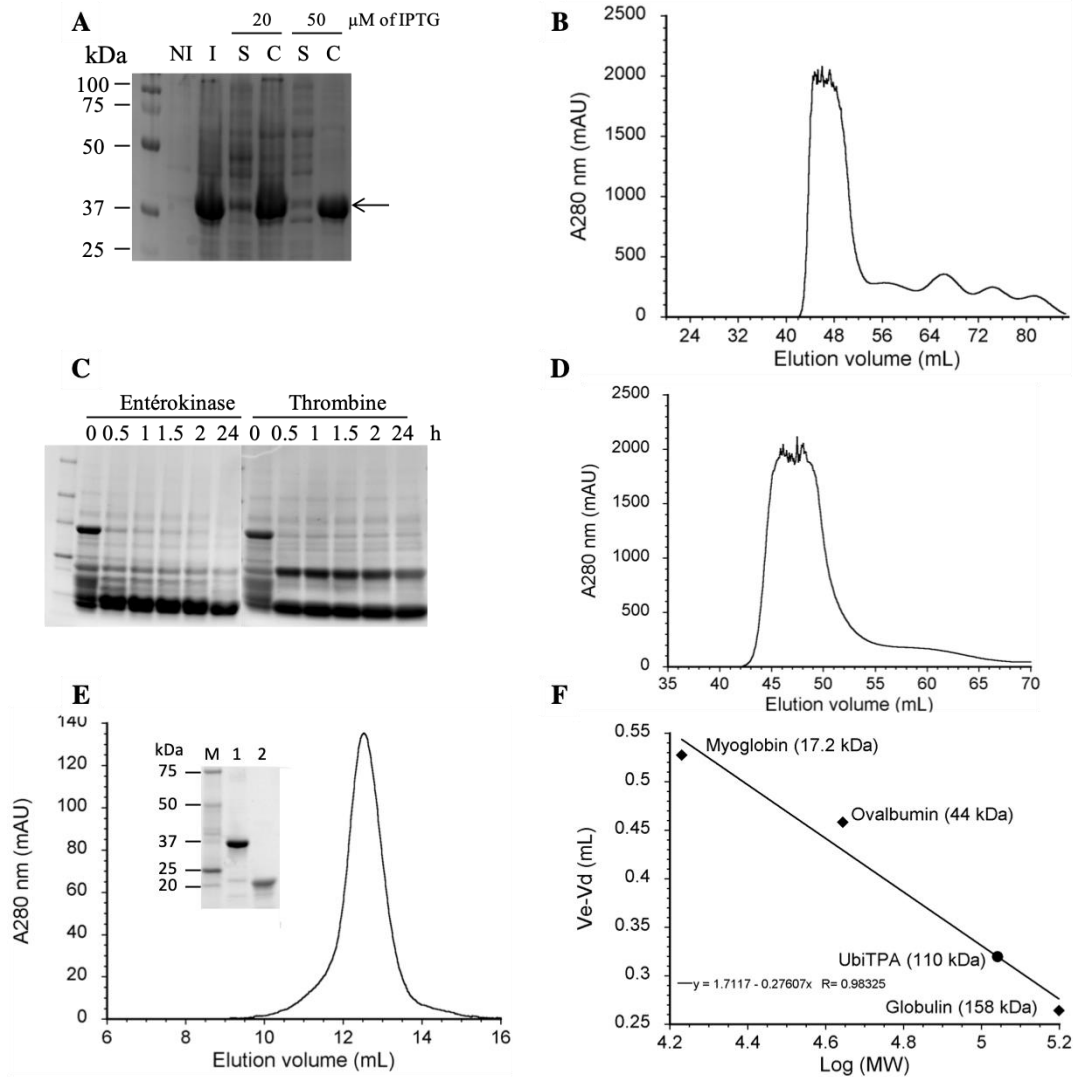


Figure 74. Expression et purification d'UbiTPA. (A) Les cellules BL21(DE3) $\Delta ubiU-ubiV$ sont transformées par pET32-UbiTPA codant pour UbiTPA fusionnée à l'extrémité N-ter la thiorédoxine (Trx) et une étiquette de six histone (Trx-UbiTPA) et cultivées dans le milieu LB. Le plasmide est induit par différentes concentrations en IPTG (20 ou 50 μ M) à une DO 0.5 pendant toute la nuit à 16 °C. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon de lyse contenant 50 mM phosphate de sodium pH 7 / 300 mM NaCl. Les lysats sont clarifiés par ultracentrifugation et différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE (NI : cellules non-induites ; I : cellules induites ; S : surnageant ; C : culot). La bande correspondante à Trx-UbiTPA est indiquée par les flèches. (B) Chromatogramme de filtration sur gel de Trx-UbiTPA purifié en aérobie sur une colonne Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). Trx-UbiTPA a été exprimé comme dans le panneau (A), sauf que les cellules sont lysées dans le tampon de lyse contenant dans 50 Tris-HCl pH 8.5 / 500 mM NaCl / 15% glycérol, puis purifié par une colonne d'affinité Ni^{2+} et de filtration sur gel dans le même tampon. (C) Coupure de Trx-UbiTPA par l'entérokinase et la thrombine à la température ambiante en différents temps indiqués. (D) Chromatogramme de filtration sur gel d'UbiTPA coupé par la thrombine pendant 30 minutes sur une colonne Superdex 75 16/60 (GE Healthcare). (E) Chromatogramme de filtration sur gel de Trx-UbiTPA purifié en aérobie sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie d'UbiTPA fusionné à la thiorédoxine (puit 1) et la thiorédoxine seule (puit 2). (F) Courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, Trx-UbiTPA en cercle.

Ces résultats nous ont amené à changer le tampon de lyse en 50 mM Tris-HCl pH 8.5 / 500 mM NaCl / 15% glycérol. La protéine est exprimée comme décrit au-dessus et purifiée par deux colonnes de chromatographie (Ni^{2+} et filtration sur gel) (Fig. 74B). Une majeure

partie de la protéine purifiée se trouve dans le volume mort de la colonne (Fig. 74B). Deux sites clivables par la thrombine et l'entérokinase se situent entre la Trx et UbiT_{PA}. Nous avons donc testé la coupure de Trx-UbiT_{PA} par ces deux enzymes à la température ambiante en différents temps (Fig. 74C). UbiT_{PA} coupé par la thrombine pendant 30 minutes est ensuite chargé sur une colonne S75 10/60 Increase (GE Healthcare). La majorité d'UbiT_{PA} coupé se trouve dans le volume mort de la colonne (Fig. 74D). Il semble donc qu'UbiT_{PA} seule soit très instable et tende fortement à s'agréger. Nous comptons donc par la suite travailler avec Trx-UbiT_{PA}.

Le protocole de purification de Trx-UbiT_{PA} a donc été finalement optimisé en ajoutant 5% de cholate dans le tampon de lyse, puis la protéine est purifiée par deux étapes de purification (Ni²⁺ et filtration sur gel) dans le tampon contenant 50 Tris-HCl pH 8.5 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 0.5% cholate (Fig. 74E). Trx-UbiT_{PA} se comporte comme trimère en solution (Fig. 74F).

II.2.5 Thioredoxine (Trx)

La thiorédoxine (Trx-his₆) seule est exprimée et purifiée de même manière que Trx-UbiT_{PA} dont le protocole est décrit ci-dessus (Fig. 74E). Elle servira au contrôle de Trx-UbiT_{PA} pour les tests biochimiques car l'activité de la thrombine est inhibée en présence du cholate, Trx-UbiT_{PA} est clivée à un très faible rendement (données non montrées).

II.3 Caractérisations biochimiques des protéines UbiT_{PA}, UbiU_{PA}, UbiV_{PA}

II.3.1 UbiV_{PA} contient un centre [4Fe-4S]

La protéine UbiV_{PA} purifiée, de façon similaire à UbiV_{EC}, est rose et son spectre d'absorption UV-vis montre l'absorption dans la région de 350 à 550 nm, suggérant la présence du centre Fe-S dégradé au cours de la purification aérobie (Fig. 75A, ligne pointillée). En effet, nous avons détecté des quantités sous-stœchiométriques de fer et de soufre (0.22 Fe et 0.19 S / monomère). Après la reconstitution du centre Fe-S en anaérobie, la protéine possède 3.9 Fe et 3.4 S / monomère (Tableau 12) et son spectre UV-vis, présente une bande d'absorption vers 400 nm, indiquant la présence d'un centre [4Fe-4S] (Fig. 75A, ligne continue), qui est sensible à l'oxygène (Fig. 75B). Tous ces résultats suggèrent qu'UbiV_{PA} se comporte comme UbiV_{EC}, *i. e.* elle est capable de lier en anaérobie un centre [4Fe-4S] qui est sensible à l'air.

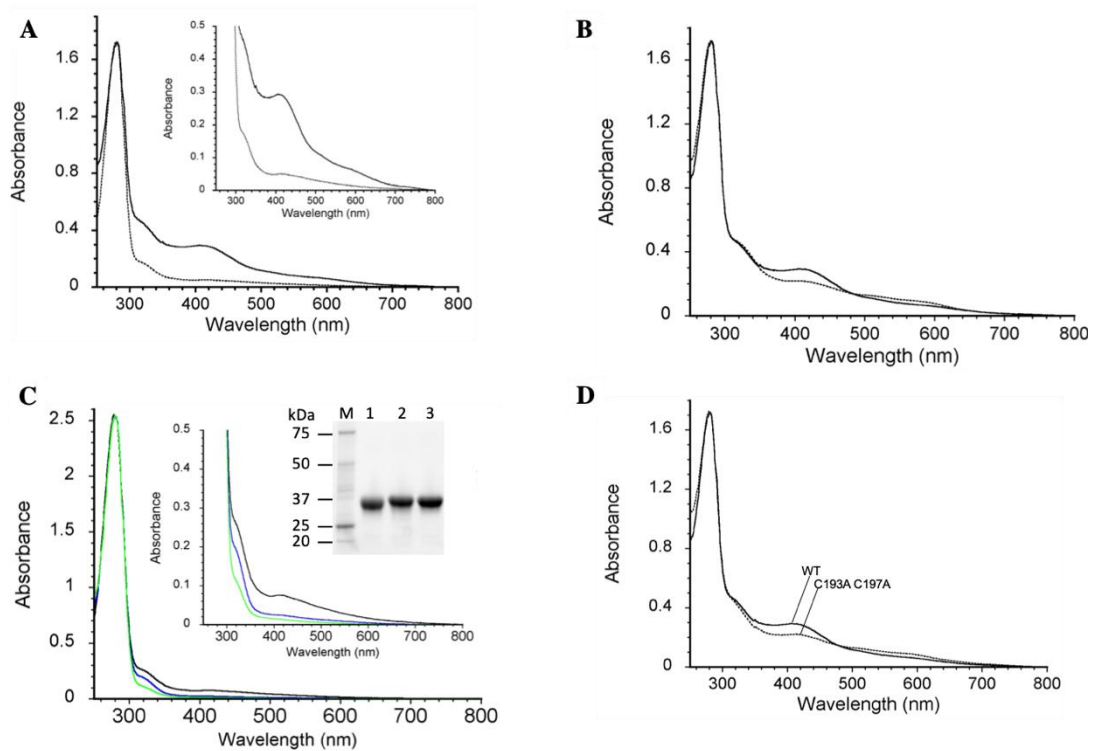


Figure 75. Caractérisations biochimiques d'UbiV_{PA}. (A) Spectre d'absorption UV-vis d'UbiV_{PA} purifié en anaérobiose (ligne pointillée, 32.6 μM) et de l'holo-UbiV reconstitué en anaérobiose (ligne continue, 22.7 μM). L'insertion est un agrandissement de la région de 300 à 700 nm. Le coefficient d'extinction molaire, soit 410 nm, a été déterminé à 13 mM⁻¹ cm⁻¹ pour l'holo-UbiV. (B) Spectre d'absorption UV-visible de l'holo-UbiV à 22.7 μM en anaérobiose (trait continu) et après 20 min d'exposition à l'air (trait pointillé). (C) Comparaison des spectres d'absorption UV-vis d'UbiV_{PA} sauvage (noir) purifié en aérobie et de différents mutants cystéines en alanines d'Ubi_{PA} (C193A C197A en bleu et C39A C193A C197A en vert). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie des purifications d'UbiV et des variants. Puits : M, marqueur de masse moléculaire ; 1, UbiV_{PA} sauvage ; 2, UbiV_{PA} C193A C197A ; 3, UbiV_{PA} C39A C193A C197A. (D) Comparaison des spectres d'absorption UV-vis d'UbiV_{PA} sauvage et de différents mutants cystéines en alanines d'UbiV_{PA} après reconstitution des centres [Fe-S] en anaérobiose.

Une analyse du contenu en quinone par HPLC couplé à une détection électrochimique a montré que UbiV_{PA} ne contient pas de quinone, contrairement à UbiU_{PA2} (Fig. 72C). Ceci pourrait suggérer un rôle différent pour UbiU et UbiV. UbiU pourrait lier les substrats lipidiques, tandis qu'UbiV pourrait peut-être accomplir une fonction moléculaire différente (liaison d'un partenaire protéique, de donneur d'oxygène, etc.).

Nous avons ensuite étudié l'importance de quatre résidus cystéines conservés d'UbiV_{PA}, qui se trouvent exactement aux mêmes positions dans la séquence que ceux d'UbiV_{EC} : C39, C180, C193 et C197 (Fig. 76).

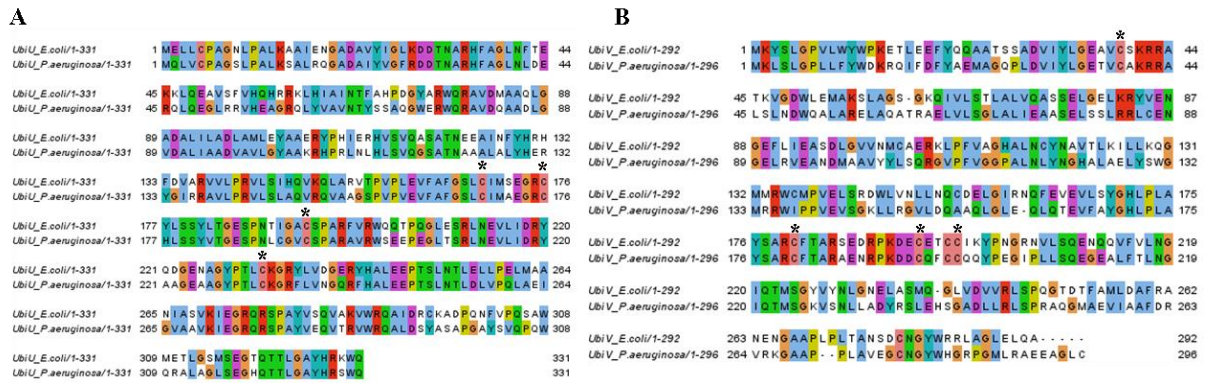


Figure 76. Alignement des multiples séquences d'UbiU (A) et d'UbiV (B) d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*. Les cystéines conservées sont indiquées par les astérisques.

Les mutants cystéine en alanine (un double mutant C193A C197A, un triple mutant C39A C193A C197A) ont été purifiés à homogénéité de la même manière qu'UbiV_{PA} sauvage (Fig. 75C). Leur spectres UV-Vis montrent une absence des bandes d'absorbance dans la région 350-550 nm (Fig. 75C) et les teneurs en Fe et S et l'absorbance à 410 nm sont largement diminuées après la reconstitution en anaérobiose (Fig. 75D et Tableau 12). Le triple mutant C39A C193A C197A s'agrège après la réaction de reconstitution. Ces résultats suggèrent que les résidus cystéines en position 39, 193, 197 et probablement 180 sont importants pour la coordination du centre [4Fe-4S] dans UbiV_{PA}.

Protéine	A ₂₈₀ / A ₄₁₀	Teneur (nmol / nmol de protéine)	
		Fer	Soufre
UbiV _{PA}	5.8	3.90 ± 0.03	3.40 ± 0.20
UbiV _{PA} C193A C197A	7.8	En cours de déterminer	En cours de déterminer
UbiV _{PA} C39A C193A C197A	Agrégée		

Tableau 12. Caractérisation des protéines UbiV_{PA}. La quantité en métal et les propriétés UV-Vis des protéines sauvages et des mutants après les reconstitutions anaérobioses de leurs centres Fe-S sont indiqués.

II.3.2 Capacité de liaison des lipides par UbiT_{PA} et UbiU_{PA}

La capacité de liaison aux lipides de Trx-UbiT_{PA}, d'UbiU_{PA} et d'UbiV_{PA} va être étudiée *in vitro*. Pour cela, différentes protéines purifiées (UbiU_{PA}, UbiV_{PA}, et Trx-UbiT_{PA}) seront utilisées pour les tests de fixation des lipides sur une membrane sur laquelle différents lipides ont été auparavant déposés : (1) Ubiquinone (UQ₇), (2) Farnésyl Phénol, (3) Farnésyl catéchol, qui sont les intermédiaires de l'ubiquinone synthétisés par notre laboratoire, (4) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (PA) et (5) cholestérol. Il a été démontré qu'UbiT_{PA} liait spécifiquement au PA mais pas au cholestérol (Groenewold, Massmig et al. 2018). Le PA et le cholestérol serviront donc aux contrôles positif et négatif du test, respectivement.

III. Discussion

Nous avons vu, dans ce chapitre, que l'UQ₉ a été identifié comme la quinone majeure dans les membranes cytoplasmiques de *P. aeruginosa* en culture aérobie et en anaérobie, ce qui est en accord avec les travaux précédents (Matsushita, Yamada et al. 1980, Jiang, Wang et al. 2019). Nos collaborateurs ont identifié chez *P. aeruginosa* des homologues des gènes d'*E. coli* qui sont impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone dépendante de l'oxygène, suggérant que les deux bactéries partagent une voie de biosynthèse de l'ubiquinone similaire impliquant trois hydroxylases aérobiques (UbiI, UbiH et UbiF) en utilisant O₂ comme cosubstrat. Comme aucune autre quinone n'a été détectée dans la membrane cytoplasmique, nous supposons que l'UQ₉ est essentiel pour *P. aeruginosa* en culture aérobie.

En l'absence d'oxygène, *P. aeruginosa* peut se développer en utilisant des N-oxydes comme accepteurs alternatifs terminaux d'électrons de la chaîne respiratoire. Ce processus métabolique, appelé dénitrification, a été largement étudié (Arai 2011). Cependant, l'auteur du transfert des électrons des déshydrogénases primaires aux N-oxydes réductases n'était pas clairement identifié à ce jour (Arai 2011). Dans ce chapitre, nos collaborateurs ont identifié l'UQ₉ comme étant la quinone majeure synthétisée dans des conditions anaérobiques, suggérant que *P. aeruginosa* et *E. coli* partagent également la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'O₂. En effet, comme présenté dans le chapitre IV, nous avons récemment identifié chez *E. coli* la voie de biosynthèse de l'ubiquinone dans des conditions anaérobiques. Cependant, *E. coli* se développe normalement en anaérobie d'une manière indépendante de l'ubiquinone en raison probablement de la présence des naphthoquinones (Pelosi, Vo et al. 2019). Chez *E. coli*, la fonction d'UbiT reste encore floue et on pense qu'UbiU et UbiV participent aux réactions d'hydroxylation catalysées en anaérobie au lieu de UbiF, UbiI et UbiH, qui dépendent de l'O₂. Chez *P. aeruginosa* des homologues des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* d'*E. coli* ont identifiés. Ils correspondent aux ORF *ubiT_{PA}* (PA3911), *ubiU_{PA}* (PA3913) et *ubiV_{PA}* (PA3912), respectivement. Nos collaborateurs ont montré que ces gènes étaient impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone uniquement dans les conditions anaérobiques. Ils sont également essentiels au métabolisme de la dénitrification anaérobique de *P. aeruginosa*, qui est en accord avec le fait que *P. aeruginosa* ne possède que l'UQ₉. Ces résultats ont clarifié certains résultats obtenus dans la littérature il y a quelques années. En effet, les ORF *ubiU_{PA}* et *ubiT_{PA}* sont exprimés en réponse aux conditions (Filiatrault, Wagner et al. 2005) et l'abondance d'UbiU_{PA} a été augmentée au cours de la croissance anaérobique (Wu, Guina et al. 2005). De plus, en utilisant une mutagenèse aléatoire par transposon, les ORF *ubiU_{PA}* et *ubiU_{PA}* ont été identifiés comme essentiels pour la croissance anaérobique de

P. aeruginosa sur nitrate, nitrite et arginine (Filiatrault, Picardo et al. 2006). Bien que sa contribution soit encore mal comprise en présence de l'hôte, la respiration anaérobie de *P. aeruginosa* semble favoriser les mécanismes de virulence dans l'infection pulmonaire chronique (Jensen, Kolpen et al. 2017). En effet, selon les dosages directs en O₂ dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, le mucus endobronchique infecté des patients est sujet à une hypoxie grave, voire à une anoxie (Worlitzsch, Tarran et al. 2002). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène. Premièrement, cela peut être dû à la structure du biofilm en soi via l'établissement d'un gradient d'oxygène. Néanmoins, cette hypothèse est de plus en plus remise en question en raison des fortes différences morphologiques entre la production de biofilms *in vivo* et *in vitro*, la dernière étant beaucoup plus profonde que la première, par exemple (Jensen, Kolpen et al. 2017). La deuxième hypothèse plus privilégiée est que la consommation accrue d'O₂ dans le biofilm pourrait être davantage due à l'activation de leucocytes polymorphonucléaires pour produire du superoxyde (Kolpen, Hansen et al. 2010) et dans une moindre mesure à l'oxyde nitrique (Kolpen, Bjarnsholt et al. 2014). Des réponses supplémentaires de l'hôte affectent également la disponibilité d'accepteurs d'électrons alternatifs pour le métabolisme anaérobies bactériens. Par exemple, des taux élevés de nitrates et de nitrites ont été mesurés dans les expectorations de la mucoviscidose (Linnane, Keatings et al. 1998). D'après toutes ces observations et comme l'UQ₉ est un composant essentiel qui permet de transférer les électrons des déshydrogénases primaires aux réductases chez *P. aeruginosa* en conditions anaérobies, nous proposons qu'UbiT_{PA}, UbiV_{PA} et UbiU_{PA} pourraient contribuer à l'infection pulmonaire de la mucoviscidose. En effet, cette hypothèse est renforcée par certains résultats dans la littérature obtenus dans des conditions de poumon de la mucoviscidose. Les ORF *ubiU_{PA}* et *ubiV_{PA}* sont exprimés en réponse à une forte diminution de l'oxygène (Alvarez-Ortega and Harwood 2007) et une approche protéomique quantitative récente révèle une abondance accrue de protéines UbiT_{PA}, UbiU_{PA} et UbiV_{PA} dans le biofilm anaérobie (Groenewold, Massmig et al. 2018).

Nous avons réussi à purifier UbiT_{PA} fusionné à la thiorédoxine dont la capacité de liaison des lipides sera étudiée *in vitro*. Nous avons vu, dans le chapitre III, qu'UbiJ était un élément clé dans le méga-complexe composant des protéines Ubi impliqué dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone dépendante de l'oxygène. UbiJ, avec la capacité de lier l'ubiquinone et ses intermédiaires extrêmement hydrophobes via son domaine SCP2, assure la structure et le fonctionnement du méga-complexe dans le cytosol. Notre hypothèse est qu'UbiT remplace la fonction d'UbiJ en anaérobie, car UbiJ est particulièrement programmée

par la nature pour la voie dépendante de l'oxygène (Pelosi, Vo et al. 2019). Groenewold et ses collègues ont montré que les résidus hydrophobes conservés L56, L58, V69 et L114 sont importants pour la capacité de fixation des lipides d'UbiT_{PA} et ont proposé qu'ils constituaient la cavité hydrophobe d'UbiT_{PA} où les lipides se fixent (Groenewold, Massmig et al. 2018). Les mutants de ces résidus en arginine sont en cours d'obtenir afin de confirmer cette hypothèse dans le contexte de la biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie.

Nous avons démontré dans ce chapitre qu'UbiU_{EC} était capable de lier un centre [4Fe-4S] en anaérobie *via* le motif de quatre cystéines conservées et que le centre [4Fe-4S] était important pour l'activité d'UbiU_{EC}. Ici, pour la première fois, nous avons démontré qu'UbiU_{PA} purifiée contenait l'UQ₈ (Fig. 72C). Cette découverte est cohérente avec la structure du domaine U32 de Mk0906 chez *Methanopyrus kandleri* (voir section IV du chapitre I) (code PDB 5D88) (Schacherl, Montada et al. 2015). En effet, la structure de Mk0906, caractéristique par un motif du tonneau TIM ($\beta\alpha$)₈, révèle un site de liaison putatif pour une molécule amphiphile avec un groupe carboxylate ou un fragment chargé négativement de manière similaire à une extrémité et une queue principalement hydrophobe, c'est bien le cas de l'ubiquinone et ses intermédiaires. UbiV_{PA} se comporte comme UbiV_{EC}, c-à-d elle est capable de lier un centre [4Fe-4S] en anaérobie *via* quatre cystéines conservées et ce centre est sensible à l'air.

La combinaison des résultats d'UbiT, UbiU et UbiV à la fois de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* nous laisse penser à l'existence d'un complexe alternatif d'Ubi qui est impliqué spécifiquement dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. Dans ce modèle, UbiT, en remplaçant la fonction d'UbiJ, lie la queue hydrophobe des intermédiaires de l'ubiquinone et maintient le complexe composant des protéines Ubi où UbiI, UbiH et UbiF seraient remplacés par UbiU-UbiV. Ce complexe assurerait donc la conversion de 4-HB en ubiquinone spécifiquement en anaérobie. Les réactions de prénylation, de décarboxylation, de méthylation auraient lieu de même manière que la voie dépendante de l'oxygène, alors que UbiU-UbiV seraient responsables des trois réactions d'hydroxylation *via* leurs centres [4Fe-4S], dont le mécanisme moléculaire reste inconnu. A ce jour, les enzymes à cofacteur à Molybdène (MoCo) sont la seule famille connue pour catalyser des réactions d'hydroxylation indépendamment d'oxygène (Hille, Retey et al. 1998). Les résultats de nos collaborateurs démontrent que les gènes impliqués dans la biosynthèse cofacteur MoCo ne sont pas importants pour la biosynthèse de l'ubiquinone en absence de l'oxygène, suggérant qu'UbiU et UbiV ne sont pas les enzymes à cofacteur à MoCo, mais

plutôt une nouvelle classe des enzymes responsables des réactions d'hydroxylation en absence d'oxygène.

1 **The O₂-independent pathway for the biosynthesis of ubiquinone is essential**
2 **for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa***

3
4 Chau-Duy-Tam Vo^{1¶}, Julie Michaud^{2¶}, Sylvie Elsen³, Marc Fontecave¹, Fabien Pierrel²,
5 Murielle Lombard^{1*} and Ludovic Pelosi^{2*}

6
7 ¹Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, Université Pierre et
8 Marie Curie.

9 ²Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CHU Grenoble Alpes, Grenoble INP, TIMC-IMAG, F-38000
10 Grenoble, France.

11 ³Biology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes,
12 ERL5261 CNRS, Grenoble, France.

13
14 *Correspondence: ludovic.pelosi@univ-grenoble-alpes.fr, murielle.lombard@college-de-
15 france.fr

16 ¶ C.-D.-T.V. and J.M. contributed equally to the work.

17
18 **ABSTRACT (250 WORDS MAX)**

19 Bacteria such as *Escherichia coli* contain two main types of quinones, benzoquinones
20 represented by ubiquinone (UQ) and naphthoquinones (NQ). Typically, NQ function
21 predominantly in anaerobic respiratory chains, whereas UQ is the major electron carrier used
22 for reduction of dioxygen. However, the situation is probably less paradigmatic than this
23 exclusive system. Indeed, a pathway that produces UQ under anaerobic conditions in an
24 UbiU-, UbiV- and UbiT-dependent manner has been recently discovered in *E. coli*.
25 Nevertheless, the physiological relevance of this pathway is not yet understood because of the
26 presence of NQ in this bacterium. In the present study, we established that UQ₉ is the
27 predominant quinone of *P. aeruginosa* and is involved in the bacterial growth under
28 denitrification conditions. Moreover, we demonstrated that ORFs *PA3911*, *PA3912* and
29 *PA3913*, which are homologues respectively to *ubiT*, *ubiV* and *ubiU* genes, were essential for
30 UQ₉ biosynthesis and thus to the anaerobic respiration of *P. aeruginosa*. We have shown that
31 UbiV from *P. aeruginosa* accommodates a [4Fe-4S] cluster and is able to form a complex
32 with UbiU, as this is the case with their *E. coli* counterparts. UbiT, which carries a sterol
33 carrier domain, binds some lipidic molecules. According to the denitrification metabolism of
34 *P. aeruginosa*, which is believed to be important for its pathogenicity in cystic fibrosis
35 patients, our results highlight the O₂-independent UQ biosynthesis pathway as a new possible
36 target to develop innovative antibiotics.

37

38

39

40 INTRODUCTION

41 The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* has a remarkable ability to grow under
42 a variety of environmental conditions such as soil and water as well as animal-, human-, and
43 plant-host-associated environments. *P. aeruginosa* is responsible for numerous acute and
44 chronic infections and presents a dramatic problem for patients with severe burns, cystic
45 fibrosis (CF), and immunocompromising states (Magill, Edwards et al. 2014, Crull, Somayaji
46 et al. 2018).

47 The utilization of various carbon sources and energy metabolisms (respiration or
48 fermentation) might contribute to the environmental adaptation of *P. aeruginosa* (Arai 2011).
49 Its main energy-producing system is respiration, which utilizes a proton motive force (pmf)
50 used for ATP synthesis. The pmf is produced by the transfer of electrons and protons from
51 reduced donors to oxidized acceptors *via* the quinone pool. Whereas the dehydrogenases and
52 reductases involved in respiratory metabolism have been well described and annotated in the
53 genome of *P. aeruginosa* PAO1 (Williams, Zlosnik et al. 2007, Torres, Kasturiarachi et al.
54 2019), the composition of the quinone pool remains largely obscure. Studies in the sixties
55 suggested ubiquinone 9 (UQ₉) as a major quinone of aerobically-grown *P. aeruginosa* (Page,
56 Gale et al. 1960) and UQ₉ is therefore believed to be essential for aerobic respiration
57 (Matsushita, Yamada et al. 1980).

58 Bacteria contain two main types of quinones, benzoquinones and naphthoquinones,
59 represented respectively by UQ (or coenzyme Q) and menaquinone (MK)/
60 demethylmenaquinone (DMK). Typically, MK and DMK function predominantly in
61 anaerobic respiratory chains, whereas UQ is the major electron carrier used for reduction of
62 dioxygen by the cytochrome oxidases (Nowicka and Kruk 2010). However, the metabolic use
63 of various quinone species according to environmental dioxygen might be more complex.
64 Indeed, we recently discovered a pathway that produces UQ under anaerobic conditions, and
65 which is conserved across many bacterial species (Pelosi, Vo et al. 2019). Among the proteins
66 involved in the UQ biosynthesis pathway, only UbiK and UbiJ, that act as accessory proteins
67 important for the assembly and/or stability of the aerobic Ubi complex and those catalyzing
68 hydroxylation steps (UbiI, UbiF and UbiH) differ between the O₂-dependent and O₂-
69 independent UQ pathways (Aussel, Loiseau et al. 2014, Loiseau, Fyfe et al. 2017, Hajj
70 Chehade, Pelosi et al. 2019, Pelosi, Vo et al. 2019). Indeed, the flavin-dependent
71 monooxygenases UbiI, UbiF, and UbiH use dioxygen as a co-substrate and are therefore
72 active only in aerobic conditions (Alexander and Young 1978). In contrast, we showed

73 previously that UbiT, UbiU and UbiV were essential for UQ biosynthesis only in anaerobic
74 conditions (Pelosi, Vo et al. 2019). The rest of the enzymes, catalyzing the functionalization
75 (prenylation, decarboxylation, and methylation) of the phenyl ring of the 4-hydroxybenzoate
76 precursor, in total 7 proteins (UbiA, B, C, D, E, G, X), are common to both conditions.
77 However, as explained above, the metabolic relevance of the O₂-independent UQ pathway is
78 not yet clearly understood to date, because naphthoquinones are considered the main quinones
79 in anaerobiosis (Sharma, Teixeira de Mattos et al. 2012).

80 In absence of O₂, *P. aeruginosa* is able to carry out anaerobic respiration with N-oxides as
81 terminal electron acceptors of the respiratory chain. This process called denitrification allows
82 the reduction of soluble nitrate and nitrite to gaseous nitrous oxide (N₂O) or molecular
83 nitrogen (N₂) (Zumft 1997). Because *P. aeruginosa*-infected mucus in CF airway is depleted
84 of oxygen and enriched in N-oxides, the anaerobic metabolism of *P. aeruginosa* via the
85 denitrification pathway is believed to be important for its pathogenicity (Jensen, Kolpen et al.
86 2017). Four sequential reactions involving metalloenzymes are needed to reduce nitrate to N₂,
87 i.e. nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase and nitrous oxide reductase. *P.*
88 *aeruginosa* was considered as a paradigm of the denitrification pathway and all the N-oxide
89 reductases involved in this metabolism have been widely studied as well as the regulatory
90 network controlling the denitrification genes (Williams, Zlosnik et al. 2007, Arai 2011,
91 Borrero-de Acuna, Timmis et al. 2017). However, the anaerobic quinone pool of *P.*
92 *aeruginosa* has not been characterized.

93 In the present study, we discovered that UQ₉ is essential to the growth of *P. aeruginosa* PAO1
94 strain in denitrification medium. We identified in this bacterium the ORFs *PA3911*, *PA3912*
95 and *PA3913* as homologues to the genes *ubiT*, *ubiV* and *ubiU*, respectively. Our results
96 showed that these three genes called here after *ubiT_{Pa}*, *ubiV_{Pa}* and *ubiU_{Pa}* are essential
97 components of the O₂-independent UQ₉ biosynthetic pathway. UbiU_{Pa} and UbiV_{Pa} have been
98 biochemically characterized. This molecular pathway for UQ production is present only in
99 proteobacteria (Pelosi, Vo et al. 2019) and is for some of them essential in anaerobic
100 conditions as demonstrated in the present study. Taken together, our results highlight that this
101 pathway could be an interesting lead for the development of innovative antibiotics targeting
102 the denitrification metabolism.

103

104 **MATERIALS and METHODS**

105 **Bacterial strains and growth conditions.** *P. aeruginosa* and *E. coli* strains used in this study
106 are listed in Table S1. We obtained the collection of transposon (Tn) mutants in *P. aeruginosa*

107 MPAO1 strain from the Manoil Laboratory, Department of Genome Science, University of
108 Washington, USA (Jacobs, Alwood et al. 2003, Held, Ramage et al. 2012). The Tn insertion
109 site of the mutant strains were verified by sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany)
110 using PCR primers recommended by the library curators. *P. aeruginosa* strains were
111 aerobically maintained at 37°C on lysogeny broth (LB) agar plates. For quinone assay,
112 aerobic cultures (5 mL) were performed in LB medium at 37°C with rotary shaking at 200
113 rpm. Procedure for growing *P. aeruginosa* anaerobically were performed in a 12 mL-Hungate
114 tubes containing LB medium supplemented with electron acceptor, KNO₃ at 100 mM final
115 concentration (Wagner, Bushnell et al. 2003) and called here after denitrification media and
116 deoxygenated 30 min by argon bubbling (O₂<0.1 ppm) prior autoclaving. In some
117 experiments, LB medium were supplemented with arginine at a final concentration of 40 mM
118 instead of KNO₃ (Hasset 1996). Then, Hungate tubes were inoculated through the septum
119 with 100 µL of overnight cultures taken with disposable syringe and needles from closed
120 Eppendorf tubes filled to the top. These cultures were used for measuring the quinone
121 contents. For aerobic growth studies, aerobic overnight cultures were used to inoculate a 96-
122 well plate to obtain a starting optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.05 and further incubated
123 with shaking at 37°C. Changes in OD₆₀₀ were monitored every 10 min for 12 h using the
124 Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Lyon, France). For anaerobic growth studies,
125 overnight cultures in 50 mL closed tubes of not degassed denitrification medium were used to
126 inoculate 400 mL bottles to obtain a starting OD₆₀₀ of 0.05. Then, bacteria were grown
127 anaerobically by sparging argon (O₂<0.1 ppm) and bacterial cultures were monitored
128 spectrophotometrically (OD₆₀₀) at 30 min intervals. *E. coli* MG1655 or DH5α were grown on
129 LB agar or in LB liquid. When required, the medium was supplemented with ampicillin at
130 100 µg/ml for *E. coli*, carbenicillin at 250 µg/ml for *P. aeruginosa*, or tetracycline at 60 µg/ml
131 for *E. coli* and 100 µg/ml for *P. aeruginosa* or gentamicin at 200 µg/mL for *P. aeruginosa*.
132 When necessary, UQ₄ or 0.1% (w/v) arabinose final concentration was added to the medium
133 to enhance bacterial anaerobic growth or to induce P_{BAD} expression of pSW196-derived
134 plasmids, respectively. *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) medium (from DB) containing
135 irgasan (25 µg/L) was used for triparental mating to counter select *E. coli*. For CFU counting,
136 bacteria were suspended in PBS and cell suspensions were serially diluted in PBS. For each
137 sample 100 µL of at least four different dilutions were plated on LB plates, incubated for 24h
138 at 37°C and CFU were counted using a Scan 100 Interscience.

139

140 **Plasmids and genetic manipulations.** The plasmids and the primers used in this study are
141 listed in Tables S1 and S2). All the plasmids produced in this work were checked using DNA
142 sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany). To generate *P. aeruginosa* deletion
143 mutants, overlapping upstream and downstream flanking regions of *ubiT_{Pa}*, *ubiU_{Pa}* and
144 *UbiV_{Pa}* genes were obtained by PCR amplification using PAO1 genome as template and the
145 oligonucleotides described in Table S2. The resulting fragments were then cloned into *Sma*I-
146 cut pEXG2 plasmid by sequence and ligation-independent cloning (SLIC) (Jeong, Yim et al.
147 2012). To complement the mutants, the *ubiT_{Pa}*, *ubiU_{Pa}* and *UbiV_{Pa}* fragments were generated
148 by PCR amplification using the oligonucleotide pairs *yhbT5/yhbT3*, *yhbU5/yhbU3* and
149 *yhbV5/yhbV3*, respectively, and PAO1 genome as template. Fragments were *Eco*RI-*Sac*I
150 digested and inserted into *P_{BAD}*-harboring pSW196 plasmid, yielding the *pubiT_{Pa}*, *pubiU_{Pa}*
151 and *pubiV_{Pa}* plasmids, respectively (Table S1). The pEXG2- and pSW196-derived vectors
152 were transferred into *P. aeruginosa* PAO1 strain by triparental mating using pRK2013 as a
153 helper plasmid (Figurski and Helinski 1979). For allelic exchange using the pEXG2 plasmids,
154 cointegration events were selected on PIA plates containing gentamicin. Single colonies were
155 then cultured on NaCl-free LB agar plates containing 10% (w/vol) sucrose to select for the
156 loss of the plasmid, and the resulting sucrose-resistant colonies were checked for mutant
157 genotype by PCR.

158

159 **Soft-agar study for anaerobic growth sensitivity.** Soft-agar studies were performed in
160 denitrification medium supplemented by agar 0.7% (w/v) final concentration. After argon
161 bubbling (O₂<0.1 ppm) for 30 min, the suspension (13 mL) was autoclaved in Hungate tubes.
162 They were then placed in a 40°C incubator and they were inoculated through the septum with
163 100 µL of overnight cultures taken with disposable syringe and needles from Eppendorf tubes
164 filled to the top, mixed by inverting, and incubated at room temperature 30 min to allow the
165 agar to solidify. Then, the tubes were aerobically incubated with caps loosened at 37°C for
166 24h. A control experiment was performed with resazurin (0.25 µg/mL final concentration)
167 used as an indicator of medium oxygenation. When required, the medium was supplemented
168 with antibiotics.

169

170 **Lipid extractions and quinone analysis.** Cultures (5 mL under ambient air and 13 mL under
171 anaerobic conditions) were cooled down on ice before centrifugation at 3200 g, 4°C, 10 min.
172 Cell pellets were washed in 1 mL ice-cold PBS and transferred to pre-weighted 1.5 mL
173 Eppendorf tubes. After centrifugation at 12000 g, 4°C, 1 min and elimination of supernatant,

174 the cell wet weight was determined (~5-30 mg) and pellets were stored at -20°C. Quinone
175 extraction from cell pellets was performed as previously described (Hajj Chehade, Loiseau et
176 al. 2013). Lipid extracts corresponding to 1 mg of cell wet weight were analyzed by HPLC
177 electrochemical detection-mass spectrometry (ECD-MS) with a BetaBasic-18 column at a
178 flow rate of 1 mL/min with mobile phases composed of methanol, ethanol, acetonitrile and a
179 mix of 90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), 0.1% TFA: mobile phase 1 (50%
180 methanol, 40% ethanol and 10% mix). When necessary, MS detection was performed on a
181 MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe
182 temperature 400°C, cone voltage 80V). Single ion monitoring (SIM) detected the following
183 compounds: UQ₈ (M+NH₄⁺), m/z 744-745, 6-10 min, scan time 0.2 s; UQ₉ (M+NH₄⁺), m/z
184 812-813, 9-14 min, scan time 0.2 s; UQ₁₀ (M+NH₄⁺), m/z 880.2-881.2, 10-17 min, scan time
185 0.2 s. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time of 0.3 s. ECD and
186 MS peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis of the recovery
187 of the UQ₁₀ internal standard and were then normalized to cell wet weight. The peak of UQ₈
188 and UQ₉ obtained with electrochemical detection was quantified with a standard curve of
189 UQ₁₀ as previously described (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013).

190

191 RESULTS

192 ***P. aeruginosa* has only one predominant quinone corresponding to UQ₉.**

193 The quinone content of *P. aeruginosa* PAO1, grown under ambient air or anaerobiosis
194 (denitrification), was determined using electrochemical detection of lipid extracts separated
195 by HPLC and compared to those obtained from *E. coli*. Whatever the conditions of growth, a
196 single quinone species eluting at 11.5 min was present in the analyses of *P. aeruginosa* lipid
197 extracts, UQ₁₀ being used as standard (Fig. 1A and 1B). Mass spectrometry analysis showed a
198 predominant ammonium adduct (M+NH₄⁺) with m/z ratio of 812.7 (Fig. 1C), together with
199 minor adducts such as Na⁺ (817.6) and H⁺ (795.7) (Fig. S1). These masses identify UQ₉ as the
200 quinone produced by *P. aeruginosa*. Membranes of *E. coli* contain UQ₈ and naphthoquinones
201 (DMK₈ and MK₈). The absence of detectable level of naphthoquinones in *P. aeruginosa* lipid
202 extracts (Fig. 1A and 1B) is in agreement with the lack of their biosynthetic pathways (MK or
203 futasine pathways) in *P. aeruginosa* genomes. It is also interesting to note that the UQ
204 content of *E. coli* was superior under aerobiosis compared to anaerobiosis (97±4 versus 42±6
205 pmol of UQ₈ per mg of wet weight), whereas we found the opposite for *P. aeruginosa* (95±4
206 versus 126±4 pmol of UQ₉ per mg of wet weight). Together, our results establish that UQ₉ is

207 the predominant quinone of *P. aeruginosa* PAO1 and suggest that UQ₉ is used under
208 denitrification conditions.

209

210 **Identification of *ubi* genes in the genome of *P. aeruginosa* PAO1.**

211 To identify the Ubi proteins of *P. aeruginosa*, IspB, UbiX, and UbiA to UbiK from *E. coli*
212 MG1655 were first screened for homologs in the *P. aeruginosa* PAO1 protein sequence data
213 set available at <http://www.pseudomonas.com/> using the BLASTP software. As listed in
214 Table S3, the analysis disclosed the presence of 11 homologous proteins (IspB, UbiA to UbiE,
215 UbiG to UbiJ and UbiX). As reported previously, the functional homolog of UbiF is a Coq7-
216 like hydroxylase (Stenmark, Grunler et al. 2001) and the corresponding PA0655 protein was
217 shown to be essential for aerobic UQ₉ biosynthesis (Jiang, Wang et al. 2019). Overall, we
218 propose that the O₂-dependent UQ biosynthetic pathways in *P. aeruginosa* and *E. coli* share a
219 similar pattern (Fig. S3).

220 Under anaerobiosis, *E. coli* synthesizes UQ and we recently identified three genes that we
221 called *ubiT*, *ubiV* and *ubiU*, as essential for this process (Pelosi, Vo et al. 2019). Homologues
222 of *ubiT*, *ubiV* and *ubiU* were also identified in *P. aeruginosa* PAO1 and corresponds to ORFs
223 PA3911, PA3912 and PA3913, respectively (Table S3 and Fig. S2). These genes were called
224 hereafter *ubiT_{Pa}*, *ubiV_{Pa}* and *ubiU_{Pa}*. Interestingly, the three genes are clustered together and
225 predicted to form an operon, *ubiUVT* (www.pseudomonas.com). They are located
226 downstream of the genes *moeA1*, *moaB1*, *moaE*, *moaD* and *moaC* involved in the
227 biosynthesis of the molybdopterin cofactor (MoCo) (Fig. S3). MoCo is essential for
228 denitrification via its requirement for nitrate reductase activity (Coelho and Romao 2015).
229 Next, we evaluated the metabolic relevance of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway
230 in *P. aeruginosa* by studying mutants of *ubiT_{Pa}*, *ubiU_{Pa}* and *ubiV_{Pa}* genes.

231

232 **Tn mutants of *ubiV_{Pa}* and *ubiU_{Pa}* present a growth defect for denitrification in 233 agreement with a UQ₉ content impairment.**

234 The physiological importance of the proteins UbiT_{Pa}, UbiU_{Pa} and UbiV_{Pa} was first
235 investigated using transposon (Tn) mutants PW7609 (*ubiT_{Pa}*), PW7610 (*ubiV_{Pa}*), PW7611
236 (*ubiV_{Pa}*), PW7612 (*ubiU_{Pa}*) and PW7613 (*ubiU_{Pa}*) and the isogenic parental strain MPAO1
237 (wild-type strain from the Manoil collection) as control (Table S1). Aerobic growth in LB
238 medium was similar between the Tn mutants and the wild-type strain MPAO1 (Fig. 2A) and
239 the mutants presented a UQ₉ comparable to the wild-type (Fig. 2B). Thus, UbiT_{Pa}, UbiU_{Pa} and
240 UbiV_{Pa} are not involved in the O₂-dependent UQ biosynthetic pathway of *P. aeruginosa*. On

241 the contrary, the growth of the *ubiV_{Pa}* and *ubiU_{Pa}* mutants was severely impaired in
242 denitrification conditions (Fig. 2C) and their UQ₉ content was strongly diminished (Fig. 2B).
243 These results suggest the overall requirement of *ubiU_{Pa}* and *ubiV_{Pa}* for denitrification in *P.*
244 *aeruginosa*, supposedly *via* their involvement in O₂-independent UQ biosynthesis.
245 Surprisingly, the growth of the *ubiT_{Pa}* Tn mutant PW7609 was not affected (Fig. 2C) and it
246 showed 60% UQ₉ compared to the wild-type (Fig. 2B) in anaerobic cultures. In this mutant,
247 the Tn is inserted at the fifth base of the *ubiT_{Pa}* gene, which may not be sufficient to
248 completely inactivate the gene expression (Table S1). We note that previous studies with *E.*
249 *coli ubi* mutants showed that only 20% UQ was sufficient to maintain a wild-type growth
250 phenotype (Hajj Chehade, Loiseau et al. 2013, Loiseau, Fyfe et al. 2017).

251

252 **Denitrification is dependent of *ubiT_{Pa}*, *ubiU_{Pa}* and *ubiV_{Pa}* genes *via* their involvement in**
253 **O₂-independent UQ biosynthesis.**

254 As *ubiT*, *ubiV* and *ubiU* are localized next to each other in the genome of PAO1, the
255 transposon inserted in the mutants previously studied might impact the expression of the
256 neighbouring genes. In addition, it is likely that the Tn mutant PW7609 is not disrupting
257 properly the *ubiT_{Pa}* gene. Thus, we constructed knockout (KO) of the three genes in the
258 parental strain PAO1 and tested their complementation by plasmid-borne genes. The three
259 mutants shared a growth defect under denitrification coupled to a strong decrease of UQ₉
260 content compared to the wild type (Fig. 3A and 3B), whereas UQ₉ content and growth were
261 normal in aerobic conditions (Fig. 3B and 3C). We then transformed the mutant strains with
262 an empty vector (pSW196) or the same vector carrying a wild-type allele of the corresponding
263 gene under the control of inducible *P_{BAD}* promoter. In complemented strains, bacterial growth
264 and UQ₉ levels were restored to the levels of the PAO1 strain used as control (Fig. 4A).

265 To confirm that UQ was directly involved in the restoration of the anaerobic growth of the
266 *ubiTUV*-KO strains, UQ₄ solubilized in methanol was added to the denitrification medium at
267 5 and 50 μM final concentrations. After 24h of anaerobic incubation, colony-forming units
268 per mL (CFU/mL) of each KO strain was estimated and compared to the same strain
269 cultivated without UQ₄. The most significant results were obtained with 50 μM of UQ₄, which
270 increased CFU of KO strains by 8-15 fold (Fig. 4B). We noted a substantial toxicity of
271 methanol on the wild-type strain (Fig. 4B, Ct lane), suggesting that the results obtained with
272 the KO strains after addition of UQ₄ are likely underestimated. Taken together, our results
273 show unequivocally that UbiT_{Pa}, UbiU_{Pa} or UbiV_{Pa} are needed for denitrification *via* their
274 involvement in UQ biosynthesis.

275

276 **UbiT_{Pa}, UbiU_{Pa} et UbiV_{Pa} are probably essential for the complete process of**
277 **denitrification.**

278 We used soft-agar experiments to examine dioxygen and nitrate requirements of *ubiT,U,V*-KO
279 strains with or without the wild-type allele. Soft agar was prepared anaerobically in LB
280 medium containing KNO₃ at 100 mM final concentration and then exposed to ambient air.
281 Oxygen diffuses through the agar to form a gradient, the highest concentration being at the
282 top of the agar (Fig. 4C, lane 1). As shown in Fig. 4C, parental strain PAO1 and
283 complemented *ubiTUV*-KO strains grew throughout the tube because they are able to use
284 aerobic respiration as well as denitrification. In contrast, *ubiT,U,V*-KO strains harboring the
285 empty vector were restricted to the oxygenated part of the medium, whereas the presence of
286 the respective genes on the plasmids allowed growth in the anaerobic medium (Fig. 4C). The
287 bubbles observed in the soft agar correspond to gas evolution of N₂O and/or N₂ (Zumft 1997),
288 suggesting a restoration of the denitrification process in an Ubi-proteins-dependent manner at
289 the level of the NO reductase and/or N₂O reductase. Taken together, these results point to the
290 requirement of *ubiT_{Pa}, ubiU_{Pa} and ubiV_{Pa}* beyond the nitrate reduction step and support that
291 UQ is probably essential for the entire denitrification process in *P. aeruginosa*.

292

293 **Molybdopterin cofactors are not involved in anaerobic UQ₉ biosynthesis.**

294 As mentioned previously, the *ubiUVT* gene cluster is located downstream of the genes *moaA1*,
295 *moaB1*, *moaE*, *moaD* and *moaC* involved in MoCo biosynthesis. Currently MoCo-containing
296 hydroxylases are the only family known to catalyze O₂-independent hydroxylation reactions
297 (Hille 2005). Since three O₂-independent hydroxylation reactions are needed to synthesize
298 UQ anaerobically (Pelosi, Vo et al. 2019), we reasoned that MoCo might be involved in this
299 process, providing a rationale for the co-localization of the *ubi* and *moa/moe* genes. To test
300 this hypothesis, we evaluated the ability of Tn mutants PW7614, PW7615/PW7616,
301 PW7618/PW2470, PW7619/PW1920 and PW7621/PW7622 (Table S1) corresponding
302 respectively to Tn insertions in the ORFs *moaA1*, *moaB1* (two mutants), *moaE* (two mutants),
303 *moaD* (two mutants) and *moaC* (two mutants) to synthesize UQ₉ without O₂ (Fig. 5). As
304 expected, all the Tn mutants exhibited a growth defect in denitrification, since MoCo are
305 essential components of the nitrate reductase (Coelho and Romao 2015). However, their
306 anaerobic growth was rescued by addition of arginine as previously described (Filiatrault,
307 Picardo et al. 2006) whereas the growth of *ubiUVT*-KO strains was not (data not shown). In
308 arginine-containing medium, the UQ₉ content of the MoCo Tn mutants was comparable to

309 that of the wild-type strain, suggesting that MoCo is not involved in anaerobic UQ₉
310 biosynthesis.

311

312 **UbiV_{Pa} is an air-sensitive redox [4Fe-4S] cluster-containing protein.**

313 To gain insights into its biochemical properties, we overexpressed and purified UbiV_{Pa} as
314 previously described in the study of Ubi proteins from *E. coli* (Pelosi, Vo et al. 2019). First,
315 we showed that UbiV_{Pa} behaved as a monomer (Fig S4A and S4B). Moreover, purified
316 solution of UbiV_{Pa} was slightly pink-colored and had a UV-visible absorption spectrum
317 showing a band at 410 nm with the presence of a broad and low intensity shoulders between
318 450 and 600 nm (Fig. 6A, dotted line), which is characteristic of the presence of iron-sulfur
319 species (Ollagnier de Choudens and Barras 2017). However, the amount of iron and sulfide
320 (0.22 iron and 0.22 sulfur/monomer) was largely substoichiometric suggesting a degradation
321 of the [Fe-S] cluster during the purification of the protein under aerobiosis, as already
322 observed for many other Fe-S proteins (Imlay 2006) and UbiV protein from *E. coli* (Pelosi,
323 Vo et al. 2019). Consistent with this hypothesis, anaerobic reconstitution of the [Fe-S] cluster
324 allowed to obtain a brown color protein with a UV-visible spectrum encompassing one broad
325 absorption band at 410 nm, which is characteristic of a [4Fe-4S]²⁺ cluster (Ollagnier-de
326 Choudens, Loiseau et al. 2005). The iron and sulfide determination yielded an UbiV_{Pa} protein
327 with 3.90 ± 0.03 iron and 3.40 ± 0.20 sulfur/monomer consistent with the presence of one
328 [4Fe-4S] cluster/protein.

329 Multiple-sequence alignment of UbiV proteins from representative proteobacteria was already
330 performed in our last study (Pelosi, Vo et al. 2019). We showed that UbiV_{Pa} contained four
331 strictly conserved cysteines (C39, C180, C193, and C197) arranged in a CX_nCX₁₂CX₃C
332 motif, X representing any amino acid. To confirm that these four cysteines are required for the
333 assembly of the [4Fe-4S] cluster present in UbiV_{Pa}, we generated two double mutants (C193A
334 C197A and C39A C180A). Both mutants were colorless and did not show any absorption
335 band in the 350- to -550-nm region of their UV-Vis spectra (Fig S5C), suggesting that they
336 were impaired in their capacity to accommodate a Fe-S cluster. After reconstitution, the Fe
337 and S contents and the absorbance at 410 nm were largely decreased (Fig. S5C, inset),
338 suggesting that these four cysteines coordinate the [4Fe-4S] cluster present in UbiV_{Pa}.

339

340 **UbiU_{Pa} co-purifies with UQ₈.**

341 UbiU_{Pa} was purified only in the presence of the detergent LDAO (see Material and methods
342 section). Indeed, without detergent, we found UbiU_{Pa} not soluble. Nevertheless, the

343 solubilized protein has still a tendency to form different oligomeric forms as shown in Fig.7A,
344 i.e. one high oligomeric form (UbiU_{Pa}1), two multimeric forms UbiU_{Pa}2 (~194 kDa) and
345 UbiU_{Pa}3 (~71 kDa). We have recently demonstrated that isoprenoid quinones were able to co-
346 elute with the Ubi-proteins (Hajj Chehade, Pelosi et al. 2019). First, we performed lipid
347 content analysis of the UbiV_{Pa} purified fraction to test its ability to trap isoprenoid quinones,
348 but nothing was detected. Lipid content analysis of the three forms of UbiU_{Pa} showed that the
349 high oligomeric one contains no isoprenoid quinones whereas one multimeric form (UbiU_{Pa}2)
350 contains a high content of UQ₈.

351 **A chimeric fusion Trx-UbiT_{Pa} containing a SCP2 domain binds lipid molecules**

352

353 **DISCUSSION**

354 UQ acts as a membrane-embedded electron and proton shuttle and is a key molecule for
355 bacteria to use respiratory metabolism for growth. Biosynthesis of UQ in aerobic conditions
356 have been widely studied and includes a series of enzymatic reactions in which a benzene ring
357 undergoes a series of modifications (prenylation, decarboxylation, methylation, and
358 hydroxylation). Our chemical analyses identified UQ₉ as the major quinone in the
359 cytoplasmic membranes of aerobically grown *P. aeruginosa*, which is in agreement with
360 the literature (Matsushita, Yamada et al. 1980, Jiang, Wang et al. 2019). We found in *P.*
361 *aeruginosa* clear homologues of the genes known to be involved in UQ biosynthesis, except
362 *ubiF* gene (Table S3). Indeed, as already published, *P. aeruginosa* exhibits a COQ7
363 homologue protein from yeast, which catalyzes the same reaction as UbiF from *E. coli*
364 (Stenmark, Grunler et al. 2001, Jiang, Wang et al. 2019). Thereby, both bacteria share a
365 similar UQ biosynthetic pathway involving three hydroxylases - UbiI, UbiH and UbiF or
366 COQ7 - using O₂ as a cosubstrate. As no other quinones were detected in its cytoplasmic
367 membrane, we suppose that UQ₉ is essential for aerobically grown *P. aeruginosa*.

368 In the absence of oxygen, *P. aeruginosa* can grow by dissimilatory nitrate respiration by using
369 N-oxydes as alternative terminal electron acceptors of the respiratory chain. This metabolic
370 process, known as denitrification, have been widely studied (Arai 2011). However, the
371 component acting to transfer electrons from primary dehydrogenases to N-oxides reductases
372 was not clearly identified to date (Arai 2011). In the present study, we identified UQ₉ as the
373 major quinone synthesized in anaerobic conditions, suggesting that *P. aeruginosa* and *E. coli*
374 share also a O₂-independent UQ biosynthetic pathway. Indeed, we recently identified in *E.*
375 *coli* the pathway to synthesize UQ under anaerobic conditions allowing UQ biosynthesis over
376 the entire O₂ range (Pelosi, Vo et al. 2019). In this work, we characterized the three genes

377 *ubiT*, *ubiU* and *ubiV* as essential for the anaerobic UQ biosynthesis pathway and dispensable
378 for the aerobic one. However, *E. coli* grow normally in anaerobiosis in a UQ-independent
379 manner due to probably the presence of naphthoquinones (Pelosi, Vo et al. 2019). In *E. coli*,
380 the function of UbiT still remains unclear and UbiU and UbiV are thought to participate to the
381 hydroxylation reactions catalyzed under anaerobiosis instead of UbiF, UbiI and UbiH, which
382 are dependent upon O₂ for function (Pelosi, Vo et al. 2019). In the present study, we identified
383 in *P. aeruginosa* PAO1 homologues of the genes *ubiT*, *ubiU* and *ubiV*. They correspond to
384 ORFs PA3911, PA3913 and PA3912, respectively. Our results shown that these genes were
385 involved in biosynthesis of UQ₉ only in anaerobiosis. They are also essential to anaerobic
386 denitrification metabolism of *P. aeruginosa*, which is in agreement with a single quinone
387 organism, in this case UQ. Our conclusion explains some results obtained in the literature few
388 years ago. Indeed, ORFs PA3912 to PA3913 are expressed in response to anaerobiosis
389 conditions (Filiatrault, Wagner et al. 2005) and abundance of PA3913 was increased during
390 anaerobic growth (Wu, Guina et al. 2005). Moreover, using random transposon mutagenesis,
391 ORFs PA3912 and PA3913 have been identified as essential for anaerobic growth of *P.*
392 *aeruginosa* on nitrate, nitrite and arginine (Filiatrault, Picardo et al. 2006).

393 Although his contribution is still poorly understood in the presence of the host, anaerobic
394 respiration of *P. aeruginosa* is significantly likely to be identified to promote virulence
395 mechanisms in the chronic lung infection (Jensen, Kolpen et al. 2017). Indeed, according to
396 O₂ assays directly in the lungs of CF patients, the infected endobronchial mucus of patients is
397 subject to severe hypoxia or even anoxia (Worlitzsch, Tarran et al. 2002). Two hypotheses
398 have been proposed to explain this phenomenon in the literature. First, it may be due to the
399 biofilm structure per se via the establishment of an oxygen gradient across. Nevertheless, this
400 hypothesis is more and more questioned due to the strong morphological differences between
401 *in vivo* and *in vitro* biofilm production, the last being much more deeper than the first, for
402 example (Jensen, Kolpen et al. 2017). The second hypothesis more privileged is that
403 accelerated O₂ consumption in the biofilm may be more due to activated polymorphonuclear
404 leukocytes to produce superoxide (Kolpen, Hansen et al. 2010) and to a lesser extend nitric
405 oxide (Kolpen, Bjarnsholt et al. 2014). Additional host responses also affect the availability of
406 alternative electron acceptors for anaerobic bacterial metabolism. For example, high level of
407 nitrate and nitrite have been measured in CF sputum of patients (Linnane, Keatings et al.
408 1998). From all these observations and as UQ is an essential component acting to transfer
409 electrons from primary dehydrogenases to reductases in *P. aeruginosa* in anaerobic
410 conditions, we propose that UbiT, UbiV and UbiU may contribute to the CF lung infection.

411 Indeed, this hypothesis is strengthened by two results in the literature all obtained under
412 conditions of the CF lung. ORFs PA3912 to PA3913 are overexpressed in response to a
413 strong decrease of oxygen (Alvarez-Ortega and Harwood 2007) and a recent quantitative
414 proteomics approach reveals increased abundance of proteins PA3911 to PA3913 in anaerobic
415 biofilm (Groenewold, Massmig et al. 2018). Finally, *P. aeruginosa* strain PA14 encompassing
416 Tn-insertions into *ubiA*, *ubiB*, *ubiC*, *ubiE* or *ubiT* genes were unable to colonize the murine
417 gastrointestinal tract (Skurnik, Roux et al. 2013). O₂-dependent and O₂-independent UQ
418 biosynthetic pathways share the proteins UbiA, UbiB, UbiC and UbiE. (Pelosi, Vo et al.
419 2019). These results are not surprising since *ubiA*, *ubiB* and *ubiE* genes have been define to
420 be essential to *P. aeruginosa* growth . However, UbiT is only required under anaerobic
421 conditions, which suggests that ubiquinone biosynthesis may be essential Work is in progress
422 in our laboratory to support this hypothesis.

423 **ACKNOWLEDGEMENTS**

424 This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), ANR Blanc
425 (An)aeroUbi ANR-15-CE11-0001-02, the University Grenoble Alpes (UGA), the French
426 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Commissariat à l'Energie
427 Atomique et aux Energies Alternatives (CEA)

428

429 **COMPETING INTERESTS**

430 The authors declare that they have no competing interests.

431

432 **LEGENDS**

433 **Figure 1: UQ₉ is the predominant quinone used by *P. aeruginosa* in aerobic and**
434 **anaerobic conditions.** HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg amounts of cells after
435 growth of *E. coli* MG1655 (*E. c.*) and *P. aeruginosa* PAO1 (*P. a.*) aerobically in LB medium
436 **(A)** or anaerobically in LB medium supplemented with 100mM nitrate **(B)**. The
437 chromatograms are representative of three independent experiments. The peaks corresponding
438 to UQ₈, UQ₉, demethylmenaquinone (DMK₈), menaquinone (MK₈) and the UQ₁₀ standard are
439 indicated. **(C)**, Mass spectrum of the quinone eluting at 11.5 min from *P. aeruginosa* in
440 aerobic and anaerobic cultures.

441

442 **Figure 2: UQ₉ content was impaired in the Tn mutants of *ubiU*_{Pa}, *ubiV*_{Pa} and *ubiT*_{Pa}**
443 **under denitrification.** Representative growth curves of wild-type MPAO1 and Tn mutants
444 grown aerobically in LB medium **(A)** or anaerobically in denitrification medium **(C)**. Data are

445 representative of three independent experiments. **(B)**, quantification of cellular UQ₉ content in
446 lipid extracts from wild-type MPAO1 and Tn mutants cells growing aerobically in LB
447 medium (white bars) or anaerobically in denitrification medium (grey bars). Error bars are
448 means ± S.D. (*n*=3).

449

450 **Figure 3: *ubiU_{Pa}*, *ubiV_{Pa}* and *ubiT_{Pa}* are essential for anaerobic UQ₉ biosynthesis and for**
451 **denitrification.** Representative growth curves of wild-type PAO1 and knockout (KO) for the
452 genes *ubiU_{Pa}*, *ubiV_{Pa}* and *ubiT_{Pa}* grown **(A)** in denitrification medium or **(C)** aerobically in LB
453 medium. **(B)**, quantification of cellular UQ₉ content (*n*=3) in lipid extracts from wild-type
454 PAO1 and KO cells growing aerobically in LB medium (white bars) or in denitrification
455 medium (grey bars). Error bars are S.D.

456

457 **Figure 4: Expression of UbiU_{Pa}, UbiV_{Pa} and UbiT_{Pa} in corresponding KO strains**
458 **restores bacterial growth over the entire O₂ range in a UQ-dependent manner.** **(A)**,
459 Photographs of culture tubes after overnight growth under anaerobic conditions in
460 denitrification medium of *ΔubiTUV* strains transformed with the empty vector pSW196 or the
461 same vector carrying the corresponding wild-type allele (*pubiT*, *pubiU* and *pubiV*). The
462 parental strain PAO1 was used as a control and ubiquinone content of wild-type and *Δubi*
463 strains cultured anaerobically (*n*=3) was assayed. **(B)**, *ΔubiUVT* strains were cultured in
464 denitrification medium supplemented with methanol-solubilized UQ₄ at 5 or 50 μM final
465 concentration. After 24h of incubation, colony-forming units per mL (CFU/mL) of each KO
466 strain was estimated and compared to the same strain growing without UQ₄. As a control,
467 toxicity of methanol was tested on the parental strain growing in the same media but
468 supplemented with 4.5% (v/v) methanol (Ct), which is the final concentration of methanol
469 corresponding to 50 μM of UQ₄. **(C)**, as in **(A)** but in soft-agar tubes after overnight culture.
470 All the strains studied were inoculated into anaerobic tubes and then exposed to ambient air to
471 create an oxygen gradient. The controls (Ct) correspond to soft agar tubes supplemented with
472 2.5 μg/mL resazurin and then incubated with (1) or without air (2). Oxic and anoxic parts of
473 the agar are indicated. For all strains containing pSW196 vectors, denitrification medium was
474 also supplemented with 0.1% (w/v) final concentration of arabinose to induce *P_{BAD}* promoter.

475

476 **Figure 5: Molybdopterin cofactors are not involved in anaerobic biosynthesis of UQ₉ in**
477 ***P. aeruginosa*.** Quantification of cellular UQ₉ content (*n*=3) in lipid extracts from wild-type

478 MPAO1 and Tn mutants cells (see Table S1) grown overnight anaerobically in LB medium
479 supplemented with arginine. Error bars are means \pm S.D. Anaerobic growth of wild-type and
480 Tn mutants was assessed in denitrification medium or in LB supplemented with arginine (40
481 mM final concentration) after 48h of incubation. (+), growth; (-) no growth.

482

483 **Figure 6: UbiVPA binds a [4Fe-4S] cluster.** (A) UV-visible absorption spectra of as-
484 purified UbiVPA (dotted line, 32.6 μ M) and reconstituted holo-UbiV (solid line, 22.7 μ M) in
485 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl, 15% glycerol, 1mM DTT; Inset: enlargement of the
486 300-700 nm region. (B) Comparative UV-visible absorption spectra of wild-type and different
487 Cys-to-Ala mutants of UbiVPA after metal cluster reconstitution. Proteins were in 50 mM
488 Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM NaCl, 15% glycerol, 1m M DTT , with the following
489 concentrations: 22.7 μ M WT, X μ M C193A C197A.

490

491 **Figure 7:** (A) Gel filtration chromatogram of aerobically purified UbiUPA on a Superdex 200
492 16/60 column. Insets show Coomassie-staining SDS-PAGE of aerobically purified UbiUPA
493 (1, Ni²⁺; UbiUPA1; 2, UbiUPA2; 3, UbiUPA3). (B) Calibration curve, standard proteins in
494 rhombi, UbiUPA in circle. (C) HPLC-ECD chromatogram of the various purification fractions
495 (Ni-NTA and Superdex 200) of UbiUPA. The fraction F17 corresponds to the peak UbiUPA1,
496 the fraction F37 corresponds to the peak UbiUPA2, the fraction F48 corresponds to the peak
497 UbiUPA3 and the fractions F2 and F68 correspond to the fractions of the beginning and the
498 end (buffer control)

499

500 **Figure 8:** Gel filtration chromatogram of aerobically purified Trx-UbiTPA on a Superdex 200
501 10/300 column. Insets show Coomassie-staining SDS-PAGE of aerobically purified Trx-
502 UbiTPA and calibration curve, standard proteins in rhombi, Trx-UbiTPA in circle.

503

504 **Figure S1:** Mass spectrum of UQ₉ obtained by HPLC-MS analysis from 740 to 840 m/z of
505 lipid extracts from cells grown anaerobically. H⁺, NH₄⁺ and Na⁺ adducts corresponding to
506 UQ₉ were indicated.

507

508 **Figure S2: Putative UQ₉ biosynthetic pathways in *E. coli* MG1655 and in *P. aeruginosa***
509 **PAO1.** Proteins common to both biosynthetic pathways (aerobic and anaerobic) are indicated
510 in black. Proteins involved only in aerobiosis or in anaerobiosis are indicated in red or in blue,
511 respectively. The function of UbiU and UbiV remains debated. Corresponding gene ID in *P.*

512 *aeruginosa* are indicated in parenthesis. UbiF is only identified in *E. coli* and its functional
513 homolog in *P. aeruginosa* is a Coq7-like hydroxylase.

514

515 **Figure S3: Genomic localization of the *ubiUVT* genes from *P. aeruginosa* PAO1.** ORFs of
516 *ubiT_{Pa}*, *ubiU_{Pa}* and *ubiV_{Pa}* genes are represented by green, blue and orange arrow,
517 respectively.

518

519 REFERENCES

520

- 521 Alexander, K. and I. G. Young (1978). "Alternative hydroxylases for the aerobic and
522 anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*." *Biochemistry* **17**(22): 4750-4755.
- 523 Arai, H. (2011). "Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory
524 Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*." *Front Microbiol* **2**: 103.
- 525 Aussel, L., L. Loiseau, M. Hajj Chehade, B. Pocachard, M. Fontecave, F. Pierrel and F.
526 Barras (2014). "ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage,
527 is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar
528 Typhimurium." *J Bacteriol* **196**(1): 70-79.
- 529 Borrero-de Acuna, J. M., K. N. Timmis, M. Jahn and D. Jahn (2017). "Protein complex
530 formation during denitrification by *Pseudomonas aeruginosa*." *Microb Biotechnol* **10**(6):
531 1523-1534.
- 532 Coelho, C. and M. J. Romao (2015). "Structural and mechanistic insights on nitrate
533 reductases." *Protein Sci* **24**(12): 1901-1911.
- 534 Crull, M. R., R. Somayaji, K. J. Ramos, E. Caldwell, N. Mayer-Hamblett, M. L. Aitken, D. P.
535 Nichols, A. Rowhani-Rahbar and C. H. Goss (2018). "Changing Rates of Chronic
536 *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis: A Population-Based Cohort Study." *Clin Infect Dis* **67**(7): 1089-1095.
- 537 Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of
538 plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A*
539 **76**(4): 1648-1652.
- 540 Filiatrault, M. J., K. F. Picardo, H. Ngai, L. Passador and B. H. Iglewski (2006).
541 "Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic
542 growth." *Infect Immun* **74**(7): 4237-4245.
- 543 Hajj Chehade, M., L. Loiseau, M. Lombard, L. Pecqueur, A. Ismail, M. Smadja, B. Golinelli-
544 Pimpaneau, C. Mellot-Draznieks, O. Hamelin, L. Aussel, S. Kieffer-Jaquinod, N. Labessan, F.
545 Barras, M. Fontecave and F. Pierrel (2013). "ubiL, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q
546 biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation." *J Biol Chem* **288**(27): 20085-20092.
- 547 Hajj Chehade, M., L. Pelosi, C. D. Fyfe, L. Loiseau, B. Rascalou, S. Brugiere, K.
548 Kazemzadeh, C. D. Vo, L. Ciccone, L. Aussel, Y. Coute, M. Fontecave, F. Barras, M.
549 Lombard and F. Pierrel (2019). "A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid
550 Ubiquinone." *Cell Chem Biol* **26**(4): 482-492 e487.
- 551 Hassett, D. J. (1996). "Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate
552 restricts diffusion of oxygen." *J Bacteriol* **178**(24): 7322-7325.
- 553 Held, K., E. Ramage, M. Jacobs, L. Gallagher and C. Manoil (2012). "Sequence-verified two-
554 allele transposon mutant library for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Bacteriol* **194**(23):
555 6387-6389.
- 556 Hille, R. (2005). "Molybdenum-containing hydroxylases." *Arch Biochem Biophys* **433**(1):
557 107-116.
- 558

559 Imlay, J. A. (2006). "Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen." Mol Microbiol
560 **59**(4): 1073-1082.

561 Jacobs, M. A., A. Alwood, I. Thaipisuttikul, D. Spencer, E. Haugen, S. Ernst, O. Will, R.
562 Kaul, C. Raymond, R. Levy, L. Chun-Rong, D. Guenther, D. Bovee, M. V. Olson and C.
563 Manoil (2003). "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc
564 Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14339-14344.

565 Jensen, P. O., M. Kolpen, K. N. Kragh and M. Kuhl (2017). "Microenvironmental
566 characteristics and physiology of biofilms in chronic infections of CF patients are strongly
567 affected by the host immune response." APMIS **125**(4): 276-288.

568 Jeong, J. Y., H. S. Yim, J. Y. Ryu, H. S. Lee, J. H. Lee, D. S. Seen and S. G. Kang (2012).
569 "One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method
570 for functional genomics studies." Appl Environ Microbiol **78**(15): 5440-5443.

571 Jiang, H. X., J. Wang, L. Zhou, Z. J. Jin, X. Q. Cao, H. Liu, H. F. Chen and Y. W. He (2019).
572 "Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide Shenqinmycin-producing *Pseudomonas*
573 *aeruginosa* strain M18." J Ind Microbiol Biotechnol.

574 Loiseau, L., C. Fyfe, L. Aussel, M. Hajj Chehade, S. B. Hernandez, B. Faivre, D. Hamdane,
575 C. Mellot-Draznieks, B. Rascalou, L. Pelosi, C. Velours, D. Cornu, M. Lombard, J.
576 Casadesu, F. Pierrel, M. Fontecave and F. Barras (2017). "The UbiK protein is an accessory
577 factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ
578 biogenesis factor UbiJ." J Biol Chem **292**(28): 11937-11950.

579 Magill, S. S., J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati, M. A. Kainer, R.
580 Lynfield, M. Maloney, L. McAllister-Hollod, J. Nadle, S. M. Ray, D. L. Thompson, L. E.
581 Wilson, S. K. Fridkin, I. Emerging Infections Program Healthcare-Associated and T.
582 Antimicrobial Use Prevalence Survey (2014). "Multistate point-prevalence survey of health
583 care-associated infections." N Engl J Med **370**(13): 1198-1208.

584 Matsushita, K., M. Yamada, E. Shinagawa, O. Adachi and M. Ameyama (1980). "Function of
585 ubiquinone in the electron transport system of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically." J
586 Biochem **88**(3): 757-764.

587 Nowicka, B. and J. Kruk (2010). "Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid
588 quinones." Biochim Biophys Acta **1797**(9): 1587-1605.

589 Ollagnier-de Choudens, S., L. Loiseau, Y. Sanakis, F. Barras and M. Fontecave (2005).
590 "Quinolate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis." FEBS Lett **579**(17):
591 3737-3743.

592 Ollagnier de Choudens, S. and F. Barras (2017). "Genetic, Biochemical, and Biophysical
593 Methods for Studying FeS Proteins and Their Assembly." Methods Enzymol **595**: 1-32.

594 Page, A. C., Jr., P. Gale, H. Wallick, R. B. Walton, D. L. Mc, H. B. Woodruff and K. Folkers
595 (1960). "Coenzyme Q. 17. Isolation of coenzyme Q10 from bacterial fermentation." Arch
596 Biochem Biophys **89**: 318-321.

597 Pelosi, L., C. D. Vo, S. S. Abby, L. Loiseau, B. Rascalou, M. Hajj Chehade, B. Faivre, M.
598 Gousse, C. Chenal, N. Touati, L. Binet, D. Cornu, C. D. Fyfe, M. Fontecave, F. Barras, M.
599 Lombard and F. Pierrel (2019). "Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range:
600 Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway." MBio **10**(4).

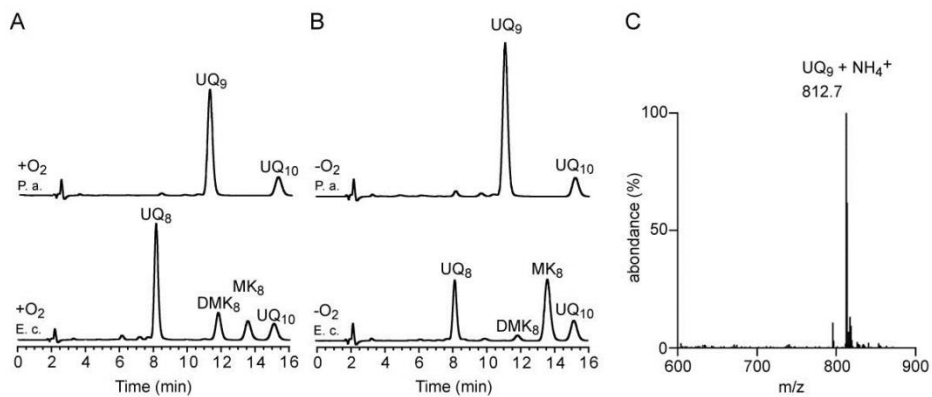
601 Sharma, P., M. J. Teixeira de Mattos, K. J. Hellingwerf and M. Bekker (2012). "On the
602 function of the various quinone species in *Escherichia coli*." FEBS J **279**(18): 3364-3373.

603 Stenmark, P., J. Grunler, J. Mattsson, P. J. Sindelar, P. Nordlund and D. A. Berthold (2001).
604 "A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-
605 bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis." J Biol Chem **276**(36): 33297-33300.

606 Torres, A., N. Kasturiarachi, M. DuPont, V. S. Cooper, J. Bomberger and A. Zemke (2019).
607 "NADH Dehydrogenases in *Pseudomonas aeruginosa* Growth and Virulence." Front
608 Microbiol **10**: 75.

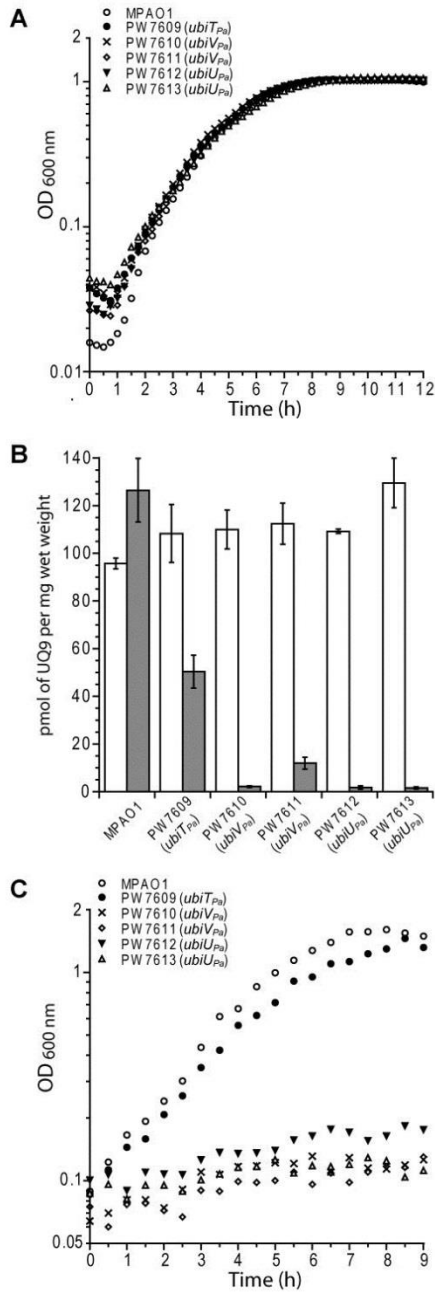
609 Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks and B. H. Iglewski (2003). "Microarray
610 analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and
611 environment." J Bacteriol **185**(7): 2080-2095.
612 Williams, H. D., J. E. Zlosnik and B. Ryall (2007). "Oxygen, cyanide and energy generation
613 in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." Adv Microb Physiol **52**: 1-71.
614 Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol
615 Biol Rev **61**(4): 533-616.
616
617
618

Figure 1



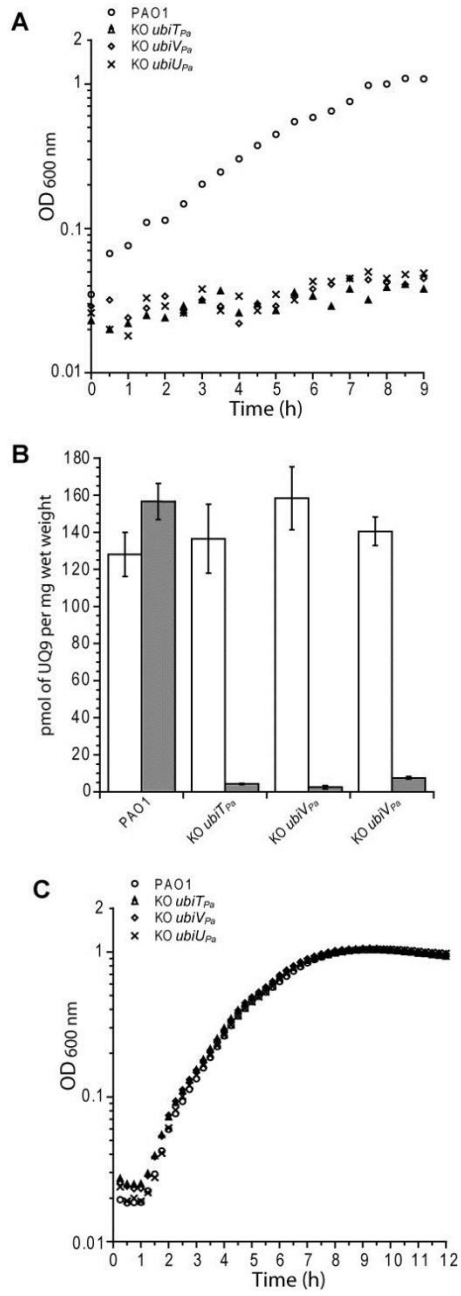
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640

Figure 2



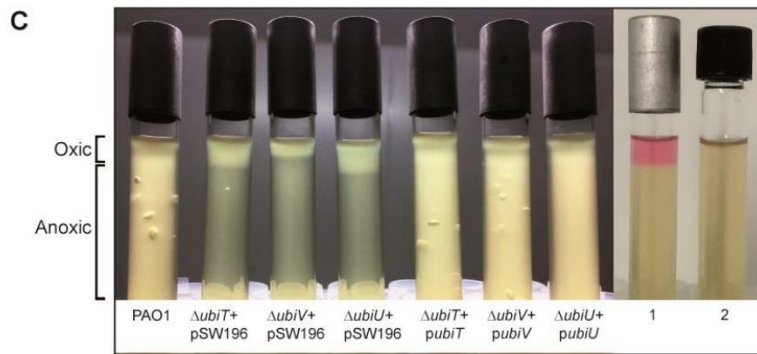
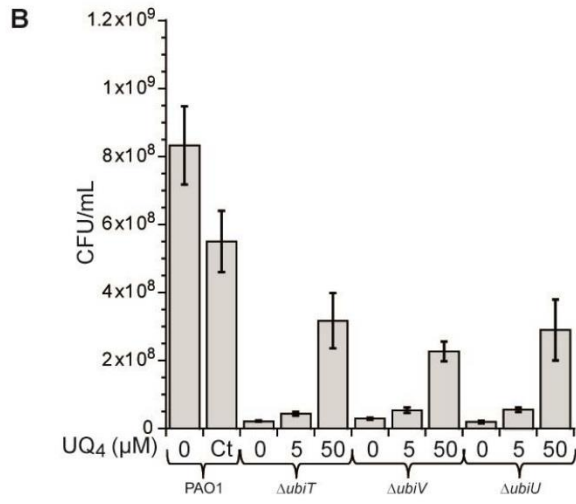
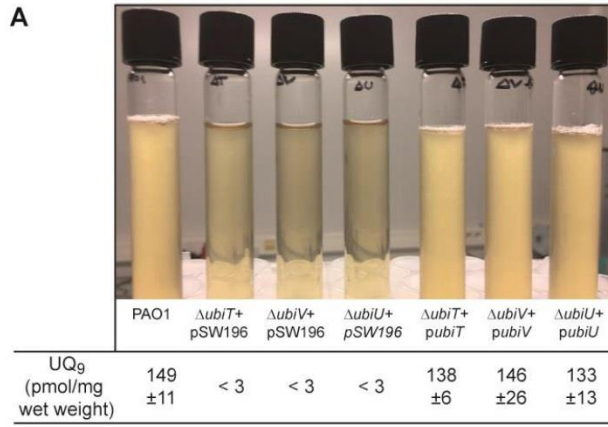
641

Figure 3



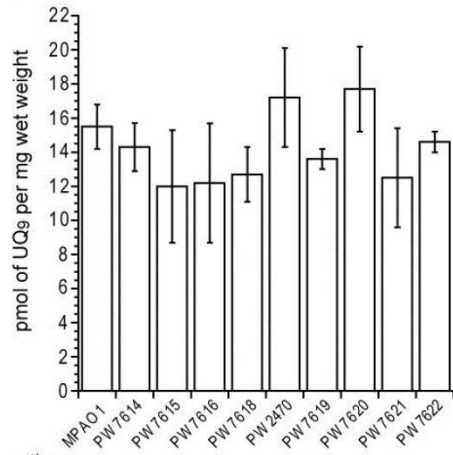
20

Figure 4



642

Figure 5

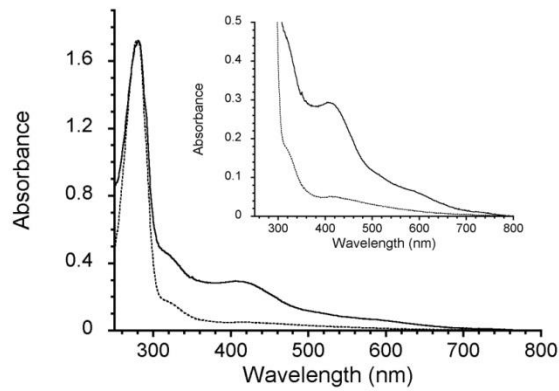


Growth on:	
KNO ₃	+ - - - - - - - -
Arginine	+ + + + + + + + +

643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672

Figure 6

A



673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692

B

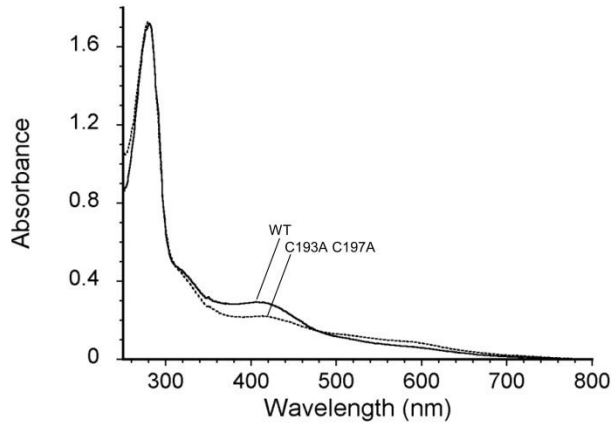
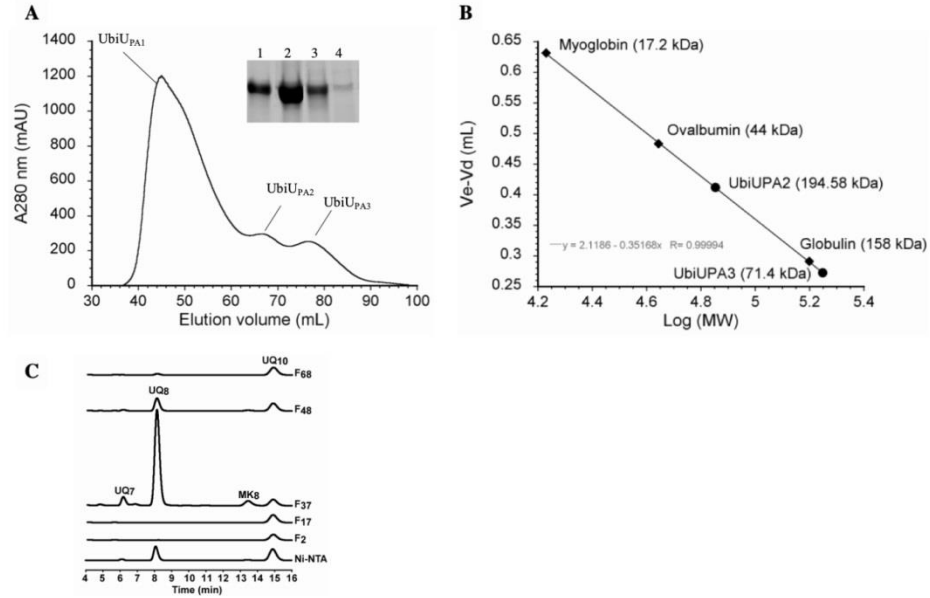
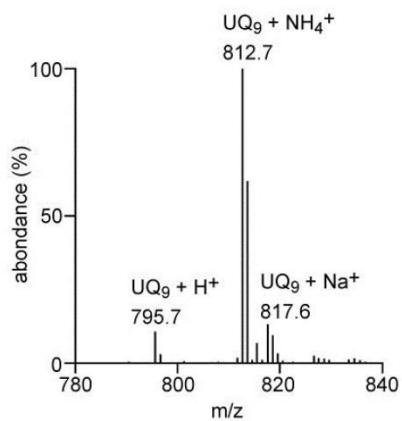


Figure 7



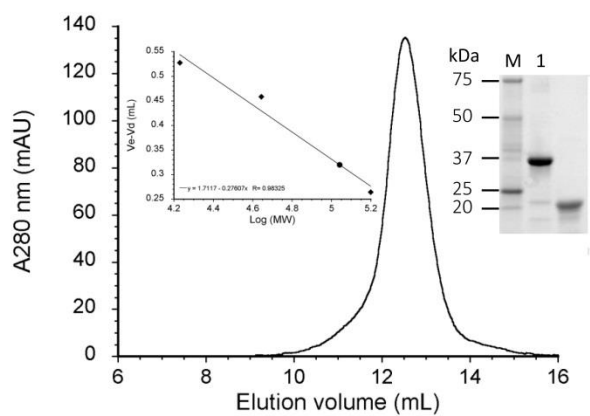
693

Figure S1



694
695
696
697
698
699

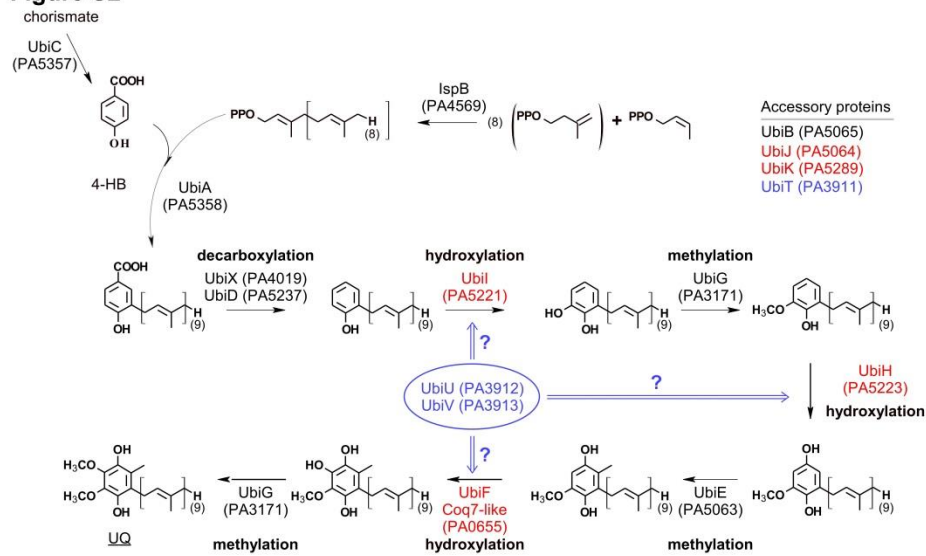
Figure 8



700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723

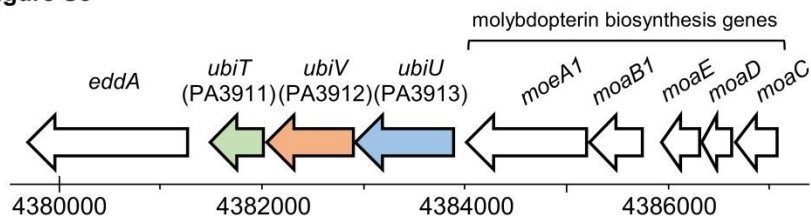
724
725
726
727
728

Figure S2



729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746

Figure S3



Chapitre VI
Etude biochimique de RlhA et
TrhP, deux autres protéines de la
famille U32 d'*Escherichia coli*

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation biochimique de RlhA et de TrhP, deux protéines qui sont impliquées dans la modification des ARNs chez *E. coli*. Bien que ces deux protéines ne fassent pas partie de mon sujet de thèse, elles présentaient de fortes similitudes de séquence et donc probablement de rôle biologique, et peut-être de mécanisme, avec les protéines UbiU et UbiV.

L'ARN est constitué majoritairement de quatre ribonucléotides différents (adénosine (AMP), guanosine (GMP), cytidine (CMP), et uridine (UMP) mono phosphates), mais un ensemble de plus de 160 modifications chimiques décore les molécules d'ARN pour leur permettre d'assurer leurs diverses fonctions de codage, de structure, de catalyse et de régulation (Hofer and Jaschke 2018). La localisation, l'abondance et la distribution de divers types de modifications de l'ARN dépendent de l'organisme ainsi que des conditions environnementales. De nombreux nucléosides modifiés sont conservés dans les bactéries, les archées et les eucaryotes, alors que certains sont particuliers à chaque branche de la vie (Clark, Choudhary et al. 2013). La plupart des modifications connues se produisent au niveau des positions internes, alors que la diversité aux extrémités est limitée (Helm and Alfonzo 2014).

Récemment, chez *E. coli*, il a été montré par une équipe japonaise que la protéine RlhA était responsable de l'hydroxylation de la cytidine de position 2501 (ho^5C2501) de l'ARNr 23S (Kimura, Sakai et al. 2017) ; et très récemment, la même équipe japonaise a montré que la protéine TrhP était impliquée dans l'hydroxylation de l'uridine de position 34 de l'ARNt (ho^5U34) (Sakai, Kimura et al. 2019), ce qui est la première étape pour la formation de la cmo^5U34 et $mcmo^5U34$. Quelques résidus conservés que possèdent les deux protéines sont importants pour leur activité notamment les motifs de quatre cystéines converties. De plus, l'activité de RlhA dépend directement de la biosynthèse des centres Fe-S et de la concentration intracellulaire en fer (Kimura, Sakai et al. 2017).

Dans les deux cas, les réactions d'hydroxylation catalysées par RlhA et TrhP semblent dépendre du préphénate, un métabolite formé par la chorismate mutase à l'issue de la voie du shikimate en vue de la biosynthèse de deux acides aminés aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine) à partir du chorismate chez les bactéries, les mycètes et les plantes (Kanehisa, Goto et al. 2014). La caractérisation biochimique de RlhA et de TrhP sera présentée dans ce chapitre, confirmant notre hypothèse qu'elles sont bien des protéines Fe-S, elles aussi impliquées dans des réactions d'hydroxylation, comme c'est le cas d'UbiU et d'UbiV.

II. Résultats

II.1 Purification et caractérisation biochimique d'RlhA

Tout d'abord, les tests d'expression du plasmide pET22-RlhA codant pour RlhA avec une étiquette de six histidines à son extrémité C-ter ont été effectués dans les cellules BL21(DE3). Cependant RlhA n'est pas exprimée dans n'importe quelle condition (données non montrées). La protéine est uniquement exprimée dans les cellules BL21 Star (DE3). Les cellules transformées par le plasmide pET22-RlhA sont cultivées dans le milieu LB à 37 °C. A une DO de 1.8, les cultures sont refroidies et le gène est induit par 500 µM d'IPTG sur la nuit à 16 °C. Les cellules sont lysées par sonication dans un tampon contenant 50 mM sodium de phosphate pH 8 / 500 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT et le lysat est clarifié par ultracentrifugation. Le surnageant est ensuite chargé sur une colonne d'affinité Ni²⁺.

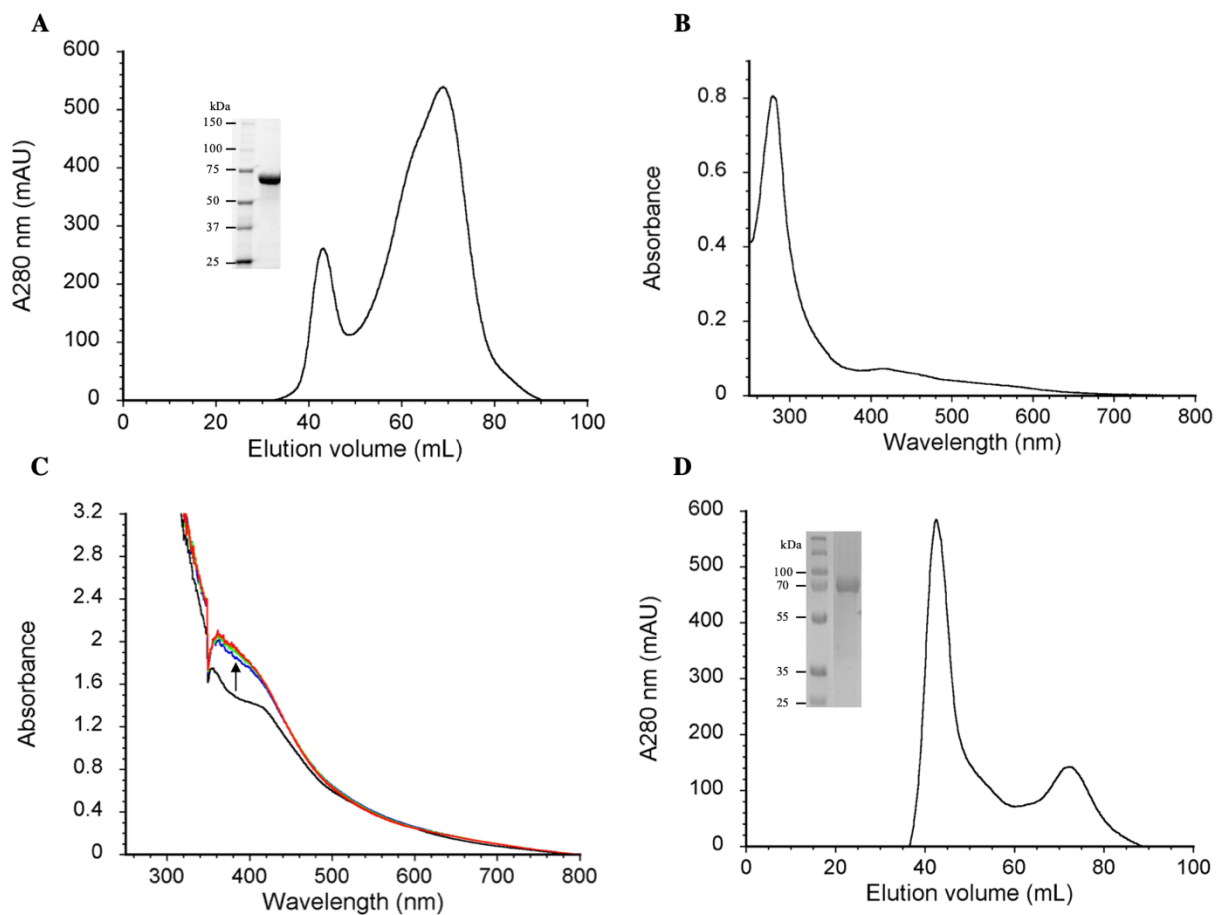


Figure 77. Purification et caractérisation biochimique de RlhA d'*E.coli*. (A) Chromatogramme de filtration sur gel de la protéine RlhA_{6His} purifiée en aérobie sur une colonne Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie de RlhA_{6His} purifié en aérobie correspondant à la protéine dimérique. (B) Spectre d'absorption UV-vis de RlhA-6His purifié en aérobie (7.6 µM). (C) Spectre d'absorption UV-vis de RlhA-6His au cours de la réaction de reconstitution du centre Fe-S en anaérobie. Chromatogramme de filtration sur gel de RlhA-6His purifié en aérobie sur une colonne Superdex 200 16/600 (GE Healthcare). (D) Chromatogramme de filtration sur gel de _{6His}RlhA purifié en aérobie sur une colonne Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). L'insertion montre un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie de _{6His}RlhA purifié en aérobie correspondant à la protéine monomérique.

Une partie importante de de RlhA-6His ne s'accroche pas à cette colonne de Ni₂₊, mais une partie s'accroche et est éluée, concentrée et chargée sur une colonne de filtration sur gel pré-équilibrée avec du tampon contenant 50 mM sodium de phosphate pH 8 / 150 mM NaCl / 15% glycérol / 1 mM DTT. La protéine purifiée est pure et se comporte comme un mélange de tétramère et dimère en solution (Fig. 77A). RlhA-6His purifiée est légèrement rose, et son spectre UV-vis, avec l'absorbance dans la région 350 à 550 nm, indique la présence du centre Fe-S (Fig. 77B). Nous avons ensuite essayé de reconstituer le centre Fe-S de RlhA en anaérobie. La réaction de reconstitution semble avoir lieu mais en faible proportion d'après les spectres d'absorption UV-vis enregistrés (Fig. 77C), et surtout une partie importante de la protéine précipite en cours de réaction.

Comme le rendement de la purification de RlhA-6His est faible en raison de la perte de la protéine à l'étape de purification par la colonne Ni²⁺, nous avons donc essayé de la purifier par précipitation au sulfate d'ammonium (données non montrées). En effet, la totalité de RlhA est totalement précipitée en présence de 30% du sulfate d'ammonium. Le culot contenant la protéine est resuspendu dans le tampon de lyse puis chargé sur la colonne de filtration sur gel, cependant elle se trouve totalement dans le volume mort de la colonne, vraisemblablement donc sous forme de protéines agrégées ou mal repliées (données non montrées).

Nous avons donc ensuite décidé de construire le plasmide pET15-RlhA qui code pour RlhA avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-ter. La protéine 6His-RlhA est exprimée dans les cellules BL21 Star (DE3) et purifiée par deux étapes de purification (Ni²⁺ et filtration sur gel) (Fig. 77D). Bien que la plupart de 6His-RlhA purifiée se trouve dans le volume mort de la colonne, une minorité correspondant à la forme monomérique de la protéine est soluble (Fig. 77D). La protéine purifiée, encore une fois, est légèrement rose et son spectre UV-vis indique la présence du centre Fe-S (données non montrées). Les travaux concernant la reconstitution du centre Fe-S en anaérobie sont actuellement en cours.

Nous avons construit en parallèle le plasmide pET32-RlhA codant pour RlhA fusionné à la thiorédoxine à l'extrémité N-ter et nous sommes en train d'optimiser le protocole de purification d'RlhA. Ces résultats, bien qu'encore incomplets, semblent confirmer que RlhA est bien une protéine à Fe-S.

RlhA possède quatre cystéines conservées C169, C176, C192 et C196 formant un motif C-X₆-C-X₁₅-C-X₃-C (Fig. 78A). Ces quatre cystéines conservées pourraient servir comme ligands du centre [4Fe-4S]. Une fois que le protocole de purification sera établi, les mutants cystéine en alanine pourront être générés afin de confirmer cette hypothèse.

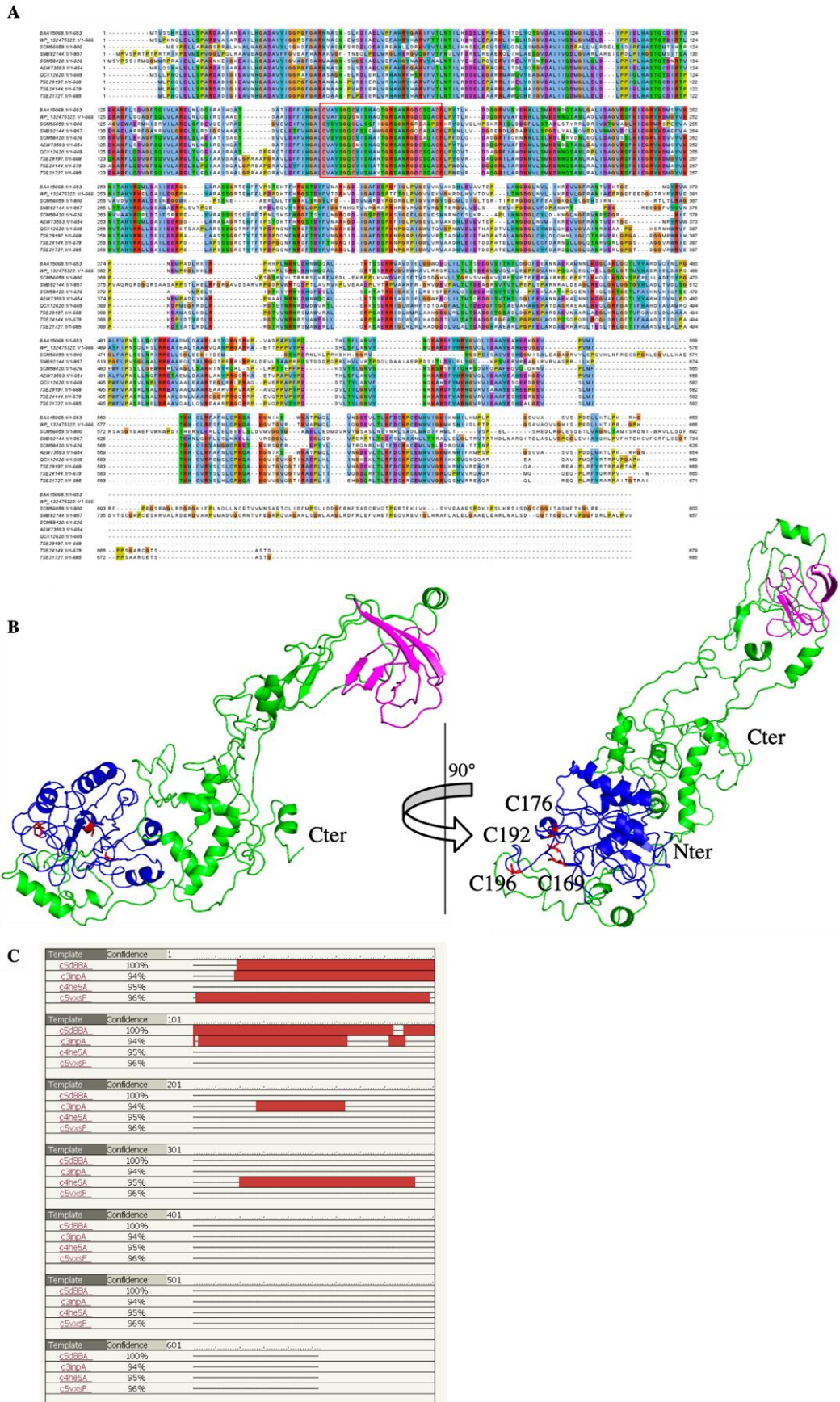


Figure 78. Analyses informatiques d'RlhA. (A) Alignement multiple de séquences de divers représentants de RlhA de protéobactéries (*Escherichia coli*, BAA15068.1 ; *Pseudomonas aeruginosa*, WP_132475322.1 ; *Methanothermobacter wolfeii*, SCM56059.1 ; *Deinococcus hopiensis* ; SMB92144.1 ; *Enterobacter ludwigii*, AEW73593.1 ; *Acidovorax citrulli*,

QCX12620.1 ; *Tepidimonas thermarum*, TSE29197.1 ; *Tepidimonas ignava*, TSE24144.1 ; *Tepidimonas alkaliphilus*, TSE21727.1). Le motif de quatre cystéines conservées est entouré par le cadre rouge. **(B)** Modèle structural de RlhA d'*E.coli* (Phyre2). La partie N-ter (acides aminés 1-200, bleu) est caractérisée par un tonneau TIM composé de trois feuillets β entourés par cinq hélices α . La partie centrale (acides aminés 320-392, rose) est composée de quatre feuillets β formant un motif en tonneau β . Les quatre cystéines conservées (C169, C176, C192, C196) sont indiquées en rouge. Le reste du modèle structural est construit par la calcul *ab initio* (partie verte). **(C)** La construction de la partie N-ter de RlhA d'*E.coli* repose sur trois structures (5D88, 3INP et 5VXS), celle de la partie centrale est basée sur la structure 4HE5 et le reste par calcul *ab initio*.

Le modèle structural de RlhA construit par Phyre2 est présenté dans la figure X. La construction de la partie N-ter du modèle (acides aminés 1-200, partie bleue, Fig. 78B) repose sur les structures 5D88 (domaine U32 de Mk0906 chez *Methanopyrus kandleri*), 3INP (D-ribulose-phosphate 3-épipimerase chez *Francisella tularensis*) et 5VXS (citramalyl-CoA lyase chez l'homme) avec une confiance de 100%, 94% et 96%, respectivement (Fig. 78C). Ces trois protéines partagent 22.3%, 17.9% et 22.5% d'identité respectivement avec la partie Nter de RlhA. Cette partie serait caractérisée par un motif tonneau TIM composé de trois feuillets β entourés par cinq hélices α . Les quatre cystéines conservées se trouvent à l'extérieur du tonneau. Une partie centrale (acides aminés 320-392, partie rose, Fig. 78B) est construite à partir de la structure d'une extrémité C-ter de TrhP chez *Geobacillus thermoleovorans* (4HE5) avec une confiance de 95%. Cette partie centrale de RlhA d'*E.coli*, qui partage 17.9% d'identité avec 4HE5, serait caractérisée par un motif en tonneau β composant par quatre feuillets β connectés par des boucles sans structure secondaire caractéristique. Le reste du modèle structural est construit par la calcul *ab initio* (partie verte, Fig. 78B)

II.2 Purification et caractérisation biochimique de TrhP

La protéine TrhP est exprimée avec une étiquette de six histidines à son extrémité N-ter et purifiée par deux étapes de purifications (Ni^{2+} et filtration sur gel) comme décrit ci-dessus (Fig. 79A), sous forme monomère. 6His-TrhP purifié est légèrement rose, et son spectre UV-vis indique la présence d'un centre Fe-S (Fig. 79B). Nous avons ensuite essayé de reconstituer le centre Fe-S de TrhP en anaérobie. En effet, après la reconstitution, la protéine possède 3.9 Fe et 3.7 S / monomère et son spectre UV-vis, avec une absorbance vers 400 nm, confirme la présence d'un centre [4Fe-4S] par protéine (Fig. 79B). L'absorbance vers 600 nm indique une reconstitution imparfaite avec probablement des agrégats Fe-S accrochés à la protéine. Il faudra des lavages supplémentaires afin de les éliminer complètement.

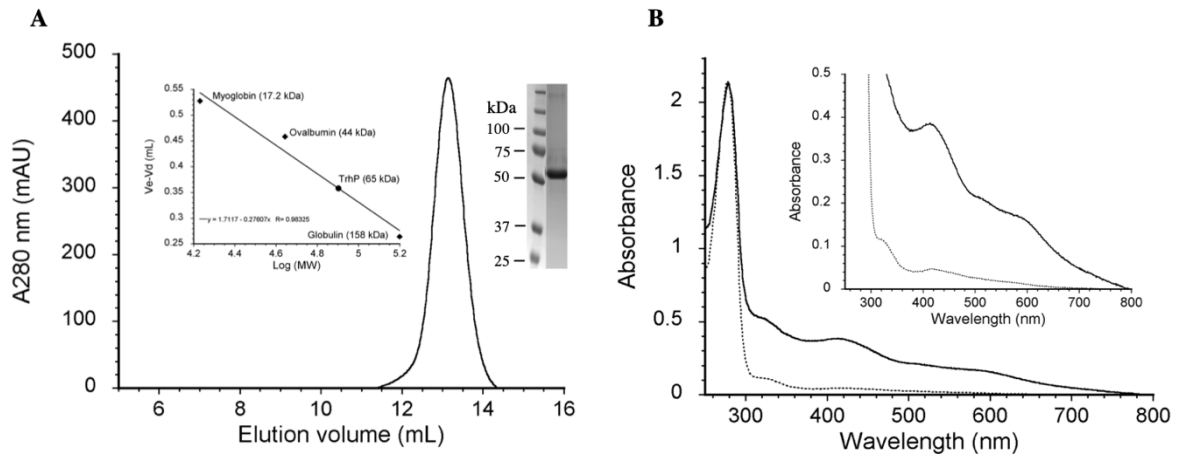


Figure 79. Purification et caractérisation biochimique de 6His-TrhP d'*E. coli*. (A) Chromatogramme de filtration sur gel de TrhP purifiée en aérobic sur une colonne Superdex 200 10/300 (GE Healthcare). L'insertion montre une courbe d'étalonnage, les standards de protéines en losange, 6His-TrhP en cercle et un gel de SDS-PAGE coloré au Coomassie de 6His-TrhP purifié en aérobic. (B) Spectre d'absorption UV-vis de 6His-TrhP purifié en aérobic (ligne pointillée, 39.1 μM) et de l'holo-TrhP reconstitué en anaérobic (ligne continue, 31.1 μM). L'insertion est un agrandissement de la région de 300 à 800 nm.

Ces résultats montrent bien que TrhP est aussi une protéine à centre Fe-S. Comme TrhP possède également quatre cystéines conservées (C170, C177, C193 et C197) dans la séquence formant le même motif qu'RlhA C-X₆-C-X₁₅-C-X₃-C (Fig. 80A), nous sommes en train de générer des mutants cystéine en alanine afin que confirmer leur importance pour la coordination du centre Fe-S de TrhP.

Le modèle structural de TrhP construit par Phyre2 est très similaire à celui de RlhA (Fig. 80B). La partie N-ter du modèle (acides aminés 1-198, partie bleue) serait caractérisée par le motif de tonneau TIM et la partie C-ter (acides aminés 360-439, partie rose, Fig. 80B) par le motif en tonneau tonneau β. La partie N-ter est construite, encore une fois, à partir de la structure du domaine U32 de Mk0906 chez *Methanopyrus kandleri* (5D88) et celle de la thiamine phosphate pyrophosphorylase chez *Pyrococcus furiosus* (1XI3) avec une confiance de 100% et 97% respectivement. La séquence protéique de ces deux protéines partage 19.9% et 19.6% d'identité respectivement avec la partie N-ter de TrhP d'*E. coli*. L'extrémité C-ter de TrhP chez *Geobacillus thermoleovorans* (4HE5) qui partage 21.5% d'identité avec celle de son homologue d'*E. coli* a été utilisée comme template pour construire la partie C-ter de TrhP d'*E. coli* avec une confiance de 99%.

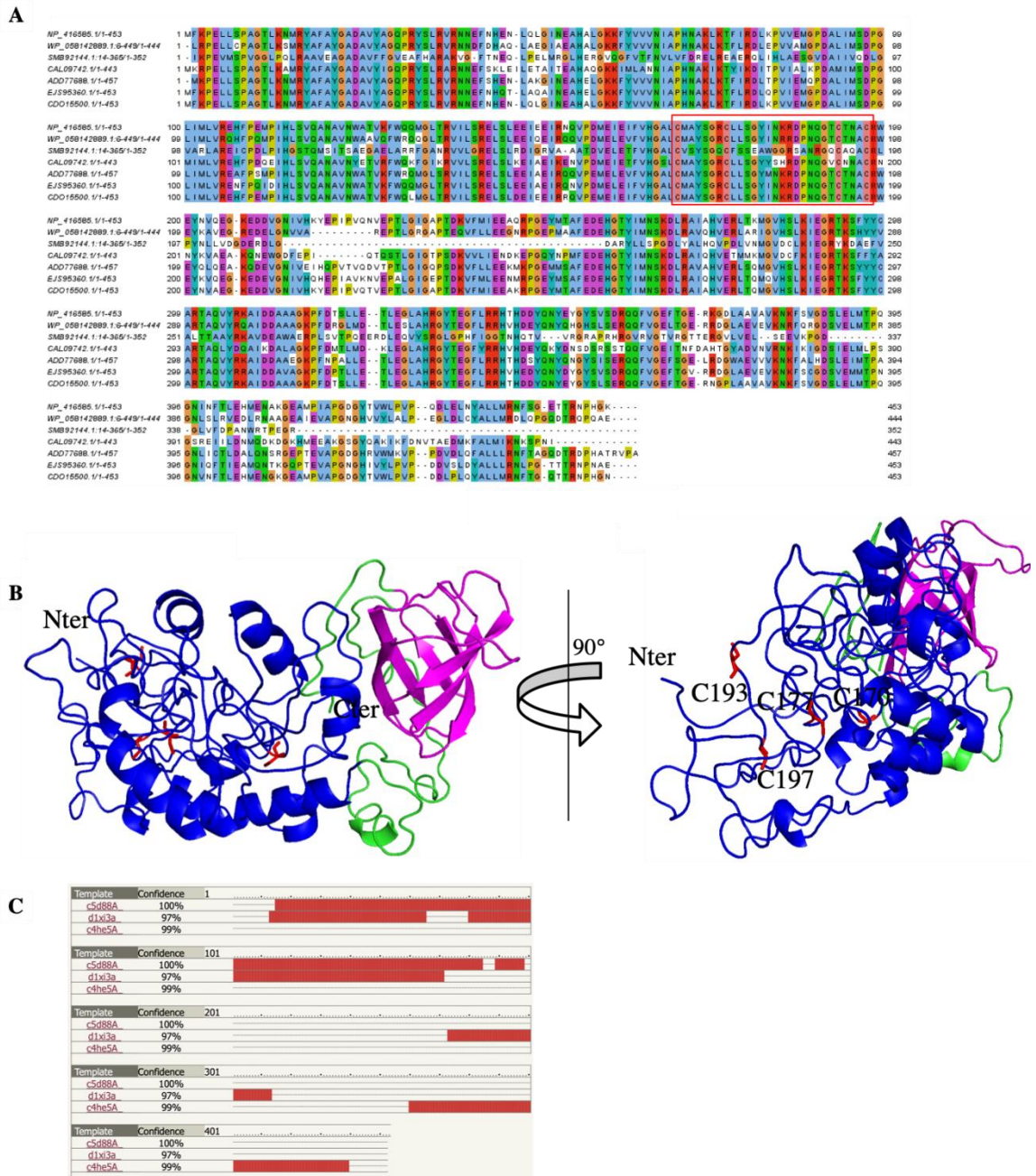


Figure 80. Analyses informatiques de TrhP. (A) Alignement multiple de séquences de divers représentants de TrhP de protobactéries (*Escherichia coli*, NP_416585.1 ; *Pseudomonas aeruginosa*, WP_058142889.1 ; *Deinococcus hopiensis*, SMB92144.1 ; *Francisella tularensis* CAL09742.1 ; *Pantoea ananatis*, ADD77688.1 ; *Pectobacterium wasabiae*, EJS95360.1 ; *Klebsiella pneumoniae*, CDO15500.1). Le motif de quatre cystéines conservées est entouré par le cadre rouge. (B) Modèle structural de TrhP d'*E.coli* (Phyre2). La partie N-ter (acides aminés 1-198, bleu) serait caractérisé par un tonneau TIM. La partie C-ter (acides aminés 360-439, rose) serait composé de six feuilletés β formant un motif en tonneau β . Les quatre cystéines conservées (C170, C177, C193, C197) sont indiquées en rouge. Le reste du modèle structural est construit par calcul *ab initio* (partie verte). (C) La construction de la partie N-ter repose sur trois structures 5D88 et 1X13, celle de la partie C-ter par 4HE5 et le reste par la modélisation *ab initio*.

III. Discussion

L'hydroxylation des molécules biologiques est une réaction enzymatique fondamentale impliqué dans divers événements biologiques (Ploumakis and Coleman 2015, Katz, Gandara

et al. 2016). Dans le contexte de l'épitranscriptome, l'hydroxylation est une modification majeure qui module les fonctions de l'ARN (Ploumakis and Coleman 2015) et est ainsi impliqué dans plusieurs modifications de l'ARNt (Persson and Bjork 1993, Fu, Dai et al. 2010, Noma, Ishitani et al. 2010, Kawarada, Suzuki et al. 2017). Les réactions d'hydroxylation des ARNs rapportées à ce jour sont catalysées par des oxygénases dépendantes du Fe (II) et du 2-oxoglutarate (2-OG) qui utilisent l'oxygène moléculaire comme substrat d'hydroxylation (Loenarz and Schofield 2008). Ni *RlhA* ni *TrhP* ne possède aucun des domaines et motifs caractéristiques conservés dans ces oxygénases, ce qui suggère qu'elles représentent une nouvelle famille de protéines responsables de l'hydroxylation de l'ARN.

L'activité enzymatique de ces deux protéines semble dépendre directement du préphénate et des motifs de quatre cystéines conservés que possède chaque protéine. De plus, la machinerie de la biogénèse des centres Fe-S et la concentration cellulaire en Fe semblent importantes pour l'activité de *RlhA*.

Pendant que le manuscrit de la thèse était en cours d'écriture et de finalisation, un autre travail concernant *TrhP* a été publié (Lauhon 2019). Fait très intéressant, le mutant KO $\Delta iscS$ est capable de synthétiser la ho^5U34 , mais à un niveau réduit. Ces résultats suggèrent que, comme ho^5C2501 , la synthèse de ho^5U34 dépend au moins en partie de la biosynthèse de centre Fe-S catalysée par *iscS*. Cependant, contrairement à ho^5C2501 , la formation de la ho^5U34 dans les cellules est assurée non seulement par la voie dépendante des centre Fe-S, mais aussi par une autre voie indépendante des centres Fe-S, qui est dépendante de *TrhO*, une protéine qui utilise l'oxygène moléculaire comme substrat pour réaliser la réaction d'hydroxylation de l'ARNt (Sakai, Kimura et al. 2019).

Nous avons purifié *RlhA* et *TrhP* d'*E. coli*. Les deux protéines sont légèrement roses et leur spectre UV-vis indique la présence de centres Fe-S dégradés au cours de la purification en aérobie. Bien que la reconstitution en anaérobie du centre Fe-S de *RlhA* nécessite des optimisations, la quantification du fer et du soufre et le spectre UV-vis de l'holo-*TrhP* confirment bien que *TrhP* est capable de lier un centre [4Fe-4S] en anaérobie (Fig. 79B). La fonction des centres [4Fe-4S] dans *RlhA* et *TrhP*, comme ceux d'*UbiU* et d'*UbiV*, reste inconnue.

Fait intéressant, la ferrédoxine *YfhL* a été récemment identifiée comme un nouveau facteur important pour la formation de ho^5U34 de manière dépendante du préphénate chez *E. coli* (Lauhon 2019). En effet, le mutant $\Delta yfhL$ (ainsi qu'un double mutant $\Delta yfhL$ et $\Delta trhP$) présente le même niveau réduit de ho^5U34 dans l'ARNt total que les mutants $\Delta trhP$ et

ΔaroD, ce qui suggère qu'il est essentiel pour la voie de la biosynthèse de ho⁵U34 de manière dépendante du préphénate. YfhL appartient à la famille de la ferrédoxine « Alvin », qui a été identifié pour la première fois chez *Allochromatium vinosum* (Moullis 1996). Ces protéines contiennent deux centres [4Fe-4S] de potentiel rédox très faible ($E^{\circ}_1 \sim -650$ mV ; $E^{\circ}_2 \sim -450$ mV) en raison de motifs structuraux uniques (Moullis, Sieker et al. 1996). Comme la définition du gène *yfhL* chez *E. coli* semble affecter la voie de biosynthèse de ho⁵U34 dépendante du préphénate, il est possible qu'il s'agisse d'une fonction spécifique d'*yfhL in vivo*. Mécanistiquement, la raison pour laquelle TrhP aurait besoin d'électrons pour catalyser une réaction d'oxydation n'est pas clair, à part que le mécanisme ressemble à un certain nombre de réactions radicalaires d'oxydation. Des travaux récents de Booker et ses collègues ont montré que, chez *Thermotoga maritima*, une ferrédoxine et une ferredoxine réductase fournissaient efficacement des électrons au centre Fe-S lié à l'enzyme à radical SAM MiaB *in vitro* pour soutenir sa méthylthiolation de l'ARNt (Arcinas, Maiocco et al. 2019). La ferredoxine réduite assure le transfert d'électron pour faciliter la formation du radical 5'-adénosyle qui initie la thiolation du carbone de position 2 de l'adénosine. Ainsi, le rôle d'YfhL dans la synthèse de ho⁵U34 peut être de réduire le centre [4Fe-4S] de TrhP pour la formation d'une espèce radicalaire, telle qu'un radical uridine-5-yle, qui peut se combiner avec un radical hydroxyle issu du préphénate.

RlhA, TrhP, UbiU et UbiV, comme évoqué dans le chapitre I, appartiennent à la famille des peptidase U32 dont la fonction est inconnue. La seule fonction de cette famille rapportée est l'activité de type collagénase ; cependant cette fonction reste discutable. De nouvelles analyses phylogénétiques présentées dans le chapitre IV ont permis de re-classifier ces protéines contenant des motifs de peptidase U32 dans 12 sous-familles dont huit possèdent un motif de quatre cystéine conservées (UbiU, UbiV, RlhA, TrhP, U32#1, U32#2, U32#3 et U32#4), suggérant un rôle fonctionnel important pour ces résidus, vu que les centres Fe-S sont importants pour l'activité enzymatique d'UbiU, d'UbiV, d'RlhA et de TrhP. Un récapitulatif des quatre paralogues de la famille U32 (UbiU, UbiV, RlhA et TrhP) est présenté dans la figure 81. L'ensemble des résultats présentés dans les chapitres IV, V et VI de cette thèse ouvre une porte à une nouvelle classe de protéines de la famille U32 qui sont impliqués dans les réactions d'hydroxylation en absence d'oxygène de manière indépendante du cofacteur MoCo mais dépendante des centres [4Fe-4S] et du préphénate qui est probablement un donneur de groupement d'hydroxyle, ce qui reste à prouver par des tests *in vitro*, que nous sommes en train de mettre au point .

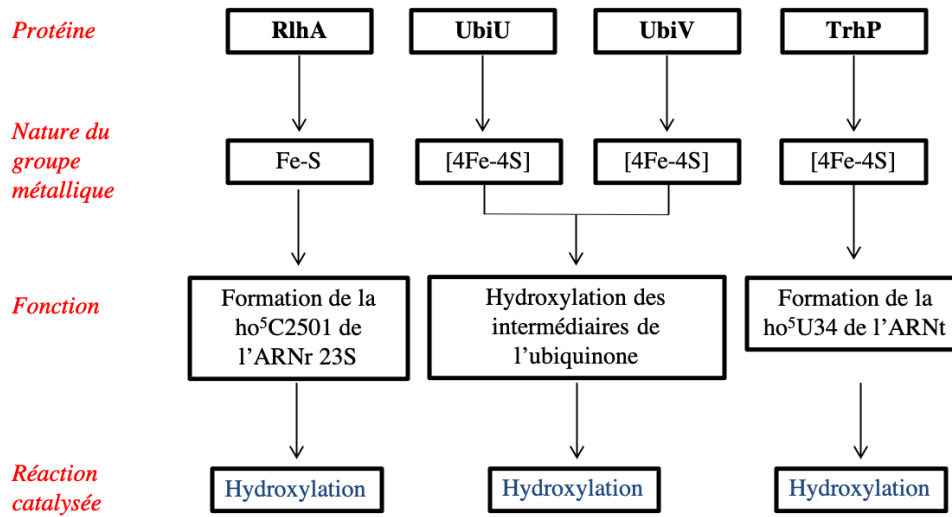


Figure 81. Quatre paralogues de la famille U32 (RlhA, UbiU , UbiV et TrhP)

Conclusion g é n é rale

La biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* a été étudiée dans les années 70-80 par Alexander, Young, Cox et leurs collaborateurs. La voie de biosynthèse en aérobie comporte huit étapes et implique au moins dix protéines (UbiA-UbiI et UbiX) qui convertissent le précurseur universel 4-HB en ubiquinone. Bien que toutes les protéines catalysant les différentes étapes de biosynthèse semblent connues, nos collaborateurs ont récemment identifié deux nouvelles protéines UbiJ et UbiK qui sont importantes pour la voie de biosynthèse de l'ubiquinone. Des travaux précédents de nos collaborateurs montrent que ces deux nouvelles protéines interagissent avec la plupart des protéines connues pour participer à la biosynthèse de l'ubiquinone, ce qui laisse penser à la présence d'un complexe de biosynthèse de l'ubiquinone. Ils ont également démontré l'existence d'une voie alternative de biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie qui implique trois nouvelles protéines UbiT, UbiU et UbiV.

Le but du projet et thèse a été dans un premier temps, de confirmer la présence du complexe protéique Ubi par approches biochimique (Paris) et d'établir sa composition par approche protéomique (Grenoble et Marseille) et, dans un deuxième temps, de caractériser les trois nouvelles protéines UbiT, UbiU et UbiV, d'élucider leur fonction dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie par des approches génétiques (Grenoble et Marseille) et biochimiques (Paris). Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé à la caractérisation biochimique des deux autres protéines RlhA et TrhP qui appartiennent, comme UbiU et UbiV, à la famille des protéases U32 et qui partagent des similarités avec UbiU et UbiV.

Nous avons précédemment démontré qu'UbiJ et UbiK purifiées formaient un hétérocomplexe 1 : 2 qui liait l'acide palmitoléique, l'un des acides gras les plus abondants chez *E. coli*. Cette capacité à liaison des lipides suggère qu'UbiJ et UbiK pourraient agir comme des facteurs accessoires des enzymes Ubi, mais le rôle de ces deux protéines, bien qu'important pour la biosynthèse de l'ubiquinone, reste indéterminé. Dans ce travail, nous démontrons que sept protéines Ubi forment un complexe des Ubi, un métabolon stable catalysant les six dernières réactions de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli*. Le domaine SCP2 de UbiJ forme une cavité hydrophobe étendue qui lie les intermédiaires de l'ubiquinone à l'intérieur du complexe des Ubi d'1MDa. Nous purifions le complexe d'Ubi à partir des extraits cytoplasmiques et démontrons que la biosynthèse de l'ubiquinone se produit dans cette fraction, remettant en cause l'hypothèse actuelle d'un processus de biosynthèse associé à la membrane. Ensemble, nos résultats rapportent un cas rare d'un métabolon stable et mettent en évidence une organisation supramoléculaire des enzymes

solubles qui permet la modification des substrats hydrophobes dans un environnement hydrophile.

Il a été montré dans les années soixantes que l'ubiquinone est biosynthétisée en conditions anaérobiques, suggérant une voie alternative de la biosynthèse en absence d'oxygène. En effet, nous avons montré que la voie de biosynthèse de l'ubiquinone en absence d'oxygène s'effectuait de manière indépendante des protéines UbiI, UbiH, UbiF, UbiJ et UbiK. Ainsi, le complexe des protéines Ubi que nous montrons dans la première partie de la thèse n'est valable qu'en conditions aérobiques. Nos collaborateurs ont identifié *ubiT* (*yhbT*), *ubiU* (*yhbU*) et *ubiV* (*yhbV*) comme trois nouveaux gènes qui sont impliqués uniquement dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone indépendante de l'oxygène. L'accumulation d'OPP dans un mutant $\Delta ubiT$ suggère un rôle global plutôt que catalytique dans la biosynthèse de l'ubiquinone. Le fait qu'UbiT possède un domaine de liaisons aux stérols comme UbiJ suggère qu'UbiT pourrait remplacer fonctionnellement UbiJ dans la voie dépendante de l'oxygène. En effet, grâce à ce domaine, UbiT pourrait lier les intermédiaires de biosynthèse et les présenter aux différentes protéines pour la modification des substituants. Nous n'arrivons pas à exprimer UbiT d'*E. coli*, cependant nous sommes capables d'exprimer et de purifier UbiT de *P. aeruginosa* fusionnée avec la thiorédoxine à l'extrémité N-ter. La protéine est co-purifiée avec l'ubiquinone. De plus, je suis en train de tester si UbiT peut fixer des intermédiaires lipidiques de biosynthèse de l'ubiquinone. Il sera intéressant de vérifier si un complexe multiprotéique existe en condition anaérobie et si UbiT joue un rôle dans la structuration de ce complexe qui pourrait contenir les hydroxylases anaérobiques qui restent inconnues à ce jour.

Nous avons réussi à purifier UbiV en aérobie qui présente des traces de centre Fe-S. En anaérobie, UbiV est capable de lier un centre [4Fe-4S] via son motif de quatre cystéines conservées. Ce centre [4Fe-4S], sensible à l'air, est important pour l'activité d'UbiV car les cellules d'*E. coli* $\Delta ubiV$ portant un plasmide codant pour des mutants cystéine en alanine d'UbiV ne sont pas capable de synthétiser l'ubiquinone dans les conditions anaérobiques. UbiU est soluble et purifiable en présence du détergent. La protéine est précipitée rapidement au cours de la réaction de reconstitution du centre Fe-S. Nos collaborateurs à Marseille ont montré qu'UbiU était en interaction avec UbiV dans les expériences de double hybride bactérien. Nous avons confirmés ces résultats en purifiant le complexe UbiU-UbiV en aérobie qui présente, encore une fois, des traces des centres Fe-S. La reconstitution en anaérobie révèle la présence de deux centres [4Fe-4S] dans le complexe UbiU-UbiV. Le teneur en Fe et S des doubles mutants cystéines en alanines d'UbiU dans le complexe UbiU-UbiV réduit de

moitié suggérant qu'UbiU lie le deuxième centre [4Fe-4S]. De plus, nos collaborateurs ont montré que ce centre [4Fe-4S] est important pour l'activité d'UbiU dans le contexte de biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie.

Nous avons ensuite étendu nos études à UbiU et UbiV de *Pseudomonas aeruginosa* dont le comportement est identique à celles d'*E. coli*. Nous n'arrivons pas, pour l'instant, à purifier le complexe UbiU-UbiV de *P. aeruginosa*, probablement due à l'incompatibilité du système d'expression des protéines de *P. aeruginosa* en utilisant des cellules d'*E. coli*. De fait très intéressant, nous avons démontré, pour la première fois, qu'UbiU était capable de lier l'ubiquinone et ses intermédiaires de biosynthèse.

La combinaison des résultats de caractérisation d'UbiT, d'UbiU et d'UbiV à la fois chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa* nous laisse penser à l'existence d'un complexe alternatif qui est impliqué dans la voie de biosynthèse de l'ubiquinone en anaérobie. Nos collaborateurs ont montré que les deux voies de biosynthèse de l'ubiquinone chez *E. coli* partageaient les mêmes protéines Ubi, à l'exception des hydroxylases aérobiques (UbiI, UbiF et UbiH), UbiJ et UbiK. Il sera donc important de vérifier la présence de ce complexe multiprotéique en condition anaérobique, ainsi que d'analyser les composants de ce complexe.

Selon l'annotation NCBI, UbiU et UbiV, comme RlhA et TrhP, appartiennent à la famille des peptidases U32 dont la fonction reste floue. Nos analyses bio-informatiques démontrent que les protéines U32 possèdent des motifs de quatre cystéines conservées, suggérant que les centres Fe-S sont importants pour leur fonction, comme le cas d'UbiU et d'UbiV. RlhA et TrhP ont récemment été identifiés comme responsables de la modification des ARNs par des réactions d'hydroxylation de manière dépendante du préphénate et de la machinerie de la biosynthèse des centres Fe-S. Nous avons purifiés ces deux protéines qui présentaient des traces des centres Fe-S. La reconstitution du centre Fe-S de TrhP en anaérobie montre que la protéine est capable de lier un centre [4Fe-4S].

L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis d'avancer significativement dans la compréhension de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone. Dans un premier temps, j'ai participé par mon apport biochimique avec la production des protéines UbiJ et UbiK à une meilleure compréhension du fonctionnement du complexe Ubi impliqué dans la voie dépendante de l'oxygène.

Puis, j'ai activement participé à la découverte et à la caractérisation de nouvelles protéines Ubi essentielles à la production d'ubiquinone indépendante de l'oxygène. La découverte qu'il s'agit de protéines Fe-S a été faite au laboratoire, lorsque je me suis rendu compte que la protéine UbiU était rose.

Ce travail a aussi permis de re-étudier la famille des protéines U32 dont la fonction peptidase devrait être remplacée par la fonction hydroxylase dans tous les textbooks. Les résultats de caractérisation de quatre protéines U32 ouvrent une nouvelle porte à une nouvelle classe d'enzymes qui sont impliquées dans les réactions d'hydroxylation dans les conditions anaérobiques de manière dépendante des centres [4Fe-4S] et du préphénate comme le donneur du groupement d'hydroxyle.

D'un point de vue applicatif, UbiU et UbiV de *P. aeruginosa* pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles afin de développer de nouveaux antibiotiques car l'ubiquinone est la seule quinone dont elle a besoin afin de maintenir la croissance en aérobie et anaérobie. De plus, une fois infecté l'hôte, la bactérie s'y développe en mode de biofilm et la croissance en ce mode dépend directement d'UbiU et d'UbiV.

Ces travaux ont fait l'objet de deux publications parues dans « Cell Chemical Biology » et « mBio ». Une troisième publication sur la caractérisation d'UbiT, d'UbiU et d'UbiV chez *P. aeruginosa* est en cours de préparation.

Une perspective importante de ce travail sera l'étude mécanistique des protéines UbiU et UbiV. Pour cela, un gros effort de synthèse organique a été réalisé au laboratoire par Philippe Simon (IR CNRS) qui a synthétisé plusieurs analogues de substrats à chaîne farnésyles. Le test d'activité *in vitro* devrait rapidement être mis en place au laboratoire.

R é f é r e n c e s b i b l i o g r a p h i q u e s

- Alexander, K. and I. G. Young (1978). "Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*." Biochemistry 17(22): 4750-4755.
- Alexander, K. and I. G. Young (1978). "Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*." Biochemistry 17(22): 4745-4750.
- Allan, C. M., et al. (2015). "Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 290(12): 7517-7534.
- Alvarez-Ortega, C. and C. S. Harwood (2007). "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration." Mol Microbiol 65(1): 153-165.
- Arai, H. (2011). "Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*." Front Microbiol 2: 103.
- Arcinas, A. J., et al. (2019). "Ferredoxins as interchangeable redox components in support of MiaB, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase." Protein Sci 28(1): 267-282.
- Arends, J., et al. (2016). "In vivo trapping of FtsH substrates by label-free quantitative proteomics." Proteomics 16(24): 3161-3172.
- Aussel, L., et al. (2014). "ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." J Bacteriol 196(1): 70-79.
- Aussel, L., et al. (2014). "ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Journal of Bacteriology 196(1): 70-79.
- Baba, T., et al. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol 2: 2006.0008.
- Babu, M., et al. (2009). "Sequential peptide affinity purification system for the systematic isolation and identification of protein complexes from *Escherichia coli*." Methods Mol Biol 564: 373-400.
- Ball, H. A., et al. (1996). "Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1." J Bacteriol 178(19): 5755-5761.
- Baradaran, R., et al. (2013). "Crystal structure of the entire respiratory complex I." Nature 494(7438): 443-448.
- Barnhart, M. M. and M. R. Chapman (2006). "Curli biogenesis and function." Annu Rev Microbiol 60: 131-147.
- Bazylnski, D. A., et al. (2013). "Magnetococcus marinus gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov., Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria." Int J Syst Evol Microbiol 63(Pt 3): 801-808.

Behan, R. K. and S. J. Lippard (2010). "The aging-associated enzyme CLK-1 is a member of the carboxylate-bridged diiron family of proteins." Biochemistry 49(45): 9679-9681.

Beifuss, U. and M. Tietze (2005). Methanophenazine and Other Natural Biologically Active Phenazines. Natural Products Synthesis II: Targets, Methods, Concepts. J. Mulzer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 77-113.

Beinert, H. (1983). "Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins." Anal Biochem 131(2): 373-378.

Beinert, H. (2000). "Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises." J Biol Inorg Chem 5(1): 2-15.

Beinert, H., et al. (1997). "Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures." Science 277(5326): 653-659.

Bentinger, M., et al. (2007). "The antioxidant role of coenzyme Q." Mitochondrion 7 Suppl: S41-50.

Bentley, K. W. (1990). "Beta-phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids." Nat Prod Rep 7(3): 245-268.

Berkovitch, F., et al. (2004). "Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme." Science 303(5654): 76-79.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.

Brereton, P. S., et al. (1999). "Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [Fe₄S₄] cluster of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties." Biochemistry 38(32): 10594-10605.

Buffinton, G. D., et al. (1989). "DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates." Biochem J 257(2): 561-571.

Burgardt, N. I., et al. (2017). "A structural appraisal of sterol carrier protein 2." Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1865(5): 565-577.

Cadenas, E., et al. (1992). "Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 65: 97-146.

Campanacci, V., et al. (2006). "The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids." FEBS Lett 580(20): 4877-4883.

Carrica, M. C., et al. (2011). "YqiC of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a membrane fusogenic protein required for mice colonization." BMC Microbiol 11: 95.

- Cheek, J. and J. B. Broderick (2001). "Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: versatile clusters in a radical new role." J Biol Inorg Chem 6(3): 209-226.
- Chen, Z., et al. (2010). "Structure and control of the actin regulatory WAVE complex." Nature 468(7323): 533-538.
- Cheng, W. and W. Li (2014). "Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes." Science 343(6173): 878-881.
- Clark, M. B., et al. (2013). "The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs." Essays Biochem 54: 1-16.
- Coelho, C. and M. J. Romao (2015). "Structural and mechanistic insights on nitrate reductases." Protein Sci 24(12): 1901-1911.
- Collins, M. D. and D. Jones (1981). "Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication." Microbiol Rev 45(2): 316-354.
- Cox, G. B. and F. Gibson (1964). "Biosynthesis of vitamin K and ubiquinone. Relation to the Shikimic acid pathway in Escherichia Coli." Biochim Biophys Acta 93: 204-206.
- Crull, M. R., et al. (2018). "Changing Rates of Chronic Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis: A Population-Based Cohort Study." Clin Infect Dis 67(7): 1089-1095.
- Dai, Y. N., et al. (2014). "Crystal structures and catalytic mechanism of the C-methyltransferase Coq5 provide insights into a key step of the yeast coenzyme Q synthesis pathway." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 70(Pt 8): 2085-2092.
- Disch, A. and M. Rohmer (1998). "On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts." FEMS Microbiol Lett 168(2): 201-208.
- Echtay, K. S., et al. (2001). "Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)." Proc Natl Acad Sci U S A 98(4): 1416-1421.
- Eisenreich, W., et al. (2001). "Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids." Trends Plant Sci 6(2): 78-84.
- Entsch, B., et al. (1976). "Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase." J Biol Chem 251(9): 2550-2563.
- Ernster, L. and G. Dallner (1995). "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function." Biochim Biophys Acta 1271(1): 195-204.
- Estellon, J., et al. (2014). "An integrative computational model for large-scale identification of metalloproteins in microbial genomes: a focus on iron-sulfur cluster proteins." Metallomics 6(10): 1913-1930.
- Filiatrault, M. J., et al. (2006). "Identification of Pseudomonas aeruginosa genes involved in virulence and anaerobic growth." Infect Immun 74(7): 4237-4245.

- Filiatrault, M. J., et al. (2005). "Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun 73(6): 3764-3772.
- Fish, W. W. (1988). "Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples." Methods Enzymol 158: 357-364.
- Fontecave, M. (2006). "Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles." Nat Chem Biol 2(4): 171-174.
- Fontecave, M. and C. Gerez (2002). "Tyrosyl radicals and ribonucleotide reductase." Methods Enzymol 348: 21-30.
- Fontecave, M., et al. (2003). "Biological radical sulfur insertion reactions." Chem Rev 103(6): 2149-2166.
- Fontecave, M., et al. (2008). "From Iron and Cysteine to Iron-Sulfur Clusters: the Biogenesis Protein Machineries." EcoSal Plus 3(1).
- Fu, Y., et al. (2010). "The AlkB domain of mammalian ABH8 catalyzes hydroxylation of 5-methoxycarbonylmethyluridine at the wobble position of tRNA." Angew Chem Int Ed Engl 49(47): 8885-8888.
- Fukasawa, K. M., et al. (2011). "Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases." Journal of amino acids 2011: 574816-574816.
- Gin, P. and C. F. Clarke (2005). "Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase." J Biol Chem 280(4): 2676-2681.
- Gomez-Diaz, C., et al. (1997). "Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane." J Bioenerg Biomembr 29(3): 251-257.
- Groenewold, M. K., et al. (2018). "A phosphatidic acid-binding protein is important for lipid homeostasis and adaptation to anaerobic biofilm conditions in *Pseudomonas aeruginosa*." Biochem J 475(11): 1885-1907.
- Gulmezian, M., et al. (2007). "The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis." Arch Biochem Biophys 467(2): 144-153.
- Gurbiel, R. J., et al. (1991). "Q-band ENDOR spectra of the Rieske protein from *Rhodobacter capsulatus* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase show two histidines coordinated to the [2Fe-2S] cluster." Biochemistry 30(49): 11579-11584.
- Hajj Chehade, M., et al. (2013). "ubiI, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation." J Biol Chem 288(27): 20085-20092.
- Hajj Chehade, M., et al. (2019). "A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid Ubiquinone." Cell Chem Biol 26(4): 482-492 e487.

- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J 219(1): 1-14.
- Han, H. J., et al. (2008). "Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*." Can J Microbiol 54(1): 1-10.
- Han, X., et al. (2015). "Crystal structures of ligand-bound octaprenyl pyrophosphate synthase from *Escherichia coli* reveal the catalytic and chain-length determining mechanisms." Proteins 83(1): 37-45.
- Hashimoto, M., et al. (2005). "Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome." Mol Microbiol 55(1): 137-149.
- Hedderich, R., et al. (1992). "Isolation and characterization of polyferredoxin from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. The *mvhB* gene product of the methylviologen-reducing hydrogenase operon." FEBS Lett 298(1): 65-68.
- Helm, M. and J. D. Alfonzo (2014). "Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland." Chem Biol 21(2): 174-185.
- Hille, R. (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." Chem Rev 96(7): 2757-2816.
- Hille, R. (2005). "Molybdenum-containing hydroxylases." Arch Biochem Biophys 433(1): 107-116.
- Hille, R., et al. (1998). "Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes." FEMS Microbiol Rev 22(5): 489-501.
- Hiraishi, A., et al. (1984). "Isoprenoid quinone composition in the classification of rhodospirillaceae." The Journal of General and Applied Microbiology 30(3): 197-210.
- Hofer, K. and A. Jaschke (2018). "Epitranscriptomics: RNA Modifications in Bacteria and Archaea." Microbiol Spectr 6(3).
- Hoyle, B. D. and J. W. Costerton (1991). "Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms." Prog Drug Res 37: 91-105.
- Hsieh, E. J., et al. (2007). "Saccharomyces cerevisiae Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex." Arch Biochem Biophys 463(1): 19-26.
- Huijbers, M. M., et al. (2014). "Flavin dependent monooxygenases." Arch Biochem Biophys 544: 2-17.
- Husain, M., et al. (1978). "P-Hydroxybenzoate hydroxylase and melilotate hydroxylase." Methods Enzymol 53: 543-558.
- Iwata, S., et al. (1998). "Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex." Science 281(5373): 64-71.
- Jasilionis, A., et al. (2012). "Gene expression and activity analysis of the first thermophilic U32 peptidase." Central European Journal of Biology 7(4): 587-595.

- Jensen, P. O., et al. (2017). "Microenvironmental characteristics and physiology of biofilms in chronic infections of CF patients are strongly affected by the host immune response." *Apmis* 125(4): 276-288.
- Jiang, H. X., et al. (2019). "Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide Shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18." *J Ind Microbiol Biotechnol* 46(7): 1025-1038.
- Johnson, D. C., et al. (2005). "STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS." *Annual Review of Biochemistry* 74(1): 247-281.
- Johnson, D. C., et al. (2005). "Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters." *Annu Rev Biochem* 74: 247-281.
- Johnson, H. A. and A. M. Spormann (1999). "In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization." *J Bacteriol* 181(18): 5662-5668.
- Kanehisa, M., et al. (2014). "Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG." *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D199-205.
- Kang, C. I., et al. (2003). "Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome." *Clin Infect Dis* 37(6): 745-751.
- Karimova, G., et al. (1998). "A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5752-5756.
- Kato, T., et al. (1992). "Sequence analysis and characterization of the Porphyromonas gingivalis prtC gene, which expresses a novel collagenase activity." *J Bacteriol* 174(12): 3889-3895.
- Katz, M. J., et al. (2016). "Hydroxylation and translational adaptation to stress: some answers lie beyond the STOP codon." *Cell Mol Life Sci* 73(9): 1881-1893.
- Kavermann, H., et al. (2003). "Identification and characterization of Helicobacter pylori genes essential for gastric colonization." *J Exp Med* 197(7): 813-822.
- Kawarada, L., et al. (2017). "ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications." *Nucleic Acids Res* 45(12): 7401-7415.
- Kiley, P. J. and H. Beinert (2003). "The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria." *Curr Opin Microbiol* 6(2): 181-185.
- Kimura, S., et al. (2017). "Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation." *Nucleic Acids Res* 45(22): 12974-12986.
- Kloer, D. P., et al. (2006). "Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*." *Structure* 14(9): 1377-1388.

- Kniemeyer, O. and J. Heider (2001). "Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme." J Biol Chem 276(24): 21381-21386.
- Knoell, H. E. (1979). "Isolation of a soluble enzyme complex comprising the ubiquinone-8 synthesis apparatus from the cytoplasmic membrane of Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun 91(3): 919-925.
- Kolpen, M., et al. (2014). "Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen." Clin Exp Immunol 177(1): 310-319.
- Kolpen, M., et al. (2010). "Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic Pseudomonas aeruginosa pneumonia in cystic fibrosis." Thorax 65(1): 57-62.
- Kuo, C. F., et al. (1992). "Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III." Science 258(5081): 434-440.
- Kwon, O., et al. (2000). "Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in Escherichia coli: identification of the ubiF gene." FEMS Microbiol Lett 186(2): 157-161.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lauhon, C. T. (2019). "Identification and characterization of genes required for 5-hydroxyuridine synthesis in Bacillus subtilis and Escherichia coli tRNA." J Bacteriol.
- Lawrence, J., et al. (1974). "Biosynthesis of ubiquinone in Escherichia coli K-12: biochemical and genetic characterization of a mutant unable to convert chorismate into 4-hydroxybenzoate." J Bacteriol 118(1): 41-45.
- Lee, P. T., et al. (1997). "A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the Escherichia coli ubiE gene." J Bacteriol 179(5): 1748-1754.
- Lee, P. T., et al. (1997). "A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the Escherichia coli ubiE gene." J Bacteriol 179(5): 1748-1754.
- Lenaz, G. and M. L. Genova (2009). "Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain." Biochim Biophys Acta 1787(6): 563-573.
- Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." Nature 460(7257): 831-838.
- Linnane, S. J., et al. (1998). "Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med 158(1): 207-212.
- Loenarz, C. and C. J. Schofield (2008). "Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases." Nat Chem Biol 4(3): 152-156.

- Lohman, D. C., et al. (2014). "Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A 111(44): E4697-4705.
- Loiseau, L., et al. (2017). "The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ." J Biol Chem 292(28): 11937-11950.
- M, N. M., et al. (2007). "Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis." J Biol Chem 282(25): 18254-18264.
- Magill, S. S., et al. (2014). "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections." N Engl J Med 370(13): 1198-1208.
- Marbois, B., et al. (2005). "Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q." J Biol Chem 280(21): 20231-20238.
- Marbois, B., et al. (2009). "The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis." Biochim Biophys Acta 1791(1): 69-75.
- Marshall, S. A., et al. (2017). "Oxidative Maturation and Structural Characterization of Prenylated FMN Binding by UbiD, a Decarboxylase Involved in Bacterial Ubiquinone Biosynthesis." J Biol Chem 292(11): 4623-4637.
- Marshall, S. A., et al. (2019). "The UbiX flavin prenyltransferase reaction mechanism resembles class I terpene cyclase chemistry." Nat Commun 10(1): 2357.
- Matsumura, M., et al. (1983). "Anaerobic production of ubiquinone-10 by Paracoccus denitrificans." European journal of applied microbiology and biotechnology 17(2): 85-89.
- Matsushita, K., et al. (1980). "Function of ubiquinone in the electron transport system of Pseudomonas aeruginosa grown aerobically." J Biochem 88(3): 757-764.
- McGann, P., et al. (2012). "Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying bla(NDM-1) in a Providencia stuartii strain isolated in Afghanistan." Antimicrob Agents Chemother 56(4): 1673-1679.
- Meganathan, R. (2001). "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms." FEMS Microbiol Lett 203(2): 131-139.
- Melzer, M. and L. Heide (1994). "Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from Escherichia coli." Biochim Biophys Acta 1212(1): 93-102.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature 191: 144-148.
- Mitchell, P. (1975). "The protonmotive Q cycle: a general formulation." FEBS Lett 59(2): 137-139.

- Mizoguchi, H., et al. (2008). "Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome." DNA Res 15(5): 277-284.
- Moullis, J. M. (1996). "Molecular cloning and expression of the gene encoding *Chromatium vinosum* 2[4Fe-4S] ferredoxin." Biochim Biophys Acta 1308(1): 12-14.
- Moullis, J. M., et al. (1996). "Crystal structure of the 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Chromatium vinosum*: evolutionary and mechanistic inferences for [3/4Fe-4S] ferredoxins." Protein Sci 5(9): 1765-1775.
- Nakahigashi, K., et al. (1992). "Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone." J Bacteriol 174(22): 7352-7359.
- Navais, R., et al. (2014). "The *yrpAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions." Virulence 5(5): 619-624.
- Nohl, H., et al. (2003). "The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions." Biofactors 18(1-4): 23-31.
- Noma, A., et al. (2010). "Expanding role of the jumonji C domain as an RNA hydroxylase." J Biol Chem 285(45): 34503-34507.
- Nowicka, B. and J. Kruk (2010). "Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones." Biochim Biophys Acta 1797(9): 1587-1605.
- Ogasawara, H., et al. (2011). "Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis." J Bacteriol 193(10): 2587-2597.
- Okada, K., et al. (1996). "Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone." Biochim Biophys Acta 1302(3): 217-223.
- Ollagnier-de Choudens, S., et al. (2005). "Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis." FEBS Lett 579(17): 3737-3743.
- Ollagnier-De Choudens, S., et al. (2000). "Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase." Biochemistry 39(14): 4165-4173.
- Olson, R. E. and H. Rudney (1983). "Biosynthesis of ubiquinone." Vitam Horm 40: 1-43.
- Pacher, P., et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev 87(1): 315-424.
- Page, A. C., Jr., et al. (1960). "Coenzyme Q. 17. Isolation of coenzyme Q10 from bacterial fermentation." Arch Biochem Biophys 89: 318-321.
- Palfey, B. A. and C. A. McDonald (2010). "Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases." Arch Biochem Biophys 493(1): 26-36.

- Papucci, L., et al. (2003). "Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property." J Biol Chem 278(30): 28220-28228.
- Payet, L. A., et al. (2016). "Mechanistic Details of Early Steps in Coenzyme Q Biosynthesis Pathway in Yeast." Cell Chem Biol 23(10): 1241-1250.
- Pelosi, L., et al. (2016). "Evolution of Ubiquinone Biosynthesis: Multiple Proteobacterial Enzymes with Various Regioselectivities To Catalyze Three Contiguous Aromatic Hydroxylation Reactions." mSystems 1(4): e00091-00016.
- Pelosi, L., et al. (2019). "Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway." mBio 10(4).
- Persson, B. C. and G. R. Bjork (1993). "Isolation of the gene (miaE) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of Salmonella typhimurium and characterization of mutants." J Bacteriol 175(24): 7776-7785.
- Pierrel, F., et al. (2010). "Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis." Chem Biol 17(5): 449-459.
- Ploumakis, A. and M. L. Coleman (2015). "OH, the Places You'll Go! Hydroxylation, Gene Expression, and Cancer." Mol Cell 58(5): 729-741.
- Poon, W. W., et al. (1999). "Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis." J Biol Chem 274(31): 21665-21672.
- Poon, W. W., et al. (1997). "Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants." Mol Aspects Med 18 Suppl: S121-127.
- Porello, S. L., et al. (1998). "A substrate recognition role for the [4Fe-4S]₂₊ cluster of the DNA repair glycosylase MutY." Biochemistry 37(18): 6465-6475.
- Py, B. and F. Barras (2014). "Du fer et du soufre dans les protéines." Med Sci (Paris) 30(12): 1110-1122.
- Rabus, R. and F. Widdel (1995). "Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria." Arch Microbiol 163(2): 96-103.
- Rawlings, N. D., et al. (2012). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Res 40(Database issue): D343-350.
- Rawlings, N. D., et al. (2018). "The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database." Nucleic Acids Res 46(D1): D624-d632.
- Redfearn, E. R. (1966). "Mode of action of ubiquinones (coenzymes Q) in electron transport systems." Vitam Horm 24: 465-488.

- Rich, P. R. (1984). "Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes." Biochim Biophys Acta 768(1): 53-79.
- Roche, B., et al. (2013). "Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity." Biochim Biophys Acta 1827(3): 455-469.
- Rohmer, M. (1999). "The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants." Nat Prod Rep 16(5): 565-574.
- Sakai, Y., et al. (2019). "Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability." Nat Commun 10(1): 2858.
- Sazanov, L. A. (2015). "A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I." Nat Rev Mol Cell Biol 16(6): 375-388.
- Schacherl, M., et al. (2015). "The first crystal structure of the peptidase domain of the U32 peptidase family." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 71(Pt 12): 2505-2512.
- Schmelzer, C., et al. (2007). "Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study." IUBMB Life 59(10): 628-633.
- Schoepp-Cothenet, B., et al. (2009). "Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium." Proc Natl Acad Sci U S A 106(21): 8549-8554.
- Schoepp-Cothenet, B., et al. (2013). "On the universal core of bioenergetics." Biochim Biophys Acta 1827(2): 79-93.
- Shestopalov, A. I., et al. (1997). "Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in Escherichia coli. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis." FEBS Lett 404(2-3): 272-274.
- Siebert, M., et al. (1994). "Formation of 4-hydroxybenzoate in Escherichia coli: characterization of the ubiC gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase." Microbiology 140 (Pt 4): 897-904.
- Sofia, H. J., et al. (2001). "Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods." Nucleic Acids Res 29(5): 1097-1106.
- Stamler, J. S., et al. (1992). "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms." Science 258(5090): 1898.
- Stefely, J. A. and D. J. Pagliarini (2017). "Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis." Trends Biochem Sci 42(10): 824-843.
- Stewart, C. S., et al. (2004). "Oxalobacter formigenes and its role in oxalate metabolism in the human gut." FEMS Microbiol Lett 230(1): 1-7.
- Stover, C. K., et al. (2000). "Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen." Nature 406(6799): 959-964.

- Stroobant, P., et al. (1972). "Mutants of *Escherichia coli* K-12 blocked in the final reaction of ubiquinone biosynthesis: characterization and genetic analysis." J Bacteriol 109(1): 134-139.
- Subramanian, K., et al. (2019). "Coenzyme Q biosynthetic proteins assemble in a substrate-dependent manner into domains at ER-mitochondria contacts." J Cell Biol 218(4): 1353-1369.
- Sun, F., et al. (2005). "Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II." Cell 121(7): 1043-1057.
- Suzuki, K., et al. (1994). "Evidence that *Escherichia coli* *ubiA* product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of *ubiA* gene expression." Biosci Biotechnol Biochem 58(10): 1814-1819.
- Swiezewska, E., et al. (1993). "Biosynthesis of ubiquinone and plastoquinone in the endoplasmic reticulum-Golgi membranes of spinach leaves." J Biol Chem 268(2): 1494-1499.
- Switzer, R. L. (1989). "Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes." Biofactors 2(2): 77-86.
- Takahashi, T., et al. (1996). "Characterization of NADPH-dependent ubiquinone reductase activity in rat liver cytosol: effect of various factors on ubiquinone-reducing activity and discrimination from other quinone reductases." J Biochem 119(2): 256-263.
- Tran, U. C. and C. F. Clarke (2007). "Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes." Mitochondrion 7 Suppl: S62-71.
- Turunen, M., et al. (2004). "Metabolism and function of coenzyme Q." Biochim Biophys Acta 1660(1-2): 171-199.
- Wallace, B. J. and I. G. Young (1977). "Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA*- *menA*- double quinone mutant." Biochim Biophys Acta 461(1): 84-100.
- Wallace, N., et al. (2016). "The Impact of Oxygen on Bacterial Enteric Pathogens." Adv Appl Microbiol 95: 179-204.
- Weber, C., et al. (1994). "Antioxidative effect of dietary coenzyme Q10 in human blood plasma." Int J Vitam Nutr Res 64(4): 311-315.
- White, M. D., et al. (2015). "UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis." Nature 522(7557): 502-506.
- Wittig, I., et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc 1(1): 418-428.
- Worlitzsch, D., et al. (2002). "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients." J Clin Invest 109(3): 317-325.
- Wu, G., et al. (1993). "Mutants of *Escherichia coli* affected in respiration: the cloning and nucleotide sequence of *ubiA*, encoding the membrane-bound p-hydroxybenzoate:octaprenyltransferase." J Gen Microbiol 139(8): 1795-1805.

- Wu, M., et al. (2005). "The *Pseudomonas aeruginosa* proteome during anaerobic growth." J Bacteriol 187(23): 8185-8190.
- Wu, M. T., et al. (2002). "Cytopathic effects observed upon expression of a repressed collagenase gene present in *Salmonella* and related pathogens: mimicry of a cytotoxin from multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phagetype DT104." Microb Pathog 33(6): 279-287.
- Xie, L. X., et al. (2015). "Resveratrol and para-coumarate serve as ring precursors for coenzyme Q biosynthesis." J Lipid Res 56(4): 909-919.
- Xiong, N., et al. (2011). "Expression of a collagenase that enables blood-brain barrier penetration for *Salmonella* implicated in bovine encephalopathies." Microb Pathog 51(3): 230-232.
- Yano, T., et al. (1995). "Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*." J Biol Chem 270(31): 18264-18270.
- Yavin, E., et al. (2006). "Electron trap for DNA-bound repair enzymes: a strategy for DNA-mediated signaling." Proc Natl Acad Sci U S A 103(10): 3610-3614.
- Yen, H.-W. and C.-H. Chiu (2007). "The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on CoQ10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter." Enzyme and Microbial Technology 41(5): 600-604.
- Young, I. G., et al. (1973). "Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: gene-enzyme relationships and intermediates." J Bacteriol 114(1): 42-52.
- Zhao, H., et al. (1999). "Identification of protease and rpoN-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection." Microbiology 145 (Pt 1): 185-195.
- Zhu, Y., et al. (2015). "Structural and biochemical studies reveal UbiG/Coq3 as a class of novel membrane-binding proteins." Biochem J 470(1): 105-114.
- Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev 61(4): 533-616.

Ubiquinone (UQ) is a polyprenylated lipid that plays an important role in electron transport in the respiratory chains of *E. coli*. The aerobic biosynthesis of UQ in *E. coli* requires eight reactions and involves at least twelve proteins (UbiA-UbiK and UbiX). In this work, we demonstrate that seven Ubi proteins form the Ubi complex, a stable metabolon that catalyzes the last six reactions of the UQ biosynthetic pathway. The X-Ray structure of the SCP2 domain of UbiJ forms an extended hydrophobic cavity that could bind UQ intermediates inside the 1-MDa Ubi complex. The Ubi complex is purified from cytoplasmic extracts and UQ biosynthesis occurs in this fraction, challenging the current thinking of a membrane-associated biosynthetic process. UQ is reported to be biosynthesized under both anaerobic and anaerobic conditions. We characterize a novel, O₂-independent pathway for the biosynthesis of UQ. This pathway relies on three proteins, UbiT, UbiU, and UbiV. UbiT contains an SCP2 lipid-binding domain and is likely an accessory factor of the biosynthetic pathway, while UbiU and UbiV (UbiU-UbiV) are involved in hydroxylation reactions and represent a novel class of O₂-independent hydroxylases. We demonstrate that UbiU-UbiV from *E. coli* form a heterodimer, wherein each protein binds a [4Fe-4S] cluster via conserved cysteines that are essential for activity. Moreover, we show that purified UbiU from *P. aeruginosa* is able to bind UQ, suggesting a different role of UbiU and UbiV. UbiU and UbiV belong to peptidase U32 family whose function remains questionable. By bioinformatic analyses, we demonstrated that U32 proteins were characterized by four conserved cysteines important for their enzymatic activities and by biochemical tools, we confirmed that RlhA and TrhP, two others U32 subfamilies, like UbiU and UbiV, are all Fe-S proteins.

L'ubiquinone, ou coenzyme Q (CoQ ou UQ), est un lipide polyprénylé qui joue un rôle important dans le transport des électrons dans les chaînes respiratoires chez *E. coli*. La biosynthèse de l'UQ en aérobie chez *E. coli* nécessite huit réactions et implique au moins douze protéines (UbiA-UbiK et UbiX). Dans ce travail, nous démontrons que les protéines Ubi forment le complexe Ubi, un métabolon stable qui catalyse les six dernières réactions de la voie de biosynthèse. La structure tridimensionnelle du domaine SCP2 d'UbiJ forme une cavité hydrophobe étendue qui lie les intermédiaires de l'UQ à l'intérieur du complexe d'1-MDa. Le complexe Ubi est purifié à partir des extraits cytoplasmiques et la biosynthèse de l'UQ a lieu dans cette fraction, remettant en question l'hypothèse actuelle d'un processus de biosynthèse associé à la membrane. L'UQ est connue pour être synthétisée en aérobie et anaérobie. Nous caractérisons une nouvelle voie de biosynthèse de l'UQ indépendante de l'O₂. Cette voie se repose sur trois protéines, UbiT, UbiU et UbiV. UbiT possède un domaine de liaison aux lipides SCP2 et est probablement un facteur accessoire de la voie de biosynthèse, tandis qu'UbiU et UbiV (UbiU-UbiV) sont impliqués dans les réactions d'hydroxylation et représentent une nouvelle classe d'hydroxylases indépendantes de l'O₂. Nous démontrons qu'UbiU-UbiV d'*E. coli* forme un hétérodimère, chaque protéine se lie à un centre [4Fe-4S] via des cystéines conservées essentielles à l'activité. De plus, nous montrons qu'UbiU purifié de *P. aeruginosa* est capable de se lier à l'UQ, suggérant un rôle différent d'UbiU et d'UbiV. UbiU et UbiV appartiennent à la famille des peptidases U32, dont la fonction reste discutable. Nous démontrons, par des analyses bioinformatiques, que les protéines U32 sont caractérisées par quatre cystéines conservées très importantes pour leurs activités enzymatiques et par des outils biochimiques, nous confirmons que RlhA et TrhP, deux autres sous-familles U32, comme UbiU et UbiV, sont toutes des protéines Fe-S.