



HAL
open science

Etudes des voies de biosynthèse de l'ubiquinone chez les protéobactéries

Katayoun Kazemzadeh Ferizhendi

► **To cite this version:**

Katayoun Kazemzadeh Ferizhendi. Etudes des voies de biosynthèse de l'ubiquinone chez les protéobactéries. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV084 . tel-04764339

HAL Id: tel-04764339

<https://theses.hal.science/tel-04764339v1>

Submitted on 4 Nov 2024

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : Translational Innovation in Medicine and Complexity

Etudes des voies de biosynthèse de l'ubiquinone chez les protéobactéries

Study of ubiquinone biosynthetic pathways in proteobacteria

Présentée par :

Katayoun KAZEMZADEH FERIZHENDI

Direction de thèse :

Ludovic PELOSI
UGA

Directeur de thèse

Fabien PIERREL
CNRS

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

Pr. Laurent AUSSEL

Professeur des universités, Aix-Marseille Université

Pr. Simonetta GRIBALDO

Directrice de recherche, Institut Pasteur, Paris

Thèse soutenue publiquement le **3 novembre 2023**, devant le jury composé de :

Pr. Christelle BRETON

Professeure des universités, Université Grenoble Alpes

Présidente

Pr. Ludovic PELOSI

Professeur des universités, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Dr. Fabien PIERREL

Directeur de recherche, CNRS délégation Alpes

Co-directeur de thèse

Pr. Laurent AUSSEL

Professeur des universités, Aix-Marseille Université

Rapporteur

Pr. Simonetta GRIBALDO

Directrice de recherche, Institut Pasteur, Paris

Rapporteuse

Dr. Anne WALBURGER

Maitresse de conférences, Aix-Marseille Université

Examinatrice



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, Pr. Laurent Aussel, Pr. Simonetta Gribaldo, Pr. Christelle Breton et Dr. Anne Walburger, qui ont accepté de juger mes travaux de thèse.

Je profite de cette occasion pour remercier également mes membres de comité de suivi de thèse, Dr Michael Cherrier, Dr. Axel Magalon et Dr. Bernard Priem.

Ensuite, je souhaite remercier tout particulièrement, tout chaleureusement et du fond du cœur, mes deux directeurs de thèse Ludovic (Seigneur Vador) et Fabien. Merci de m'avoir donné la chance de réaliser un de mes plus grands rêves. Merci pour vos conseils, votre confiance, tous les bons moments passés ensemble et pour avoir supporté mon caractère et mes états d'âmes. Surtout un très grand merci pour votre suivi, votre présence et votre disponibilité depuis mon arrivé au laboratoire pour mes stages jusqu'au moment de la rédaction de ma thèse qui s'est avéré tout particulièrement difficile pour moi. Bref... merci pour tout ce que vous avez fait pour moi durant ces années. J'ai eu l'honneur et la chance de bénéficier de votre encadrement et vous m'avez transmis votre patience, votre enthousiasme ainsi que votre rigueur.

J'adresse également mes remerciements particuliers au Dr. Joël Gaffé qui était mon papa au laboratoire. Merci Joël pour votre écoute, vos conseils et le soutien que vous m'avez apporté durant ces années.

J'exprime mes profonds remerciements au Dr. Mahmoud Hajj Chehad qui quant à lui était mon frère au labo. Merci pour ton écoute et toutes nos discussions à n'importe quel moment du jour et de la nuit.

Une thèse n'étant pas un travail solitaire, je souhaite ensuite remercier tous les membres de notre équipe (5^{ème} et 8^{ème}) pour leur aide, leur bonne humeur et je voudrais m'excuser des nuisances sonores que je leurs ai imposés. Merci à Mikaël Martin, Amélie Amblard, Hélène Coradin, Laura Flandrin, Pr. Corinne Mercier, Dr. Thomas Hindré, Dr. Sophie Abby, Dr. Nelle Varoquaux, Dr. Ivan Junier, Dr. Elena Bülow, Pr. Dominique Schneider, Dr. Margaux Jullien et Dr. Hugo Mathé-Hubert et merci aux meilleures d'EBEC, Sophie-Carole Chobert et Morgane Roger-Margueritat (je pense que nous n'oublierons pas ce voyage...). Merci à tous nos stagiaires. Merci à tous et à toutes...

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe ApicoLipid (IAB) pour toutes les blagues, les plaisanteries et les bons moments que nous avons partagé et un remerciement tout particulier au Dr. Catherine Lemaire Vieille pour ses délicates attentions.

Passons maintenant aux personnes qui m'ont aidé pour les expériences « expérimentations animales ». Merci aux Dr. Corinne Loeuillet de l'équipe GETI (IAB), Dr. Dalil Hannani, Dr. Françoise Blanquet, Dr. Clément Caffaratti de notre équipe et Dr. Bertrand Favier et Dr. Aurélie Bozon de l'équipe T-RAIG (TIMC).

Concernant les collaborateurs, je souhaite remercier Pr. Marc Fontecave, Dr. Murielle Lombrad, Dr. Philippe Simon et Bruno Faivre du Collège de France à Paris et Pr. Frédéric Barras, Dr. Emmanuelle Bouveret, Dr. Rodrigo Arias-Cartin et Emmanuel Séchet de l'Institut Pasteur à Paris pour leur aide, les séances de Zoom et l'unique fois où je les ai rencontrés à Paris. Je remercie également Dr. Isabelle André, Dr. Jérémy Esque et Romain Launay de TBI à Toulouse pour les discussions en Zoom et notre unique rencontre à Grenoble.

C'est le tour de mes amis. Merci Nico, Keul, Yoyo, Pierrot pour votre soutien, encouragements et compréhension. Un très grand merci à ma Gaëlle qui était et est toujours là quand j'ai besoin d'elle et merci également à son Yannick, cette année était toute particulière pour moi, j'ai fêté mes 40 ans et la fin de ma thèse et j'ai partagé ces deux moments particuliers avec vous. Je n'oublierai jamais notre soirée à la Parenthèse qui m'a donné les forces pour rédiger mon manuscrit.

Enfin, je souhaite remercier tous les membres de ma famille en Iran et en France pour leur amour et leur soutien. Merci à mes beaux-parents pour leur soutien illimité et leurs conseils. J'essaye toujours de me souvenir de l'hélico même s'il y a des moments où il décolle difficilement ! Je remercie également ma tata qui a fait tout son possible pour que mes parents soient présents pour ma soutenance.

Les meilleurs des meilleurs des meilleurs... pour la fin. Je remercie mes parents pour tous les sacrifices, leur amour inconditionnel, leurs encouragements. Vous avez fait l'impossible pour que je puisse arriver là où je suis aujourd'hui et sans vous je ne suis rien. Enfin, je remercie mon époux, Christophe. Merci mon joojeh pour ton amour, toutes les attentions, ta patience envers mes sautes d'humeur et mes coups de gueule. Tu as vécu jour après jour tous les hauts et les bas de cette aventure à mes côtés et surtout tu étais présent à chaque instant. Tu sais que cette aventure m'était impossible sans toi.

J'aimerais donc dédier cette thèse à mes parents ainsi qu'à mon époux.

La seule chose absolue dans un monde comme le nôtre, c'est l'humour.

Albert Einstein

| | |
|---|-----------|
| Abréviations | 1 |
| Introduction générale | 3 |
| Introduction bibliographique | 7 |
| I. Quinones isoprénoïdes | 9 |
| I.1. Classes, structure et occurrence | 9 |
| I.1.1. Benzoquinones : structure et occurrence | 9 |
| I.1.2. Naphtoquinones : structure et occurrence | 9 |
| I.2. Structure des chaînes polyisoprényles | 11 |
| I.3. Propriétés rédox | 11 |
| I.4. Localisation, distribution cellulaire et dynamique | 12 |
| I.5. Evolution | 13 |
| I.6. Fonctions | 14 |
| I.6.1. Fonction principale | 14 |
| I.6.2. Autres fonctions | 15 |
| I.6.2.1. Chez les bactéries | 15 |
| I.6.2.1.a. Implication dans des voies métaboliques | 15 |
| I.6.2.1.b. Implication dans la résistance aux stress oxydatif et osmotique et aux antibiotiques | 16 |
| I.6.2.1.c. Implication dans le repliement des protéines | 17 |
| I.6.2.1.d. Implication dans la régulation d'expression de gènes | 17 |
| I.6.2.2. Chez les eucaryotes | 18 |
| II. Métabolismes énergétiques et quinones chez <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| II.1. Fermentation | 19 |
| II.2. Respiration | 20 |
| II.2.1. Organisations et compositions générales des chaînes respiratoires chez <i>E. coli</i> | 22 |
| II.2.1.1. Déshydrogénases initiales | 22 |
| II.2.1.1.a. Déshydrogénases composites | 23 |
| II.2.1.1.b. Déshydrogénases simples | 24 |
| II.2.1.2. Réductases terminales | 24 |
| II.2.2. Respirations aérobie et anaérobie chez <i>E. coli</i> | 27 |
| II.2.2.1. Respiration aérobie | 28 |
| II.2.2.2. Respiration anaérobie | 28 |
| II.2.2.3. Respiration dans l'intestin | 29 |
| II.2.3. Régulation des gènes des complexes respiratoires chez <i>E. coli</i> | 32 |
| II.2.3.1. Régulation par le dioxygène | 32 |
| II.2.3.1.a. FNR | 32 |
| II.2.3.1.b. ArcA/B | 33 |
| II.2.3.2. Régulation par le nitrate | 35 |
| III. Biosynthèse des quinones chez <i>E. coli</i> | 36 |
| III.1. Voies de biosynthèse de l'UQ ₈ | 36 |
| III.1.1. Voie O ₂ -dépendante de biosynthèse de l'UQ ₈ | 36 |
| III.1.1.1. Biosynthèse du précurseur aromatique | 37 |
| III.1.1.2. Biosynthèse du précurseur octaprényl diphosphate | 37 |
| III.1.1.3. Etapes et protéines de la voie Ubi | 40 |
| III.1.1.3.a. Enzymes Ubi | 40 |

| | |
|---|------------|
| III.1.1.3.a.i. Prényltransférase : UbiA | 40 |
| III.1.1.3.a.ii. Décarboxylase : UbiD/UbiX | 42 |
| III.1.1.3.a.iii. Hydroxylases : UbiI, UbiH et UbiF | 44 |
| III.1.1.3.a.iv. Méthyltransférases : UbiE et UbiG | 49 |
| III.1.1.3.b. Protéines accessoires | 50 |
| III.1.1.3.b.i. Protéines de la famille d'UbiB | 50 |
| III.1.1.3.b.ii. Protéines UbiJ et UbiK | 51 |
| III.1.1.4. Organisation supramoléculaire de la voie de biosynthèse de l'UQ | 52 |
| III.1.2. Voie O ₂ -indépendante de biosynthèse de l'UQ ₈ | 53 |
| III.1.2.1. Protéine accessoire UbiT | 54 |
| III.1.2.2. Protéines UbiU et UbiV | 55 |
| III.1.2.3. Les peptidases U32 | 56 |
| III.1.2.4. Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (voie du Shikimate) | 58 |
| III.1.3. Régulation de la biosynthèse de l'UQ ₈ | 60 |
| III.2. Voie de biosynthèse de la MK ₈ | 61 |
| IV. Biosynthèse de l'UQ chez d'autres bactéries et les eucaryotes | 62 |
| IV.1. Etude des voies de biosynthèse de l'UQ chez d'autres bactéries | 62 |
| IV.1.1. Voie de biosynthèse de l'UQ chez <i>X. campestris</i> | 62 |
| IV.1.2. Voie de biosynthèse de l'UQ chez <i>P. aeruginosa</i> | 63 |
| IV.1.3. Voie de biosynthèse de l'UQ chez <i>Salmonella enterica</i> | 64 |
| IV.1.4. Etudes à grande échelle | 64 |
| IV.2. Etude de la voie de biosynthèse de l'UQ chez les eucaryotes | 68 |
| IV.2.1. Etapes et protéines de la voie Coq | 68 |
| IV.2.2. Organisation supramoléculaire de la biosynthèse de l'UQ | 70 |
| IV.2.3. Carence en UQ ₁₀ chez l'Homme | 71 |
| Objectifs de la thèse | 73 |
| I. Voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ | 73 |
| II. Voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ | 73 |
| Résultats | 75 |
| I. Voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ | 77 |
| I.1. Diversification de la biosynthèse de l'ubiquinone par duplications, transferts, pertes et évolution parallèle de gènes | 77 |
| I.2. Voie de biosynthèse de l'ubiquinone contribue à la pathogénicité de <i>Francisella novicida</i> | 123 |
| II. Voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ | 147 |
| II.1. Rôle de la voie UbiUVT- dépendante de biosynthèse de l'ubiquinone dans l'adaptation aux conditions respiratoires changeantes chez <i>Escherichia coli</i> | 147 |
| II.2. Un donneur d'atome d'oxygène organique pour les réactions d'hydroxylation biologique | 179 |
| Discussion générale | 231 |
| Références bibliographiques | 241 |

Abréviations

| | |
|-------------------|--|
| UQ | Ubiquinone ou coenzyme Q |
| MK | Ménaquinone |
| DMK | Déméthylménaquinone |
| RQ | Rhodoquinone |
| PQ | Plastoquinone |
| PhQ | Phylloquinone |
| ROS | Reactive oxygen species |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| DMSO | Diméthyle sulfoxyde |
| TMAO | Triméthylamine N-oxyde |
| 4-HB | 4-hydroxybenzoate |
| FPM | Force protomotrice |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide réduit |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé |
| FMNH ₂ | Flavine mononucléotide réduit |
| FMN | Flavine mononucléotide oxydé |
| FADH ₂ | Flavine dinucléotide réduit |
| FAD | Flavine dinucléotide oxydé |
| LUCA | Last universal common ancestor |
| MEP | Méthylérythritol phosphate |
| ArcA/B | Aerobic respiratory controle |
| FNR | Fumarate/nitrate reductase regulator |
| ARNt | Acide ribonucléique de transfert |
| ARNr | Acide ribonucléique ribosomique |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| RPM | Tour par minutes |
| OHB | 3- Octaprényle-4-hydroxybenzoate |
| DDMQ | Déméthyl-déméthoxyquinone |
| DMQ | Déméthoxyquinone |
| OPP | 3-octaprénylphenol |
| prFMN | FMN prénylé |
| LB | Lysogeny broth |
| WT | Souche sauvage |
| 4-HP ₈ | 3-octaprényl-4-hydroxyphénol |
| SAM | S-adénosyl-méthionine |
| MBP | Matose binding protein |
| pABA | Parahydroxybenzoate |
| 3-HB | 3-hydroxybenzoate |
| DAHP | 3-déoxy-D-arabino-héptulosonique acide-7-phosphate |
| DHQ | 3-dehydroquinone |
| MVA | Mevalonate pathway |
| DHNA | 1,4-dihydroxy-2-naphtoate |
| FMO | Flavine monooxygénase |
| PHBH | p-hydroxybenzoate hydroxylase |
| TIM | Triosephosphate isomerase motif |
| SCP2 | Sterol Carrier Protein 2 domain |

| | |
|-------------------------------|---|
| SIM | Single ion monitoring |
| UV | Ultra-violet |
| Δubi | Mutant par délétion du gène <i>ubi</i> |
| HPLC-ECD | High Performance Liquid Chromatography Coupled To Electrochemical Detection |
| MS | Mass spectrometry |
| SDS | Sodium dodecylsulfate |
| SDS-PAGE | SDS- Polyacrylamid Gel Electrophoresis |
| H ₂ O ₂ | Péroxyde d'hydrogène |
| OH | Groupement hydroxyle ou alcool |
| O ₂ | Molécule d'oxygène ou dioxygène |
| IPP | Isopentényl diphosphate |
| DMAPP | Diméthyl-allyl-diphosphate |
| FPP | Fanésyl pyrophosphate |
| GPP | Géranyl diphosphate |
| PEP | Phosphoénolpyruvic |
| H ⁺ | Proton |
| e ⁻ | Electron |
| OdP | Octaprényle diphosphate |
| CM | Chorismate mutase |
| PDT | Préphénate déshydratase |
| DXP | 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate |
| G3P | Glycéraldéhyde 3-phosphate |

Introduction générale

L'ubiquinone (UQ) connue également sous le nom de coenzyme Q (CoQ) est un composé lipidique qui appartient à la famille des quinones isoprénoïdes. L'UQ est composé d'un noyau aromatique conservé (tête polaire) et d'une chaîne polyisoprénoïde (partie lipidique) dont la taille varie en fonction de l'organisme. Par exemple, l'unité isoprénoïde est répétée 8, 6 et 10 fois respectivement chez *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et l'Homme (Nowicka and Kruk, 2010). Cette chaîne polyprényle cause une localisation membranaire de l'UQ où grâce à sa tête polaire, UQ participe principalement au transfert des électrons et des protons dans les chaînes respiratoires. De ce fait, l'UQ est un composé important pour la bioénergétique de ces cellules (Nowicka and Kruk, 2010).

Les bactéries et les eucaryotes synthétisent classiquement l'UQ en conditions aérobies (ou en aérobiose = en présence de la molécule d'oxygène) via une voie multi-étape qui fait intervenir diverses enzymes et protéines accessoires. Ces voies de biosynthèse ont été largement étudiées chez les bactéries et les eucaryotes en utilisant respectivement *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle (Kawamukai, 2016; Abby *et al.*, 2020). D'après certaines données de la littérature, ces voies de biosynthèse semblent assez bien conservées avec notamment des gènes homologues entre les bactéries et les eucaryotes (Pierrel *et al.*, 2022).

Certaines bactéries possèdent plusieurs types de quinones isoprénoïdes. *E. coli* en possède 3, l'UQ₈, la ménaquinone-8 (MK₈) et la déméthylménaquinone-8 (DMK₈). Dans ses chaînes respiratoires, *E. coli* utilise préférentiellement l'UQ₈ en conditions aérobie et les MK₈/DMK₈ en conditions anaérobies (ou en anaérobiose = en absence de la molécule d'oxygène) (Nitzschke and Bettenbrock, 2018). *E. coli* est capable de synthétiser l'UQ aussi bien en présence (O₂-dépendante) qu'en absence (O₂-indépendante) de la molécule de d'oxygène (Pelosi *et al.*, 2019).

Chez *E. coli*, les voies multi-étapes de biosynthèse de l'UQ₈ font intervenir 15 protéines, UbiA à UbiK, UbiT à UbiV et UbiX. Les protéines, UbiI, H, F, K et J sont essentielles à la voie O₂-dépendante tandis que UbiT, UbiU et UbiV sont essentielles à la voie O₂-indépendante. Les autres protéines sont communes aux deux voies. A l'exception des protéines UbiT, UbiU, UbiV et UbiB dont la fonction reste à élucider, la fonction biochimique et la structure de la plupart de ces protéines sont connues (Abby *et al.*, 2020). De plus, les protéines UbiI, UbiH, UbiF, UbiE, UbiG, UbiK et UbiJ forment un complexe hydrosoluble de 1MDa en conditions aérobies (Hajj Chehade *et al.*, 2019).

Durant cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés aux trois étapes d'hydroxylation des voies de biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries. Chez *E. coli* en

conditions aérobies, ces trois réactions sont catalysées par trois monooxygénases à flavine (FMOs), UbiI, UbiH et UbiF (Pelosi *et al.*, 2016). A l'inverse, en conditions anaérobies et en absence de leur cosubstrat, le dioxygène, ces trois FMOs ne sont plus actives. Il a été proposé que d'autres hydroxylases devraient les remplacer. Néanmoins, à quelle famille d'enzymes appartiennent-elles ? Quel mécanisme moléculaire mettent-elles en jeu ? De plus, chez d'autres bactéries telles que *Rhodospirillum rubrum* et *Neisseria meningitidis*, les trois réactions d'hydroxylation O₂-dépendante sont respectivement catalysées par deux enzymes, UbiL (FMO) et Coq7 (monooxygénase à fer) et une seule enzyme, UbiM (FMO) (Pelosi *et al.*, 2016). Ces dernières données suggèrent une diversité en termes de régiosélectivité (capacité d'une enzyme à hydroxyler une position spécifique sur un substrat) chez les hydroxylases impliquées dans la biosynthèse de l'UQ qu'il est nécessaire de confirmer via une étude à grande échelle

Au cours de cette thèse, j'ai essayé de donner des éléments de réponse aux problèmes soulevés ci-dessus. D'une part, avec l'aide de collaborateurs, j'ai participé à l'identification des hydroxylases impliquées dans la voie O₂-indépendante et j'ai identifié le donneur d'atome d'oxygène pour les réactions d'hydroxylation réalisées en anaérobiose. D'autre part, j'ai étudié l'évolution des hydroxylases de la voie O₂-dépendante qui a conduit à une diversité de combinaison de ces enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries. Enfin, nous avons caractérisé la voie de biosynthèse de l'UQ d'une bactérie pathogène et aérobic stricte, *Francisella novicida*. J'ai pu, en outre, montrer que cette voie contribuait à la pathogénicité de cette bactérie.

Introduction bibliographique

I. Quinones isoprénoïdes

Les quinones isoprénoïdes sont des composées lipophiles très répandus en biologie qui assurent des fonctions physiologiques importantes (Søballe and Poole, 1999; Nowicka and Kruk, 2010). La structure de base de ces quinones est constituée d'un noyau rédox polaire et d'une chaîne polyisoprénoïde apolaire qui confère à ces molécules leurs propriétés liposolubles, notamment en facilitant leur ancrage dans les bicouches lipidiques des membranes biologiques.

I.1. Classes, structure et occurrence

Les quinones isoprénoïdes sont classées en deux grands groupes principaux en fonction de la nature de leur noyau polaire, à savoir le noyau benzoquinone et le noyau naphthoquinone.

I.1.1. Benzoquinones : structure et occurrence

La tête polaire des benzoquinones correspond à un noyau benzénique sur lequel est conjuguée la chaîne polyisoprénoïde sur le carbone 3 (Figure 1A-C). Les trois benzoquinones les plus répandues sont l'ubiquinone (UQ) encore appelée coenzyme Q (CoQ) (Figure 1A), la plastoquinone (PQ) (Figure 1B) et la rholoquinone (RQ) (Figure 1C) (Nowicka and Kruk, 2010; Franza and Gaudu, 2022). Le noyau benzénique de l'UQ est substitué respectivement par deux groupements hydroxyles en positions C1 et C4, un groupement méthyle en position C2 et deux groupements méthoxy en positions C5 et C6. La RQ et la PQ se distinguent de l'UQ de la manière suivante : le groupement méthoxy en position C6 chez l'UQ est remplacé par un groupement amino dans la RQ alors que dans la PQ, deux groupements méthyles remplacent les groupements méthoxy de l'UQ en positions C5 et C6 et le groupement méthyle en position C2 est absent. L'UQ est synthétisée par tous les eucaryotes (coenzyme Q) et par certaines protéobactéries appartenant aux classes α , β et γ (Collins and Jones, 1981). A l'inverse, la RQ est synthétisée par un nombre restreint d'espèces bactériennes (Nowicka and Kruk, 2010) et quelques eucaryotes (Salinas, Langelaan and Shepherd, 2020). Enfin, la PQ est limitée aux cyanobactéries et aux plantes (Nowicka and Kruk, 2010).

I.1.2. Naphthoquinones : structure et occurrence

La tête polaire des naphthoquinones est un noyau de type naphthalène sur lequel est conjugué la chaîne polyisoprénoïde sur la position C3 (Figure 1D-F). Les trois naphthoquinones majeures sont la ménaquinone (MK) appelée communément vitamine K₂ (Figure 1D), la diméthylménaquinone (DMK, un intermédiaire de la biosynthèse de la MK) (Figure 1E) et la

phylloquinone (PhQ) ou vitamine K₁ (Figure 1F) (Søballe and Poole, 1999; Nowicka and Kruk, 2010). Le noyau naphthalène de la MK et de la PhQ est substitué respectivement par deux groupements hydroxyle en positions C1 et C4 et par un groupement méthyl en position C2. Chez la DMK, le groupement méthyl est absent en position C2. La MK et la DMK sont synthétisées par des archées et de nombreux phyla bactériens (Collins and Jones, 1981; Søballe and Poole, 1999; Nowicka and Kruk, 2010). La PhQ est synthétisée par tous les organismes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique tels que les plantes, les cyanobactéries et les algues (Collins and Jones, 1981; Søballe and Poole, 1999; Nowicka and Kruk, 2010).

De façon intéressante, nombreux sont les organismes qui synthétisent plusieurs types de quinones. Par exemples, *Caenorhabditis elegans* synthétise l'UQ et la RQ (Salinas, Langelaan and Shepherd, 2020), *E. coli* et *Salmonella enterica* possèdent l'UQ, la MK et la DMK (Meganathan and Kwon, 2009) alors que *Vibrio costicola* se limite à l'UQ et la MK (Collins and Jones, 1981).

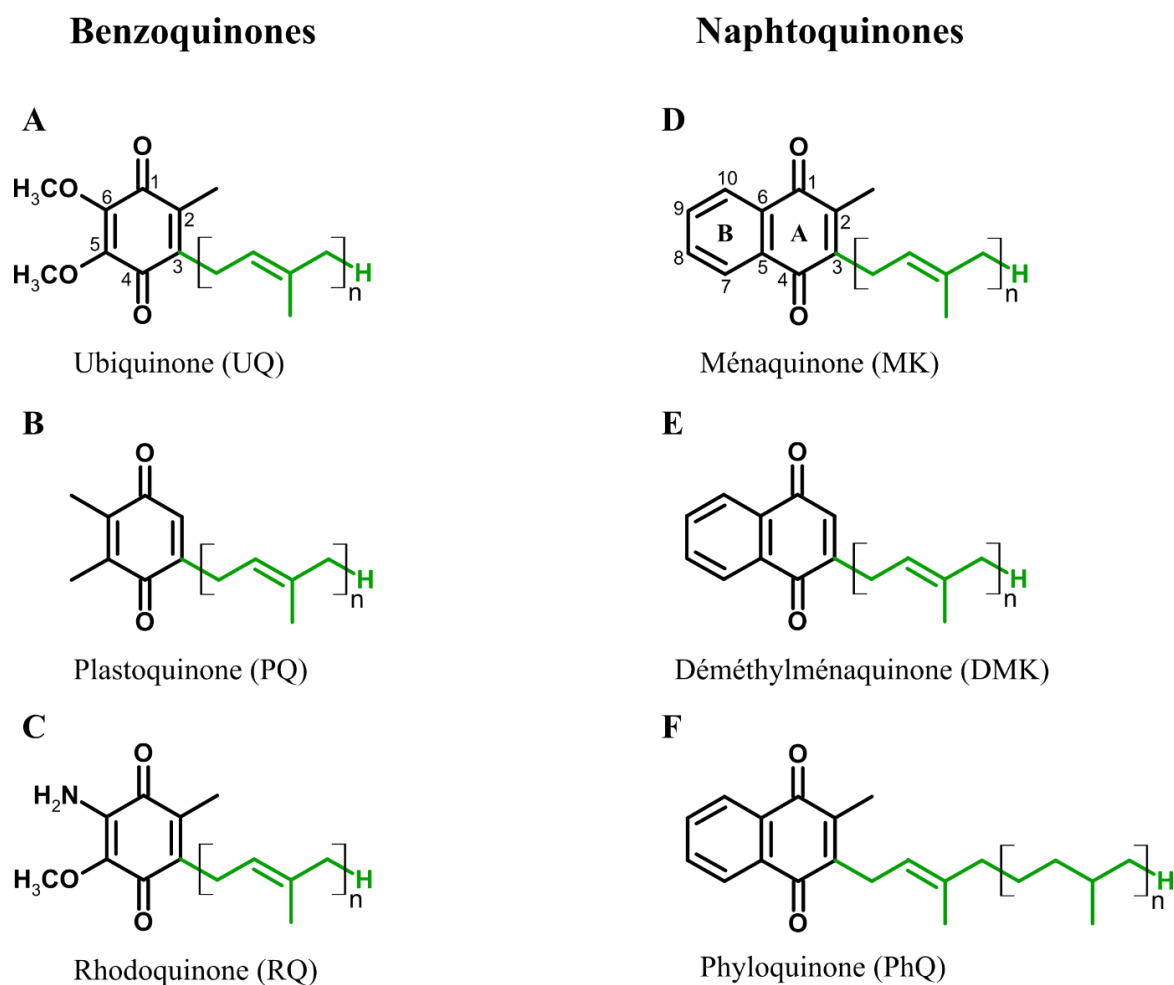


Figure 1. Structure chimique de certaines quinones isoprénoides. Le noyau polaire et la chaîne isoprénoides sont respectivement en noir et en vert. « n » représente le nombre d'unité isoprène. Les numéros des carbones des noyaux polaires sont indiqués pour les benzoquinones et les naphotoquinones sur les molécules d'UQ et de MK. Les quinones sont représentées sous leur forme oxydée.

I.2. Structure des chaînes polyisoprényles

La chaîne polyisoprénoïde est la partie lipophile des quinones isoprénoïdes. Elle est commune aux naphthoquinones et aux benzoquinones. Le nombre d'unités isopréniques constituant cette chaîne varie en fonction de l'organisme (Figure 1). Par exemple, chez *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et l'Homme, il y a respectivement 8 (UQ₈, MK₈ et DMK₈), 6 (UQ₆) et 10 (UQ₁₀) unités isopréniques (la partie de la chaîne entre crochets dans la figure 1). Il faut également ajouter que les quinones isoprénoïdes ont été utilisées comme marqueur taxonomique grâce à la variation de la longueur de chaîne isoprénoïde en fonction des espèces (Hiraishi, 1999).

Comme illustré dans la Figure 1, le degré de saturation de cette chaîne est également variable. L'UQ, la PQ, la RQ, la MK, la DMK possèdent une chaîne insaturée tandis que la PhQ a une chaîne phytyle principalement saturée (Søballe and Poole, 1999). Il faut également noter que certains organismes comme les archées et les mycobactéries possèdent de la MK et de la DMK avec des chaînes partiellement ou totalement insaturées (Elling *et al.*, 2016; Upadhyay *et al.*, 2018).

Le plus souvent, le(s) quinone(s) d'un organisme possède(nt) une chaîne isoprénoïde d'une taille dominante. Néanmoins, des chaînes de degrés de polymérisation inférieurs ou supérieurs peuvent être également observées, mais en faible abondance (Collins and Jones, 1981). Par exemple *E. coli* possède UQ₇₋₈, MK₇₋₈ et DMK₇₋₈ mais les formes plus abondantes sont l'UQ₈, la MK₈ et la DMK₈ (Figure 2).

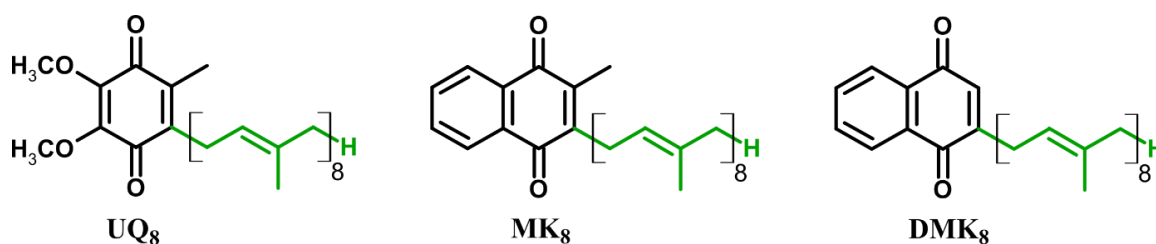


Figure 2. Structure chimique des trois quinones isoprénoïdes majoritaires chez *E. coli*. Le noyau polaire et la chaîne isoprénoïde sont respectivement en noir et en vert. Les quinones dominantes chez *E. coli* possèdent une chaîne octaprényle.

I.3. Propriétés rédox

Le noyau hydrophile des quinones leur confère des propriétés rédox et acidobasiques (Rich, 1984). En effet, ce noyau polaire est capable de subir deux réactions rédox réversibles (Figure 3A et B). Ainsi, l'ajout d'un premier électron et proton réduit les benzoquinones et les naphthoquinones en benzo- et naphtho-semiquinones. Ensuite l'addition du deuxième électron et proton conduit à la formation des benzoquinols (Figure 3A) et des naphthoquinols (Figure 3B)

(Nowicka and Kruk, 2010). Le potentiel rédox des quinones isoprénoïdes diffère en fonction du noyau quinone et des substituants qu'il porte. Par exemple le potentiel rédox du couple UQ_8/UQ_8H_2 est de +113 mV et ceux des couples DMK_8/DMK_8H_2 et MK_8/MK_8H_2 sont respectivement +36 et -74 mV (Wissenbach, Kröger and Uden, 1990; Uden and Bongaerts, 1997; Nitzschke and Bettenbrock, 2018). Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai « quinone » pour faire référence aux quinones isoprénoïdes quel que soit leur état rédox. L'état rédox sera précisé, si nécessaire, en rajoutant le qualificatif « oxydée » ou « réduite ».

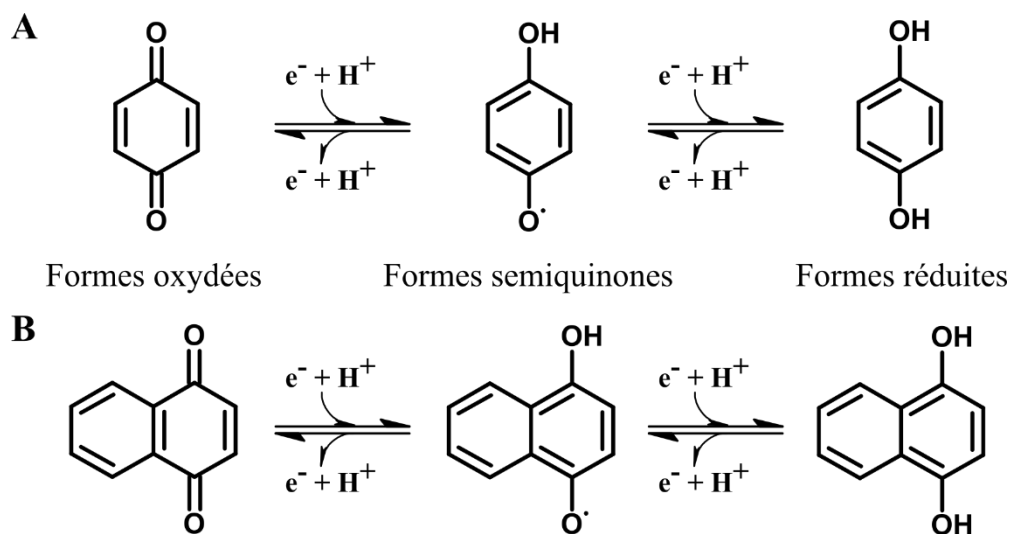


Figure 3. Mécanisme rédox des noyaux polaires des quinones isoprénoïdes. L'ajout d'un et de deux électron(s) sur le noyau oxydé (A) des benzoquinones et (B) des naphthoquinones permet respectivement la formation des formes semiquinone et réduite. Ces réactions sont réversibles.

I.4. Localisation, distribution cellulaire et dynamique

Grâce à leur chaîne hydrophobe, les quinones isoprénoïdes sont localisées au niveau des membranes des cellules (Søballe and Poole, 1999; Nowicka and Kruk, 2010). La MK et la DMK se localisent dans la membrane plasmique des bactéries et des archées. La PhQ et la PQ se trouvent dans les membranes chloroplastiques des organismes qui effectuent de la photosynthèse oxygénique. La PQ a été également trouvée dans des organes non photosynthétiques tels que les racines, les fleurs et les fruits (Nowicka and Kruk, 2010). La RQ se situe dans la membrane plasmique de certaines bactéries pourpres comme *R. rubrum* et dans la membrane interne des mitochondries de quelques eucaryotes tel que *C. elegans*. (Nowicka and Kruk, 2010). Enfin, l'UQ est localisée dans la membrane plasmique des protéobactéries et dans toutes les membranes (du réticulum endoplasmique, de l'appareil de golgi, des peroxysomes, des lysosomes et nucléaire) des eucaryotes (Søballe and Poole, 1999; Stefely and Pagliarini, 2017). Par contre, la synthèse de l'UQ a lieu dans la matrice mitochondriale en

association avec la membrane interne (He *et al.*, 2014). Ces données suggèrent que l'UQ est exportée de son site mitochondrial de biosynthèse vers les autres compartiments cellulaires. Kemmerer et coll. ont récemment démontré que les deux protéines mitochondriales Cqd1 et Cqd2 influencent la distribution cellulaire de l'UQ chez *S. cerevisiae* (Kemmerer *et al.*, 2021). En effet, Cqd2 est impliquée dans le transit de l'UQ de la membrane interne mitochondriale vers des membranes extra-mitochondriales tandis que Cqd1 effectue le processus opposé.

La position et l'orientation des quinones isoprénoïdes dans les bicouches lipidiques ont fait l'objet de différentes études qui ont utilisé la simulation par dynamique moléculaire dans des membranes artificielles avec des compositions variées (Hauß *et al.*, 2005; Galassi and Arantes, 2015; Kaurola *et al.*, 2016; Hoyo, Gaus and Torrent-Burgués, 2017). D'après une revue récente, globalement, les chaînes isoprénoïdes des quinones se positionneraient proches du plan de la membrane tandis que leurs têtes polaires se situeraient plus proches des surfaces hydrophiles et au voisinage des têtes glycérol des lipides membranaires. Comme illustré dans la figure 4, d'une part, plus la taille de la chaîne isoprénoïde est longue, plus elle est proche du plan de la membrane et orientée le long de ce plan et non alignée le long des chaînes hydrogénéocarbonées (Figure 4A). D'autre part, il est présumé que plus la tête de la quinone est polaire, plus elle se trouve proche de la surface de la membrane (Figure 4B) (Braasch-Turi, Koehn and Crans, 2022).

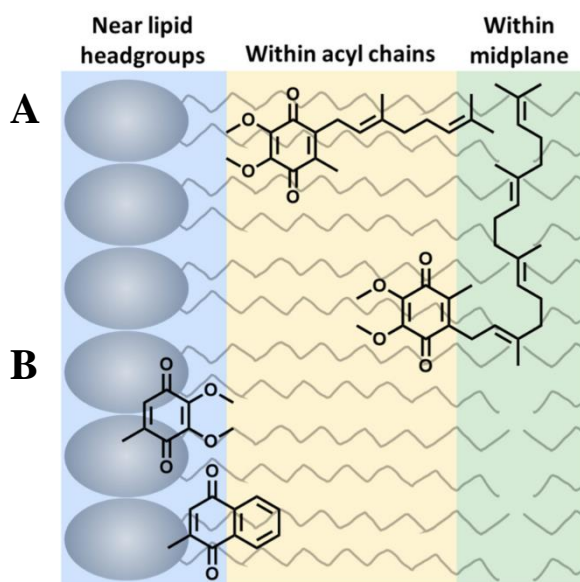


Figure 4. Modèle de la position et de l'orientation des quinones isoprénoïdes dans une bicouche lipidique. L'influence (A) de la chaîne isoprénoïde et sa taille (UQ₂ et UQ₄) ont été montrées comme exemple dans les chaînes acyle ou dans le plan de la membrane) et (B) de la tête polaire (les chaînes isoprénoïdes sont omises pour plus de clarté). Cette figure est tirée de la revue de Braasch-Turi *et al.* (Braasch-Turi, Koehn and Crans, 2022).

I.5. Evolution

La MK et son intermédiaire de biosynthèse, la DMK sont les quinones isoprénoïdes les plus répandues et évolutivement les plus anciennes. Il a été suggéré que la MK largement

répandue chez les bactéries et les archées était la seule quinone supposément présente chez le dernier ancêtre universel commun (LUCA : last universal common ancestor) (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2013). Schoepp-Cothenet et coll. ont proposé que l'UQ est apparue dans l'ancêtre commun des α -, β - et γ -protéobactéries au moment de l'oxygénation à la surface de la terre il y a 2.4 milliards d'années (Holland, 2006; Schoepp-Cothenet *et al.*, 2009). En effet, à cause de leurs potentiel rédox relativement bas, la MK et la DMK sont rapidement oxydées en présence d'O₂. Il a ainsi été proposé que les microorganismes ont innové des quinones présentant des potentiels rédox plus élevés tels que l'UQ et la PQ, qui auront moins tendance à réagir directement avec O₂ (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2009, 2013). Il est intéressant de noter que certains gènes de la voie de biosynthèse de l'UQ (*ubiA*, *ubiX* et *ubiD* par exemple) semblent être dérivés de ceux de la voie fualosine (Ravcheev and Thiele, 2016), qui est l'une des deux voies utilisées par les microorganismes pour synthétiser la MK (Abby *et al.*, 2020). Cette observation renforce l'idée que la MK existait avant l'UQ et donc que la voie de l'UQ est probablement dérivée de celle de la MK.

Les voies de biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries et de la PQ chez les cyanobactéries partagent des protéines homologues (UbiC, UbiA, UbiD/X) ce qui n'est pas le cas de la voie PQ chez les plantes (Abby *et al.*, 2020). A l'opposé des travaux de Ravcheev qui proposent que la voie de l'UQ découle de celle de la MK (Ravcheev and Thiele, 2016), une étude basée sur les analyses phylogénétiques des homologues des protéines UbiA, UbiC, UbiD et UbiH propose que la voie de biosynthèse de l'UQ est dérivée de celle de la PQ (Degli Esposti, 2017). Cependant, l'approche phylogénétique choisie par les auteurs manque de rigueur et en tant que tel ne permet pas d'aborder avec certitude la question des origines relatives des voies de l'UQ et de la PQ (Abby *et al.*, 2020). Enfin, Degli Esposti a également montré que la voie de biosynthèse de l'UQ chez les eucaryotes résulte de l'évolution de celle des α -protéobactéries (Degli Esposti, 2017), ce qui est en accord avec la théorie endosymbiotique postulant que l'ancêtre de la mitochondrie serait une bactérie de la classe sœur des α -protéobactéries (Roger, Muñoz-Gómez and Kamikawa, 2017; Martijn *et al.*, 2018; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022)

I.6. Fonctions

I.6.1. Fonction principale

Grâce à leurs têtes polaires et leurs propriétés rédox, les quinones isoprénoïdes participent au transfert des électrons et des protons entre les complexes des chaînes respiratoires et photosynthétiques. De manière générale, la MK et la DMK qui présentent un potentiel rédox plus bas que celui de l'UQ sont utilisées dans les chaînes respiratoires en conditions anaérobies,

lorsque la molécule d'oxygène (dioxygène ou O₂) est absente. A l'inverse, l'UQ qui est caractérisée par un potentiel rédox élevé, est utilisée dans les chaînes respiratoires en conditions aérobies. Cependant, il a été montré que l'UQ pouvait être également la quinone principale utilisée pour le transport des électrons et des protons dans la chaîne respiratoire anaérobie de *Pseudomonas aeruginosa* (Vo *et al.*, 2020) et dans la chaîne photosynthétique de certaines bactéries pourpre non sulfureuse telle que *Rhodobacter sphaeroides* (Okamura, Isaacson and Feher, 1975). La PhQ et la PQ sont utilisés dans les chaînes photosynthétiques (Nowicka and Kruk, 2010). Enfin, la RQ avec un potentiel rédox bas (-63 mV) est recrutée dans la chaîne photosynthétique anoxygénique (qui ne produit pas de dioxygène) de certaines bactéries et dans la chaîne respiratoire anaérobie de *C. elegans* (Salinas, Langelaan and Shepherd, 2020).

I.6.2. Autres fonctions

En plus du transfert des électrons et des protons dans les chaînes respiratoires et photosynthétiques, les quinones isoprénoïdes possèdent d'autres fonctions physiologiques chez les bactéries et les eucaryotes. Ces fonctions sont résumées ci-après.

I.6.2.1. Chez les bactéries

La plupart des fonctions mentionnées ci-après ont été mise en évidence chez *E. coli* et sont très probablement conservées chez d'autres bactéries. Toutefois, quelques exemples de ces fonctions étudiées dans d'autres bactéries ont été précisés.

I.6.2.1.a. Implication dans des voies métaboliques

Chez *E. coli*, il a été montré que la biosynthèse des hèmes est couplée directement au transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. En effet, HemG, une protéine membranaire à flavine catalysant l'oxydation de porphyrinogène IX, extrait six électrons de son substrat qu'elle injecte dans la chaîne respiratoire via l'UQ₈ ou la MK₈ (Möbius *et al.*, 2010; Franza and Gaudu, 2022). A nouveau chez *E. coli*, des travaux sur la dihydroorotate déshydrogénase (PyrD) qui est impliquée dans la biosynthèse d'un précurseur de l'uridine, ont montré que cette enzyme utilise l'UQ₈ et la (D)MK₈ comme accepteur d'électron respectivement en conditions aérobies et anaérobies (Nørager *et al.*, 2002; Franza and Gaudu, 2022).

I.6.2.1.b. Implication dans la résistance aux stress oxydatif et osmotique et aux antibiotiques

Le stress oxydatif est causé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) tels que le radical superoxyde, le radical hydroxyle, ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les ROS oxydent les macromolécules et entraînent leurs dégradations. Les sources des ROS sont multiples. Il a par exemple été montré que l'acyl-CoA déshydrogénase (FadE) qui est l'enzyme catalysant la première étape de la dégradation des acides gras via la β -oxydation, entraîne une fuite d'électrons et donc la formation de ROS (Agrawal *et al.*, 2017). D'une part, il a été montré chez *E. coli* que la forme oxydée de l'UQ₈ (Figure 3A) accepte et transfère ces électrons aux oxydases terminales, évitant ainsi la production de ROS (Agrawal *et al.*, 2017; Franza and Gaudu, 2022). D'autre part, la forme réduite de l'UQ₈ (Figure 3A) agit comme un scavenger des radicaux libres. Ces données mettent en évidence l'importance de l'UQ₈ comme composé antioxydant chez cette bactérie.

En 2014, Sévin et Sauer ont rapporté une augmentation très importante du contenu en UQ₈ (110 fois) d'*E. coli* lors d'une culture dans un milieu à forte salinité (450 mM NaCl) et ont proposé un rôle osmoprotecteur via une modification de l'hydrophobicité et/ou de la stabilité de la membrane cytoplasmique (Sévin and Sauer, 2014). Néanmoins, cette étude a été remise en cause en 2020 par Tempelhagen et coll. (Tempelhagen *et al.*, 2020) qui n'ont pas observé d'augmentation du contenu de l'UQ₈ lors de cultures d'*E. coli* en milieu salin. Les auteurs ont par contre montré que la sensibilité au stress osmotique de mutants déficients en UQ₈ observée par Sévin et Sauer était en fait liée à une perturbation de la chaîne respiratoire (Tempelhagen *et al.*, 2020). En effet, l'absence d'UQ₈ diminue la force protonmotrice (FPM, voir chapitre II : 2) qui est nécessaire à l'activité de la protéine symporteur de protons (ProP), ce qui entraîne une absorption réduite d'osmolytes zwitterioniques (tels que la proline et la glycine bêtaïne), ce qui impacte négativement la régulation osmotique de la bactérie (Abby *et al.*, 2020; Tempelhagen *et al.*, 2020). Toutefois, il faut noter l'importance d'une augmentation du contenu en MK₇ (~1.5 fois) dans l'adaptation de la fluidité de la membrane pendant la croissance à basse température de la bactérie *Listeria monocytogenes* (Franza and Gaudu, 2022).

La FPM générée par la NADH déshydrogénase est utilisée principalement par l'ATP synthase pour produire de l'énergie (voir chapitre II). Mais elle est également utilisée pour l'import ou l'export des antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Taber *et al.*, 1987; Ezraty *et al.*, 2013). Comme mentionné plus haut, le gradient de proton est altéré en absence d'UQ₈. Par conséquent, la déficience en UQ₈ chez *E. coli* induit une résistance à plusieurs

antibiotiques, notamment ceux de la famille des aminoglycosides tels que la gentamicine et la phléomycine (Aussel *et al.*, 2014).

I.6.2.1.c. Implication dans le repliement des protéines

La formation des ponts disulfures joue un rôle clé dans le repliement des protéines. Chez *E. coli*, ce processus est associé à un système de transport d'électrons (DsbA/B) couplé aux quinones (Hatahet, Boyd and Beckwith, 2014; Franza and Gaudu, 2022). En effet, certaines cystéines des protéines sont oxydées par DsbA (une protéine périplasmique chez *E. coli*), qui est oxydée à son tour par une enzyme membranaire, DsbB qui transfère *in fine* les électrons à l'UQ₈ en conditions aérobies et à la MK₈ en conditions anaérobies. Il faut également noter que des homologues fonctionnels du système DsbA/B ont été identifiés chez d'autres bactéries telle que *Bacillus pseudofirmus* (Hatahet, Boyd and Beckwith, 2014).

I.6.2.1.d. Implication dans la régulation d'expression de gènes

Il a été montré dans la littérature que les quinones isoprénoïdes sont utilisées comme molécules de signalisation par des protéines régulatrices de l'expression de gènes. Quelques exemples sont mentionnés ci-après.

i) Chez *E. coli*, l'état rédox du pool de quinones régule le système à deux composants ArcA/B régulant à son tour, l'expression de gènes impliqués dans la transition anaérobie-aérobie chez cette bactérie (Franza and Gaudu, 2022) (pour plus de détail, voir II.2.3.1.b.). Le même type de mécanisme régulateur a été rapporté chez *Staphylococcus aureus*. En effet, il a été montré chez cette bactérie que l'état rédox de la MK contrôle l'activité du système à deux composants SrrA/B (homologue à ArcA/B). Le système SrrA/B régule l'expression des gènes impliqués dans la virulence, la résistance aux stress oxydatif et nitrosatif, la formation de biofilm et la mort cellulaire (Franza and Gaudu, 2022).

ii) Un autre exemple de régulation par les quinones a été décrit au sujet de la protéine CyaC de *Sinorhizobium meliloti*. CyaC est une nucléotide cyclase de la classe III des adénylates cyclases et contient deux hèmes b nécessaires à son activité. En effet, Wissig et coll. ont montré que *in vitro*, l'activité de CyaC est modulée par l'oxydation et la réduction réversible de ses hèmes, causées par l'ajout de décylubiquinone exogène (ubiquinone avec une chaîne décyl en position C3) (Wissig *et al.*, 2019). Ainsi, *in vivo*, il a été supposé que l'état rédox des quinones respiratoires (probablement l'UQ qui est la quinone majeure de cette bactérie) peuvent conduire à la stimulation ou à l'inhibition de l'activité de cette adénylate cyclase. Ainsi, la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMP_C) pourrait varier en fonction de l'état rédox de la

bactérie, ce qui impacterait alors l'expression des gènes régulés par ce métabolite (Wissig *et al.*, 2019).

iii) Enfin, Floyd et collaborateurs ont montré que dans des souches d'*E. coli* uropathogènes, une déficience partielle en UQ₈ entraîne une diminution de l'expression des pili conduisant un défaut de formation des biofilms et donc de la pathogénicité de ces bactéries (Floyd *et al.*, 2016).

I.6.2.2. Chez les eucaryotes

Comme chez les bactéries, mise à part sa fonction principale dans la respiration cellulaire, l'UQ remplit également d'autres fonctions chez les eucaryotes. Par exemple, à l'état réduit, l'UQ a un rôle antioxydant, notamment pour lutter contre la peroxydation lipidique (Bentinger, Brismar and Dallner, 2007). A l'état oxydé (Figure 3A), l'UQ est impliquée dans la régulation de la croissance et dans la différenciation cellulaire en étant le cofacteur de la NADH oxydase présente dans la membrane plasmique. En effet, cette enzyme réduit l'UQ pendant son cycle catalytique ce qui permet une régulation du rapport NADH/NAD⁺ dans le cytoplasme et la réduction de l'ascorbate (Gómez-Díaz *et al.*, 1997). De plus, l'UQ s'oppose à l'apoptose en inhibant la dépolarisation mitochondriale (Papucci *et al.*, 2003) et protège les cellules contre la ferroptose (une forme de mort cellulaire causée par la peroxydation fer-dépendante des lipides) en évitant la peroxydation lipidique (Bersuker *et al.*, 2019; Deshwal *et al.*, 2023). Enfin, l'UQ est également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes (Döring *et al.*, 2007) et dans le repliement des protéines (Franza and Gaudu, 2022).

Les eucaryotes ne synthétisent pas de MK (Vitamine K₂), mise à part les végétaux qui synthétisent une molécule très proche, la PhQ (vitamine K₁). Or la vitamine K est un cofacteur essentiel pour les modifications post-traductionnelles des protéines impliquées dans la coagulation sanguine et le métabolisme osseux (Huang *et al.*, 2014). Par conséquent, ces quinones sont apportées par l'alimentation (Mladěnka *et al.*, 2022).

II. Métabolismes énergétiques et quinones chez *Escherichia coli*

La bactérie *E. coli* étant l'organisme modèle principal utilisé dans le cadre des projets que j'ai menés pendant mon doctorat, j'ai jugé opportun de présenter le métabolisme énergétique de cette bactérie et ces différents acteurs. *E. coli* est une γ -protéobactérie anaérobie facultative, gram-négatif qui présente une morphologie de type bâtonnet (coliforme). Son habitat naturel est l'intestin des vertébrés, un environnement pauvre en oxygène (Zheng, Kelly

and Colgan, 2015). Cette bactérie est capable de produire de l'énergie à partir d'une grande variété de source de carbone et *via* deux grandes voies métaboliques : la fermentation et la respiration (aérobie et anaérobie). Ces voies métaboliques sont décrites brièvement ci-après.

II.1. Fermentation

La fermentation est un type de métabolisme hétérotrophe. En absence de dioxygène et des autres accepteurs terminaux d'électron, *E. coli* fermente des sucres tel que le glucose pour obtenir une source de carbone synthétiser de l'ATP. Brièvement, une molécule de glucose va être oxydée de manière incomplète par la glycolyse pour produire deux molécules de pyruvate. Ce processus qui produit également deux molécules d'ATP, est accompagné de la réduction de 2 molécules de NAD^+ en NADH (Figure 5A). Pour pouvoir conserver l'équilibre NAD^+/NADH , les équivalents NADH ainsi produits vont servir de donneur d'électron pour réduire à leur tour, le pyruvate ou un de ces dérivés (Figure 5A et B). Cela conduit à la production d'un mélange d'acétate, d'éthanol, de lactate, de formate et d'une petite quantité de succinate (Clark, 1989; Förster and Gescher, 2014). Le métabolisme fermentaire s'accompagne également d'une production abondante de dihydrogène et de dioxyde de carbone (Figure 5B). Le rendement énergétique de la fermentation (2 à 3 moles d'ATP/mol de glucose) est largement inférieur à celui de la respiration (8 à 13 et 38 moles d'ATP/mol de glucose respectivement pour respirations anaérobie et aérobie), mais est néanmoins suffisant pour permettre la croissance bactérienne lorsque la respiration n'est pas possible.

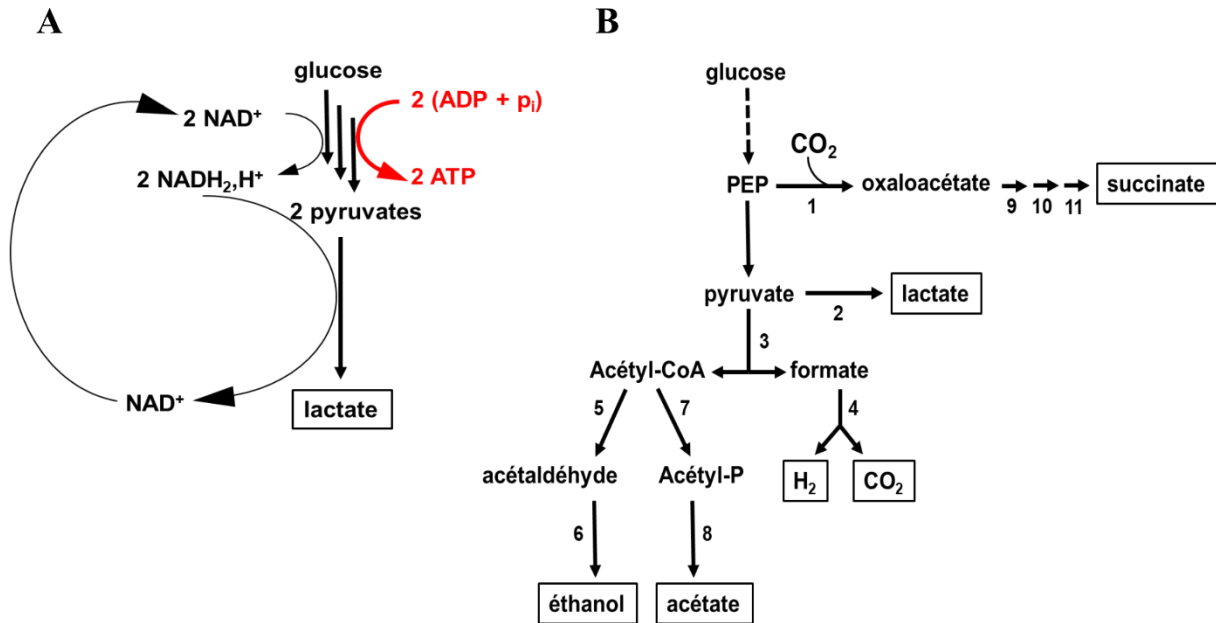


Figure 5. Métabolisme fermentaire chez *E. coli* et produits dérivés. (A) Exemple de fermentation lactique. Le glucose est converti en 2 molécules de pyruvate lors de la glycolyse et ce processus produit deux molécules d'ATP. En absence d'accepteur terminal d'électron les deux molécules NADH₂ produits également par la glycolyse réduisent le lactate pour générer NAD⁺. (B) En absence d'accepteur terminal d'électron, les réactions de fermentation (indiquées par les flèches pleines) auront lieu conduisant à la production d'ATP et d'autres composés issus de la dégradation du glucose (les produits encadrés). Les numéros sur les flèches symbolisent les enzymes qui catalysent ces réactions et elles sont des suivantes : 1, phosphoénolpyruvic (PEP) carboxylase carboxylase ; 2, lactate déshydrogénase ; 3, pyruvate formate lyase ; 4, formate hydrogène lyase ; 5, acétaldéhyde déshydrogénase ; 6, alcool déshydrogénase ; 7, phosphotransacétylase ; 8, acétate kinase ; 9, malate déshydrogénase ; 10, fumarate B ; 11, fumarate réductase. Adapté de Gunsalus *et al.* (Gunsalus and Park, 1994).

II.2. Respiration

La respiration est un autre type de métabolisme hétérotrophe. En présence d'un accepteur terminal d'électron, *E. coli* effectue le processus de phosphorylation oxydative permettant le transfert des électrons dans ses chaînes respiratoires jusqu'à un accepteur final. Le transfert des électrons s'accompagne d'une translocation des protons à travers la membrane plasmique, créant ainsi un gradient électrochimique de protons (H⁺) correspondant à la FPM. Cette dernière est ensuite utilisée par l'ATP synthase pour générer de l'ATP (Figure 6A). *E. coli* est capable de respirer en conditions dite « aérobies » si l'accepteur terminal d'électron est l'O₂ (Figure 6B) ou en conditions « anaérobies » si l'accepteur terminal d'électron est un composé autre que l'O₂ (nitrate, nitrite, DMSO, *etc.*) (Uden and Bongaerts, 1997; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

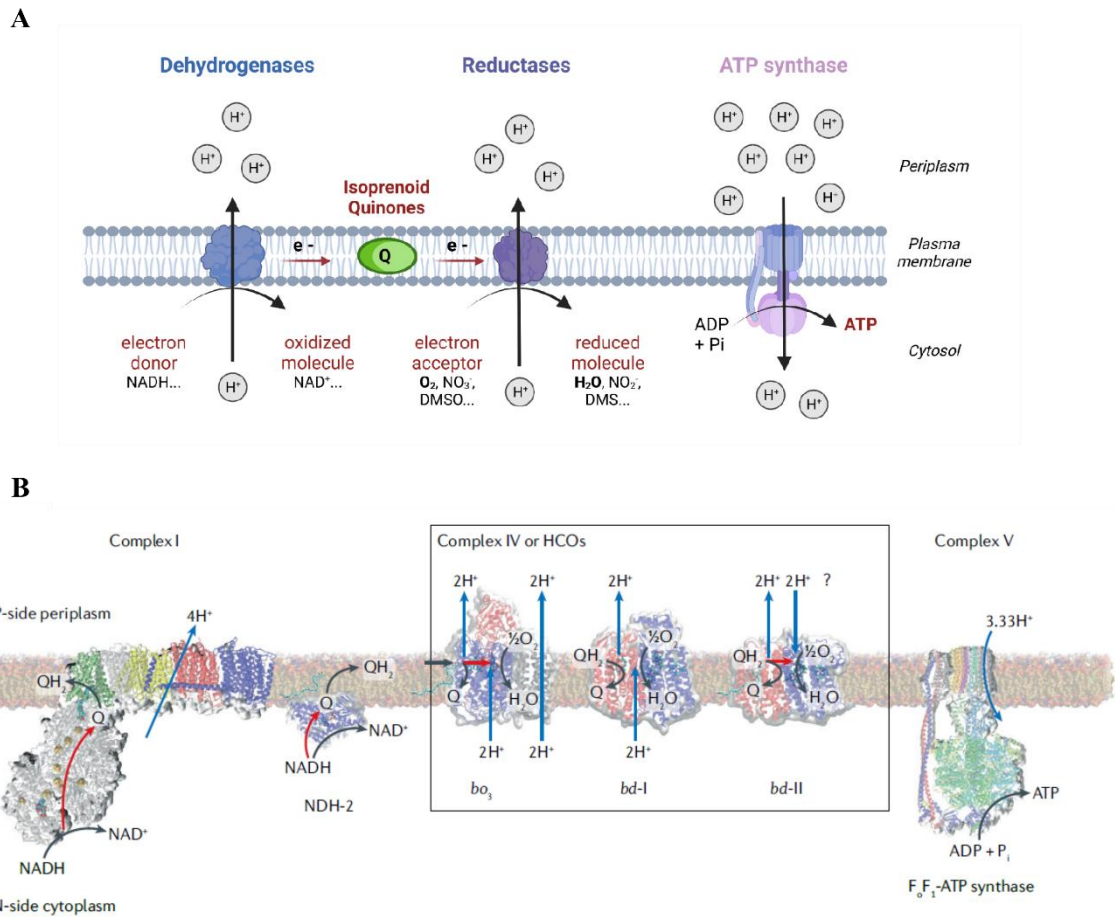


Figure 6. Chaines respiratoires d'*E. coli*. (A) Schéma reprenant des différents composants des chaines respiratoires d'*E. coli*. Les déshydrogénases initiales récupèrent les électrons à partir des donneurs d'électrons et les introduisent dans les chaines respiratoires. Ces électrons (e^-) ensuite sont transférés aux réductases terminales via des quinones isoprénoides. Ces réductases utilisent ces électrons pour réduire des accepteurs terminaux d'électrons. Le transfert des électrons est associé avec la translocation des protons (H^+) dans l'espace périplasmique. Enfin, ces H^+ sont utilisée par ATP synthase pour produire de l'ATP. Les flèches noirs courbées et verticales et les flèches rouges indiquent respectivement les réactions chimiques, le sens de transfert des protons, et des électrons (B) Exemple des chaines respiratoires aérobies d'*E. coli*. Ce schéma représente la chaîne transfert d'électron à partir des deux déshydrogénase initiales NADH I (complexe I) et II (NDH-2) vers les trois réductases terminales (complexe IV ou HCOs pour hème-cuivre oxydases), bo3, bd-I et bd-II complexes en passant par les quinones isopréoides (Q, quinone à l'état oxydé et QH_2 , quinone à l'état réduit). P-side periplasm et N-side cytoplasm représentent respectivement le côté périplasmique chargée positivement et celui cytoplasmique chargé négativement de la membrane plasmique. Les flèches noirs, bleues et rouges indiquent respectivement les réactions chimiques, le sens de transfert des protons et des électrons. Le panel B est tiré de la revue de Kaila *et al.* (Kaila and Wikström, 2021).

II.2.1. Organisations et compositions générales des chaînes respiratoires chez *E. coli*

Les chaînes respiratoires d'*E. coli* sont structurées autour de trois composants, une déshydrogénase initiale, une réductase terminale, et les quinones octaprényles (Figure 2) (Figure 6A) (Unden and Bongaerts, 1997; Kaila and Wikström, 2021). *E. coli* possède plusieurs déshydrogénases (Tableau 1 et Figure 7A) et réductases (Tableau 2 et Figure 7B) ainsi que ces trois quinones (Figure 2) qui lui permettent de varier la composition de ses chaînes respiratoires en fonction des conditions environnementales et selon la disponibilité des donneurs et des accepteurs d'électrons (Unden and Bongaerts, 1997; Sharma *et al.*, 2012). Les déshydrogénases initiales extraient les électrons d'un substrat carboné réduit, les réductases terminales transfèrent ces électrons à un accepteur terminal et les quinones transfèrent les électrons entre les déshydrogénases initiales et les réductases terminales (Figure 6A et B).

La composition, la topologie et la taille des hydrogénases initiales et les réductases terminales sont variées (Figure 7A et B). De multiples cofacteurs rédox (FAD, FMN, cluster FeS, hèmes, *etc...*) permettent d'assurer le transfert des électrons au sein de ces complexes (Unden and Bongaerts, 1997) Le sens de ce transfert d'électrons est dicté par le potentiel rédox des différents constituants et se fait du potentiel rédox le plus bas vers le plus élevé (Figure 6A et B). Il a été calculé qu'un transfert optimal d'électrons entre le donneur initial et l'accepteur final nécessite environ 150-200 mV (Sharma *et al.*, 2012). *E. coli* possède une chaîne respiratoire ramifiée permettant une multitude de combinaisons (Unden and Bongaerts, 1997; Magalon and Alberge, 2016).

II.2.1.1. Déshydrogénases initiales

E. coli possède plusieurs déshydrogénases initiales et certaines sont décrites génétiquement et biochimiquement. (Unden and Bongaerts, 1997; Magalon and Alberge, 2016; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Ces déshydrogénases sont listées dans le tableau 1. Elles oxydent différents substrats (le NADH, le succinate, le lactate, l'hydrogène, *etc...*) et récupèrent les électrons pour les introduire dans les chaînes respiratoires. A l'exception de la succinate déshydrogénase qui transfère ses électrons uniquement à l'UQ₈ (Wallace and Young, 1977b; Cecchini *et al.*, 2002, 2003), toutes les autres déshydrogénases initiales sont capables de donner leurs électrons aux trois quinones (sous leur forme oxydée, Figure 3) d'*E. coli*. (Unden and Bongaerts, 1997; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Ces déshydrogénases adoptent des compositions, des topologies et des orientations variées (Figure

7A) et il est possible de distinguer deux grands groupes chez *E. coli* : composites et simples. (Unden and Bongaerts, 1997; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

| Enzyme | Gènes | Potentiel redox (mV) | Couple rédox | Quinone utilisée | Groupe | FPM | |
|------------------------------|----------------|----------------------|---|---|-----------------|-----------|-----|
| NADH DH I | <i>nuoA-N</i> | -320 | NAD ⁺ / NADH | UQ ₈ , (D)MK ₈ | Composite | Oui | |
| NADH DH II | <i>ndh</i> | -320 | | | Simple | Non | |
| Pyruvate DH | <i>poxB</i> | -639 | Acétate + CO ₂ / Pyruvate | | Simple | Non | |
| Formiate DH | <i>fdnGHI</i> | -432 | CO ₂ / Formiate | | Composite | Oui | |
| Formiate DH | <i>fdoGHI</i> | -432 | | | Composite | Oui | |
| Hydrogénases 1 | <i>hyaABC</i> | -414 | H ⁺ / H ₂ | | Composite | Oui | |
| Hydrogénases 2 | <i>hybCOAB</i> | -414 | | | Composite | Oui | |
| D-lactate DH | <i>dld</i> | -190 | Pyruvate / D- Lactate | | Simple | Non | |
| L-lactate DH | <i>lldD</i> | -190 | Pyruvate / L-Lactate | | Simple | Non | |
| Glycérol-3-P DH | <i>glpD</i> | -190 | Dihydroxy-acetone- P / Glycérol-3-P | | Simple | Non | |
| Glycérol-3-P DH | <i>glpABC</i> | -190 | Dihydroxy-acetone- P / Glycérol-3-P | | Composite | Non | |
| Malate : Q oxydoréductase | <i>mgo</i> | -172 | Oxaloacétate / Malate | | Simple | Non | |
| Glucose DH | <i>gcd</i> | -140 | Gluconate / Glucose | | Simple | Non | |
| Succinate DH | <i>sdhABCD</i> | +30 | Fumarate / Succinate | | UQ ₈ | Composite | Non |

Tableau 1 : Les déshydrogénases initiales d'*E. coli*. DH, déshydrogénase ; Q, quinone. Ce tableau est adapté de (Unden and Bongaerts, 1997; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014; Magalon and Alberge, 2016).

II.2.1.1.a. Déshydrogénases composites

Les déshydrogénases composites sont constituées de plusieurs sous-unités et possèdent un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile. Le domaine hydrophobe assure l'ancrage à la membrane et contient le site de liaison aux quinones tandis que le domaine hydrophile qui s'étend soit dans l'espace cytoplasmique (NADH et succinate déshydrogénases) soit dans l'espace périplasmique (hydrogénases et formiate déshydrogénase) contient le site fixant le substrat à oxyder (Figure 7A). A l'exception de la succinate déshydrogénase (SdhCDAB) qui est la seule enzyme de ce groupe dépourvue de la capacité de translocation des protons, les autres déshydrogénases caractérisées telles que la NADH déshydrogénase I (NuoA-N), les hydrogénases HyaABC et HybCOAB, et les formiate déshydrogénases, FdnGHI et FdoGHI sont capables de générer une FPM (Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

II.2.1.1.b. Déshydrogénases simples

Les déshydrogénases simples possèdent une seule sous-unité. Ce sont les déshydrogénases les plus fréquentes chez *E. coli*. Elles sont associées à la membrane et elles possèdent un domaine hydrophile peu étendu. Leur site de fixation au substrat est principalement orienté vers le cytoplasme et reste spécialement proche du site de liaison aux quinones (Figure 7A). Notons que les enzymes de ce groupe ne produisent pas de gradient de proton (Simon, van Spanning and Richardson, 2008; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). La glycérol déshydrogénase (GlpD), la NADH déshydrogénase II (Ndh), les lactates déshydrogénases (DldD et LldD) sont quelques-unes des enzymes appartenant à ce groupe.

II.2.1.2. Réductases terminales

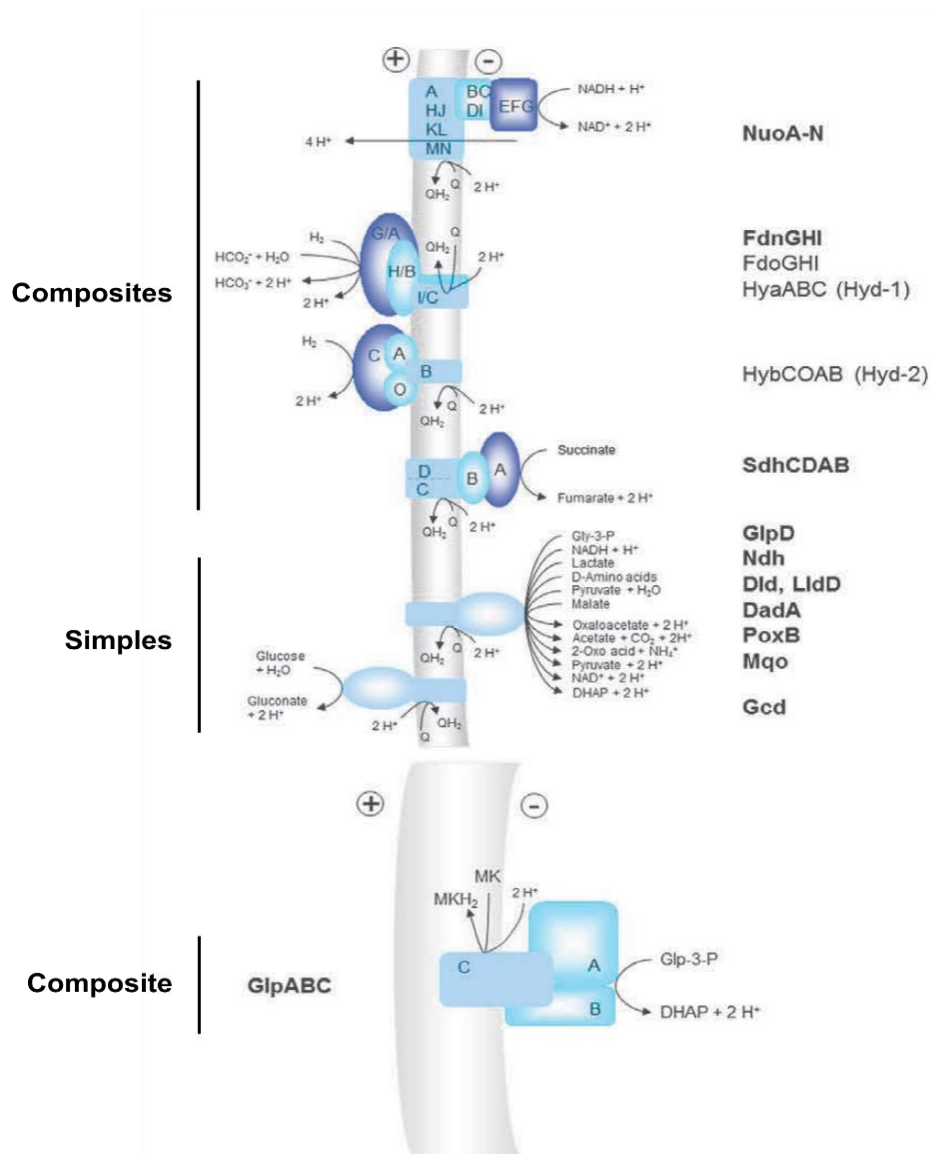
E. coli possède également plusieurs réductases terminales (Uden and Bongaerts, 1997; Magalon and Alberge, 2016; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Ces enzymes sont listées dans le tableau 2. Toutes les réductases terminales récupèrent les électrons à partir des quinones réduites (Figure 3) et les transfèrent à leur accepteur terminal d'électrons. Les sept accepteurs terminaux d'électrons chez *E. coli* sont la molécule d'oxygène, le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-), le fumarate, l'oxyde de triméthylamine (TMAO), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et enfin le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). De plus, une étude récente révèle l'existence d'un opéron codant une tétrathionate réductase dans une souche d'*E. coli* (EcoFA807-17) isolée à partir d'aliments destinés aux animaux de recherche (Adsit *et al.*, 2022). Les auteurs ont proposé que cet opéron pourrait permettre à cette souche d'*E. coli* l'utilisation du tétrathionate comme accepteur terminal d'électrons ce qui pourrait améliorer sa respiration anaérobie dans l'intestin (Adsit *et al.*, 2022). Tout comme les déshydrogénases initiales, les réductases terminales adoptent des compositions, des topologies et des orientations variées (Figure 7B). Mais à l'opposé des déshydrogénases initiales, les réductases terminales sont toutes des enzymes « composites » et il n'existe pas de réductases avec une seule sous-unité chez *E. coli*. Les réductases terminales sont classées en deux grandes familles selon leur propriété d'hydrophilie et d'hydrophobicité (Uden and Bongaerts, 1997). Le premier groupe est intégralement membranaire avec un domaine hydrophile peu étendu. Ses représentants chez *E. coli* sont les oxydases bo_3 (CyoABCD), bd-I (CydAB) et bd-II (AppBCX) qui utilisent la molécule d'oxygène comme accepteur final d'électrons. Ces trois enzymes sont capables de générer de la FPM (Uden and Bongaerts, 1997; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Le deuxième groupe de réductases terminales possède un domaine hydrophobe qui permet à ces enzymes d'être localisées à la membrane et un domaine hydrophile plus étendu. Le domaine hydrophobe

contient le site de liaison aux quinones. Celui hydrophile assure la réduction de l'accepteur final d'électron. Sa localisation peut être cytoplasmique (comme les nitrate réductases A et Z (NarGHI et NarZYV) et la fumarate (FrdABCD) réductase) ou périplasmique (Unden and Bongaerts, 1997; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Dans le second cas, les sous-unités de domaine périplasmique peuvent être liés à la partie membranaire de manière permanente comme dans le cas de la DMSO réductase (DmsABC) ou alors une ou deux sous-unité(s) de ce domaine interagissent transitoirement avec le reste de complexe et peuvent exister sous forme soluble dans le périplasma comme pour la TMAO (TorAC et TorZY), la nitrate (NapABCGH) et la nitrite (NrfABCD) réductases (Figure 7B) (Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Mise à part les deux nitrates réductases A and Z qui sont capables de produire une FPM, les autres enzymes de ce groupe sont dépourvues de cette capacité (Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Toutefois, une activité de pompe à proton a été décrite chez la nitrate réductase NapABCGH de façon dépendante de ses sous-unités NapGH (Brondijk *et al.*, 2002; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). A l'exception de la fumarate réductase, toutes les enzymes de ce groupe incorporent un cofacteur à molybdoptérine (molybdenum-bis-pyranoptérin guanine dinucléotide) dans leur site actif qui est essentiel à leur activité (Winter *et al.*, 2013; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014; Arias-Cartín *et al.*, 2022).

| Enzyme | Gènes | Potentiel redox (mV) | Substrat/produit | Quinone utilisée | FPM |
|------------------------------------|-----------------|----------------------|--|--------------------------------------|-----|
| Fumarate réductase | <i>frdABCD</i> | +30 | Fumarate / Succinate | (D)MK ₈ | Non |
| TMAO réductase | <i>torCA</i> | +130 | TMAO / TMA | (D)MK ₈ | Non |
| TMAO réductase | <i>torZY</i> | +130 | | Indisponible | Non |
| DMSO réductase | <i>dmsABC</i> | +160 | DMSO / DMS + H ₂ O | (D)MK ₈ | Non |
| Nitrite réductase | <i>nrfABCD</i> | +360 | NO ₂ ⁻ / NH ₃ | (D)MK ₈ | Non |
| Sélénate réductase | <i>ynfEFGH</i> | +425 | SeO ₄ ²⁻ / SeO ₃ ²⁻ + H ₂ O | Indisponible | Non |
| Nitrate réductase A | <i>narGHI</i> | +433 | NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻ | UQ ₈ , (D)MK ₈ | Oui |
| Nitrate réductase Z | <i>narZYV</i> | +433 | | UQ ₈ , (D)MK ₈ | Oui |
| Nitrate réductase | <i>napABCGH</i> | +433 | | UQ ₈ , (D)MK ₈ | Non |
| Cytochrome oxydase bo ₃ | <i>cyoABCD</i> | +820 | O ₂ / H ₂ O | UQ ₈ , DMK ₈ | Oui |
| Cytochrome oxydase bdII | <i>appCB</i> | +820 | | UQ ₈ , DMK ₈ | Oui |
| Cytochrome oxydase bdI | <i>cydAB</i> | +820 | | UQ ₈ , DMK ₈ | Oui |

Tableau 2 : Les oxydases et les réductases terminales d'*E. coli*. Ce tableau est adapté de (Wissenbach, Kröger and Unden, 1990; Unden and Bongaerts, 1997; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014; Rendon *et al.*, 2015).

A



B

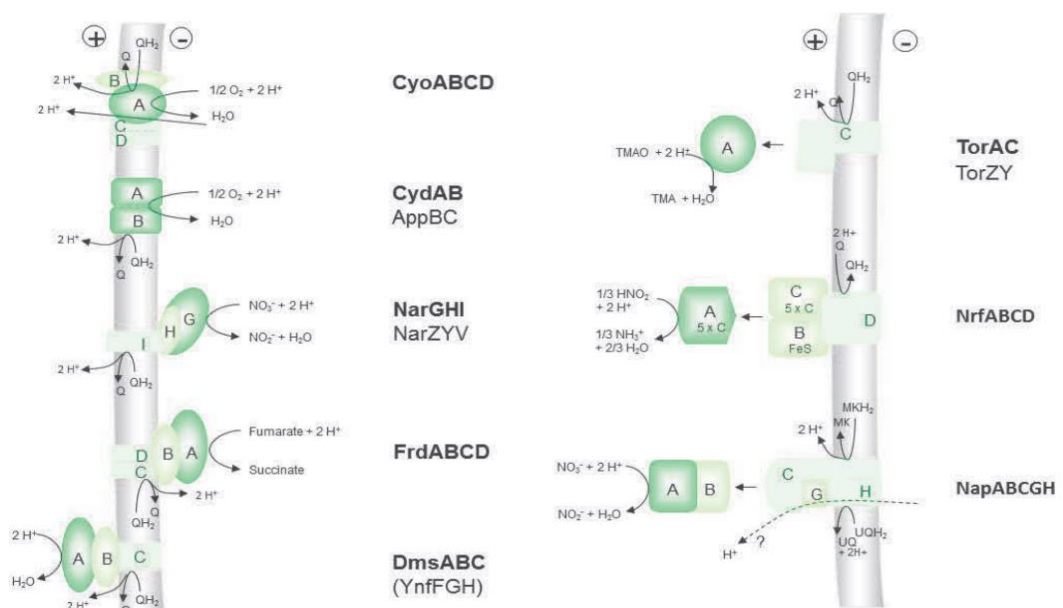


Figure 7. Topologies, architecture et sites actifs des déshydrogénases et réductases respiratoires chez *E. coli*. L'orientation, la composition et la réaction chimique catalysée par (A) les déshydrogénases initiales (GlpABC est séparée des autres déshydrogénases composites car elle diffère par le type d'ancrage à la membrane et le groupe rédox membranaire) et (B) les réductases terminales au niveau de la membrane plasmique d'*E. coli*. Les noms des enzymes pour lesquelles la topologie des enzymes et des sites actifs sont appuyés par des preuves expérimentales ou d'autres indications directes sont en gras (sauf pour GlpABC qui est un modèle hypothétique et principalement dérivé d'analyses *in silico*). Pour d'autres enzymes, la topologie et l'orientation des sites actifs sont principalement issus d'analyses *in silico*. Les noms des enzymes et les gènes qui codent pour ces enzymes sont disponibles dans les tableaux 1 et 2. Q et QH₂ représentent les quinones (états oxydés et réduits) et peuvent être l'ubiquinone ou la ménaquinone sauf pour MK/MKH₂ et UQ/UQH₂ qui désignent respectivement la ménaquinone et l'ubiquinone à l'état oxydée et réduit. Adapté de Uden *et al.* (Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

II.2.2. Respirations aérobie et anaérobie chez *E. coli*

Le choix d'utilisation des déshydrogénases initiales dans la chaîne respiratoire d'*E. coli* est principalement déterminé par la nature des accepteurs terminaux d'électrons disponibles. En effet, l'expression de plusieurs déshydrogénases initiales est régulée par les accepteurs d'électron tels que le dioxygène et le nitrate. Un grand nombre de déshydrogénases sont exprimées en présence de dioxygène (Uden and Bongaerts, 1997). En revanche, en absence de dioxygène et en présence de DMSO, de TMAO ou de fumarate, d'autres déshydrogénases sont exprimées (Uden and Bongaerts, 1997; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Par exemple en respiration anaérobie sur fumarate, les déshydrogénases produites sont les hydrogénases Hya et Hyb tandis que la formiate déshydrogénase (FdnGHI) est privilégiée quand le nitrate ou le nitrite sont les accepteurs terminaux d'électrons. La glycérol déshydrogénase (GlpABC) est exprimée en conditions anaérobies. Il a été présumé qu'elle puisse coupler l'oxydation du glycérol-3-P à la respiration du fumarate et du nitrate (Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014) La NADH déshydrogénases I est constitutive quelles que soient les conditions d'oxygénation. Par contre, son isoforme II est principalement exprimée en présence de dioxygène et en quantité limitée en absence de dioxygène mais en présence de nitrate. Par conséquent, la NADH déshydrogénase II est principalement utilisée en conditions aérobie et la I en conditions anaérobies avec le fumarate ou le DMSO comme accepteur terminal d'électrons (Uden and Bongaerts, 1997; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

Les accepteurs terminaux d'électrons déterminent également le choix des réductases terminales qui seront utilisées. Quant à la nature des quinones respiratoires utilisées, elle est surtout déterminée par la pression en dioxygène et le potentiel rédox des accepteurs terminaux. (Uden and Bongaerts, 1997; Søballe and Poole, 1999; Sharma *et al.*, 2012; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

II.2.2.1. Respiration aérobie

En aérobiose, le dioxygène est l'accepteur terminal d'électrons et *E. coli* utilise une des trois oxydases, bo₃ (CyoABCD), bd-I (CydAB) ou bd-II (AppBCX), pour réduire la molécule de dioxygène en eau (Figure 6B). L'oxydase bo₃ qui présente la plus faible affinité pour l'O₂ est la plus exprimée lorsque la pression en O₂ est élevée (% d'oxygène dissout supérieur à 4) (Tseng, Albrecht and Gunsalus, 1996). A l'inverse, les oxydases bd-I et bd-II qui sont caractérisées par une bien meilleure affinité pour l'O₂ sont plus exprimées en conditions microaérobies (% d'oxygène dissout 0.4 à 3) et même en conditions anaérobies strictes pour bd-II (Tseng, Albrecht and Gunsalus, 1996; Borisov *et al.*, 2011). Même si les trois quinones d'*E. coli* (Figure 2) sont présentes en conditions aérobie, la quinone la plus abondante est l'UQ₈ et cette quinone fonctionne de manière optimale avec les trois oxydases. Cependant, il a été démontré que la DMK₈ peut également être utilisée comme donneur d'électrons aux trois oxydases (Sharma *et al.*, 2012).

Notons que la nitrate réductase Z (NarZYV) est exprimée de manière constitutive (Bonnefoy and Demoss, 1994) et que son expression n'est donc pas induite par le nitrate contrairement aux deux autres nitrates réductases d'*E. coli* (NarGHI et NapABCGH). Il a été proposé que cette enzyme soit une nitrate réductase fonctionnant en aérobiose dans des conditions de stress où l'adaptation et la survie de la bactérie repose sur la respiration du nitrate (Chang *et al.*, 1999; Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014). Il a également été proposé que la nitrate réductase Z (NarZYV) peut, tout comme la nitrate réductase A (NarGHI), (voir paragraphe II.2.2.2) (Unden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014) utiliser l'UQ₈, la MK₈ (Wissenbach, Kröger and Unden, 1990; Unden and Bongaerts, 1997) et la DMK₈ (Rendon *et al.*, 2015) comme donneur d'électrons.

II.2.2.2. Respiration anaérobie

Ce type de respiration produit moins d'énergie que la respiration aérobie mais plus que la fermentation. En absence d'O₂, d'autres molécules peuvent être utilisées comme accepteur terminal d'électrons dans la chaîne respiratoire d'*E. coli*. En fonction de la disponibilité de leurs substrats, les nitrates, nitrites, fumarate, DMSO, TMAO et thiosulfate réductases sont utilisées pour la respiration anaérobie. Cependant, la respiration sur nitrate est énergétiquement plus favorable que celle sur les autres accepteurs. Par conséquent, la présence de nitrate inhibe les autres voies anaérobies (Unden and Bongaerts, 1997).

A l'exception des nitrates réductases qui utilisent les trois quinones comme donneur d'électrons, les autres réductases fonctionnent exclusivement avec la MK₈ et la DMK₈

(Wissenbach, Kröger and Uden, 1990; Uden and Bongaerts, 1997; Sharma *et al.*, 2012; Uden, Steinmetz and Degreif-dünnwald, 2014).

II.2.2.3. Respiration dans l'intestin

Comme évoqué précédemment, *E. coli* est une bactérie commensale du microbiote intestinal des vertébrés. L'intestin est un environnement varié et versatile. En effet, le taux d'O₂, le pH, l'épaisseur de la couche épithéliale et la composition en nutriments et en microorganismes sont autant de variables à considérer (Figure 8). Globalement, le pH de la lumière intestinale varie entre 2 et 7.6 tout au long de l'intestin. Un pH proche de 2 est mesuré dans la partie proximale (proche de l'estomac), alors que le pH est plutôt de 8 dans la partie distale (proche du rectum). Une chute de pH est également observée au niveau du cæcum en raison de la fermentation des fibres et la production des acides gras à chaînes courtes (Chikina and Matic Vignjevic, 2021; Mettu *et al.*, 2021). A noter que le pH reste proche du pH neutre dans les mucus où l'acidité du contenu luminal est neutralisée par les sécrétions alcalines des cellules épithéliales (Chikina and Matic Vignjevic, 2021). La concentration en O₂ varie entre 77 mm Hg dans l'estomac et des valeurs proches de zéro mm Hg dans la partie distale. Il faut également noter que tout au long de l'intestin, la concentration en O₂ est moins élevée au centre de la lumière intestinale qu'au voisinage des cellules épithéliales. Ce gradient d'O₂ est généré par des réactions chimiques telles que l'oxydation des lipides, la consommation de l'oxygène par les cellules épithéliales et la composition en microorganismes anaérobies stricts et facultatifs (Chikina and Matic Vignjevic, 2021; Mettu *et al.*, 2021). A leur tour le pH, la concentration en oxygène et la disponibilité des nutriments déterminent la composition du microbiote dans les différents compartiments de l'intestin (Figure 8). Des maladies inflammatoires de l'intestin peuvent entraîner un changement de ces gradients et une dysbiose (déséquilibre du microbiote) (Manichanhau, 2006; Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2018) qui peut affecter à son tour des maladies inflammatoires de l'intestin (Sultan *et al.*, 2021). Les bactéries anaérobies strictes telles que les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* sont dominantes dans l'intestin des personnes en bonne santé. En revanche, l'inflammation peut conduire à une augmentation importante du nombre d'*Enterobacteriaceae* dont *E. coli* (Kotlowski *et al.*, 2007; Lupp *et al.*, 2007; Haberman *et al.*, 2014). En effet, la réponse inflammatoire produit des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et ces derniers peuvent enzymatiquement se convertir en O₂ et en nitrate, respectivement (Winter *et al.*, 2013; Chanin *et al.*, 2020; Hughes *et al.*, 2021). De plus, il a été montré que la concentration en O₂ dans l'intestin augmente également à cause de modifications du métabolisme des entérocytes pendant l'inflammation (Cevallos *et al.*, 2019;

Laventie *et al.*, 2019). De ce fait, la prolifération d'*Enterobacteriaceae* dans l'intestin lors d'une élévation d' O_2 et de nitrate est dû à la respiration.

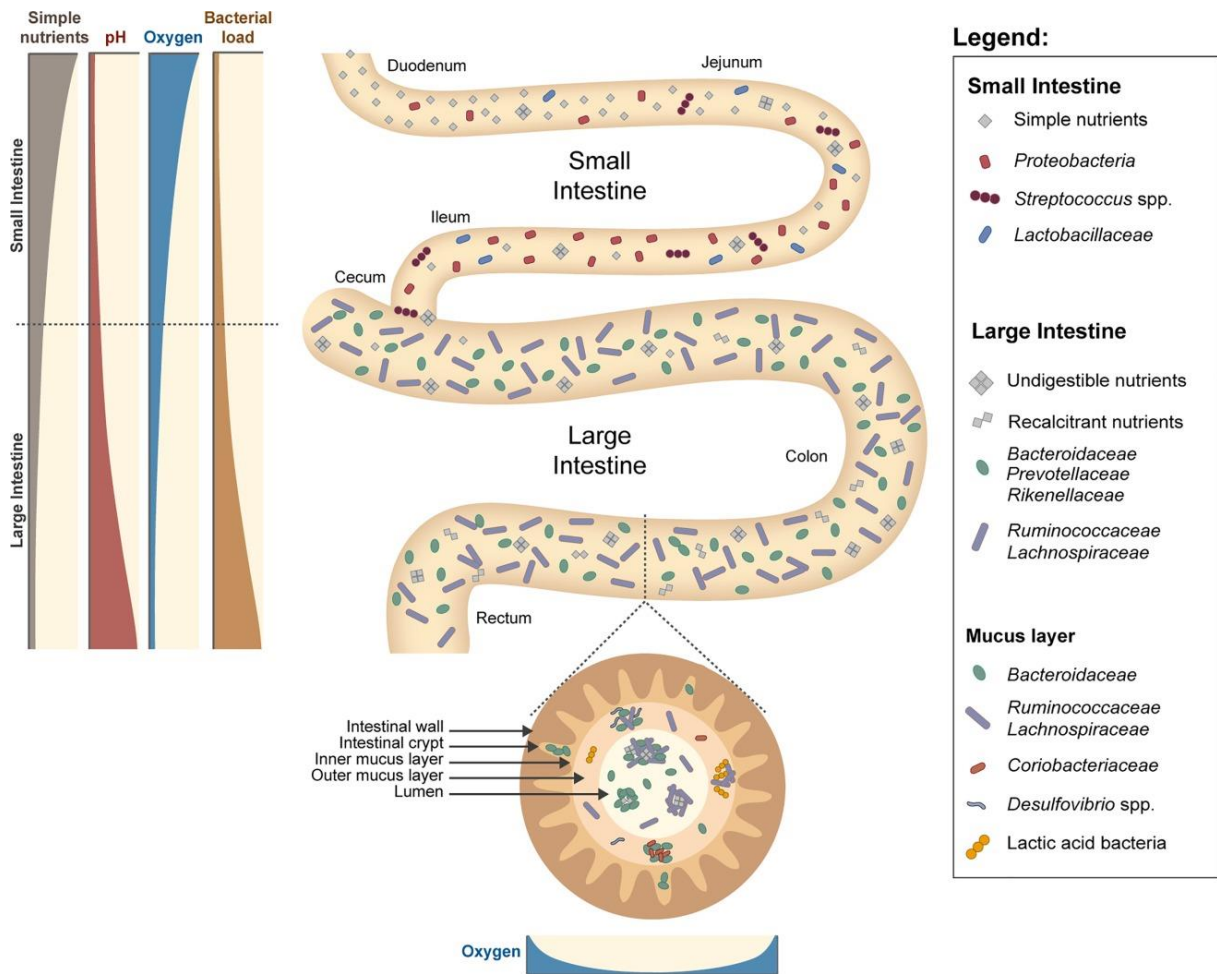


Figure 8. Environnements hétérogènes et versatiles de l'intestin. La diminution de la pression en oxygène et l'augmentation du pH le long de l'axe longitudinal de l'intestin conduit à une charge bactérienne limitée dans les régions proximales de l'intestin grêle et une charge bactérienne élevée dans le gros intestin. L'abondance des nutriments simples, la présence de dioxygène et un pH bas dans l'intestin grêle permet la colonisation de cette région par les bactéries qui sont capables de croître dans ces conditions telles que les espèces commensales de *streptocoques*. En revanche, le gros intestin est peuplé par les bactéries qui sont capables d'assimiler des nutriments peu digests (abondant dans cette région), qui sont sensibles à la présence de dioxygène et à un pH bas du milieu. Il existe également une hétérogénéité le long de l'axe transversal en termes de disponibilité en dioxygène et en nutriments ce qui conduit à une colonisation des différentes communautés bactériennes entre le mucus et la lumière intestinale. Cette figure est tirée de la revue de Pereira *et al.* (Pereira and Berry, 2017).

E. coli colonise principalement le mucus du gros intestin des mammifères (Krogfelt, Cohen and Conway, 2004). Dans ces conditions, ses chaînes respiratoires variées et ramifiées lui confèrent un avantage pour la colonisation. La respiration d'*E. coli* dans l'intestin a fait l'objet de plusieurs études qui se sont intéressées à l'importance de différents composants de la chaîne respiratoire dans le cas de l'inflammation intestinale (Spiga and Winter, 2019). Généralement dans ces études, une souche *E. coli* wild-type (WT) est mise en compétition avec

sa souche isogénique délétée pour le gène d'intérêt dans l'intestin des souris traitées à la streptomycine. La colonisation des deux souches est ensuite suivie par l'analyse des fèces et du contenu du côlon et du cæcum grâce aux marqueurs permettant de distinguer les deux souches. Le traitement à la streptomycine cible les bactéries anaérobies facultatives de la flore intestinale endogène et a pour but de libérer les niches écologiques pour les souches compétitrices afin de surmonter le phénomène de « résistance à la colonisation » (Jones *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus par ces études montrent que les mutants dépourvus d'oxydase bd-I (une des deux oxydases adaptées aux conditions microaérobies, voir II.2.2.1) ne sont pas capable de coloniser l'intestin tandis que l'oxydase bo₃ (oxydase adaptée aux conditions de forte oxygénation, voir II.2.2.1) est dispensable pour la colonisation. Les souches mutantes inactivées pour la nitrate réductase A (NarGHI) ou la fumarate (FrdABCD) réductase, présentent des défauts de colonisation majeurs (Jones *et al.*, 2007, 2011). Toutefois les deux autres nitrate réductases, NarZYV et NapABCGH, ne sont pas essentielles pour la colonisation de l'intestin par *E. coli* (Jones *et al.*, 2011) tout comme les TMAO, DMSO et nitrite réductases (Jones *et al.*, 2011). En résumé, l'oxydase bd-I, la nitrate A (NarGHI) et la fumarate réductases jouent un rôle important dans la colonisation de l'intestin par *E. coli* et les quinones isoprénoïdes privilégiées dans ce cadre-là sont la DMK₈ et la MK₈ (Jones *et al.*, 2011). Tous ensemble, ces résultats suggèrent que la colonisation d'*E. coli* dans l'intestin des souris traitées avec la streptomycine dépend à la fois des respirations microaérobies et anaérobies.

Pour étudier la colonisation d'*E. coli* dans des conditions d'inflammation, une colite (inflammation du côlon) est généralement induite chez la souris par du dextran sodium sulfate (DSS) avant ou pendant la phase de colonisation (Nagalingam, Kao and Young, 2011). Il a été démontré que la colite entraîne une augmentation de la concentration en nitrate dans l'intestin et cette condition profite à *E. coli*. En effet, une souche mutante d'*E. coli* dépourvue de ses trois nitrate réductases (NarGHI, NarZYV et NapABCGH) présente un défaut majeur de colonisation de l'intestin par rapport à la souche WT (Spees *et al.*, 2013; Winter *et al.*, 2013). Notons que dans les conditions d'inflammation, la présence de la TMAO et de la DMSO réductases n'améliorent pas la colonisation de l'intestin par *E. coli*. En revanche, l'oxydase bd-I est importante pour la colonisation dans le cas de la colite puisque la souche mutante inactivée pour cette enzyme colonise très mal l'intestin (Hughes *et al.*, 2017). Il faut mentionner que même si elle n'est pas essentielle, dans le cas de la colite, l'oxydase bd-II contribue à la colonisation de l'intestin (Chanin *et al.*, 2020). En ce qui concerne les déshydrogénases respiratoires, trois études se sont intéressées à leur rôle dans la colonisation de l'intestin inflammé. Deux études ont révélé que la colite conduit à une augmentation de la concentration

en formiate (produit par les microorganismes) et en lactate (produit par les cellules épithéliales) dans l'intestin. Ainsi, la formiate et la lactate déshydrogénases favorisent la colonisation dans ces conditions (Hughes *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2022). Une autre étude a souligné l'importance du métabolisme de l'hydrogène chez *E. coli* pendant l'inflammation intestinale. Les auteurs de ce travail ont montré que la souche mutante d'*E. coli* dépourvue des deux hydrogénases (Hya et Hyb) présente une diminution de son fitness pendant la colonisation du cæcum et du côlon inflammés (Hughes *et al.*, 2021).

II.2.3. Régulation des gènes des complexes respiratoires chez *E. coli*

Comme évoqué précédemment (voir II.2.2), l'expression des déshydrogénases initiales et des réductases terminales est principalement régulée par les accepteurs terminaux d'électrons comme le dioxygène et le nitrate.

II.2.3.1. Régulation par le dioxygène

La régulation par l'O₂ est assurée par deux facteurs transcriptionnels : FNR (pour fumarate et nitrate réductases régulateur) et le système à deux composants ArcA/B (Aerobic redox control) (Unden and Bongaerts, 1997).

II.2.3.1.a. FNR

FNR est une protéine cytoplasmique avec une concentration cellulaire similaire en conditions aérobies et anaérobies (Sutton *et al.*, 2004) mais son activité est régulée par l'O₂. Cette protéine se trouve sous trois formes dans la cellule. Une forme apo monomérique sans son centre [Fe-S] ; une forme monomérique avec un centre [2Fe-2S] ; et enfin une forme dimérique avec un centre [4Fe-4S] par monomère (Figure 9A) (Förster and Gescher, 2014). FNR est constitué d'un domaine N-terminal qui détecte la présence de dioxygène et d'un domaine C-terminal hélice-tour-hélice qui se fixe à l'ADN. Le domaine responsable de la détection de dioxygène contient une séquence de quatre cystéines essentielles pour la fixation de son centre [Fe-S] (Sharrocks, Green and Guest, 1990; Green *et al.*, 1993). En absence d'O₂, FNR est principalement homodimérique avec un centre [4Fe-4S] par monomère (Figure 9A). Ces centres [4Fe-4S] sont nécessaires pour la dimérisation de FNR, pour sa liaison à l'ADN et donc pour la régulation des gènes cibles (Lazizzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997; Moore and Kiley, 2001). En revanche, en présence d'O₂, les centres [4Fe-4S] se convertissent rapidement en centres [2Fe-2S], ce qui conduit à une monomérisation de la protéine (Figure 9A) qui n'est plus capable de se lier à l'ADN et par conséquent ne régule plus l'expression des

gènes cibles (Lazazzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997; Crack, Green and Thomson, 2004; Crack *et al.*, 2007). Une exposition prolongée à l'O₂ dégrade le centre [2Fe-2S] aboutissant à la forme apo de FNR (Khoroshilova *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2004) qui ne se lie pas non plus à l'ADN (Figure 9A).

FNR régule principalement le métabolisme anaérobie en activant les gènes impliqués dans ce dernier et en réprimant les gènes spécifiques du métabolisme aérobie. Par exemple, la transcription des gènes codant pour les nitrate, nitrite, fumarate et DMSO réductases et pour les formiate et glycérol déshydrogénases est induite par FNR tandis que celle des gènes codant pour les oxydases bo₃ et bd est réprimée (Salmon *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005).

II.2.3.1.b. ArcA/B

Ce système à deux composants est constitué de la protéine ArcB associée à la membrane et de la protéine ArcA qui est cytoplasmique. ArcB est une protéine kinase qui est le senseur des conditions microaérobies et anaérobies et ArcA est la protéine régulatrice de ce système. ArcA possède un domaine N-terminal qui reçoit le signal d'ArcB (phosphorylation sur l'aspartate 56) et un domaine C-terminal (hélice-tour-hélice) qui se lie à l'ADN. Ces deux domaines sont liés par un linker (Figure 9B) (Brown *et al.*, 2022). ArcB, à son tour, possède deux domaines transmembranaires (N-terminal) qui sont liés aux domaines cytoplasmiques (C-terminal) par un linker (Figure 9B). Cette kinase est composée de trois domaines cytoplasmiques nommés H1, D et H2 dans lesquels les acides aminés histidine 292, aspartate 576 et histidine 717 (Figure 9B) sont impliqués dans le processus de phosphorylation (Brown *et al.*, 2022). Le linker d'ArcB contient deux cystéines (résidus 180 et 241) qui sont impliqués dans la formation des ponts disulfures (Figure 9B). En effet, lorsque l'apport d'oxygène est important, des ponts disulfures se forment entre les résidus de cystéine de deux molécules d'ArcB voisines entraînant l'inactivation de l'activité kinase. En revanche, en conditions microaérobies et anaérobies, ces mêmes ponts disulfures se réduisent permettant l'activation d'ArcB qui s'autophosphoryle sur le résidu His292 (Figure 9B). La forme active d'ArcB va ensuite phosphoryler la protéine ArcA sur le résidu Asp56 en transférant le groupement phosphate respectivement du résidu His292 au résidu Asp56 en passant par les résidus Asp576 et His717 (Brown *et al.*, 2022). La protéine ArcA étant active sous sa forme phosphorylée, elle se fixe sur l'ADN pour réguler l'expression des gènes cibles (Figure 9B) (Teran-Melo *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2022).

Mise à part le dioxygène, certains métabolites tels que le D-lactate, le pyruvate et l'acétate, favorisent le processus d'autophosphorylation impliqué dans l'activation d'ArcB (Teran-Melo *et al.*, 2018). De plus, il a été démontré qu'en conditions anaérobies, la MK₈ à l'état réduit est capable de réduire les résidus Cys180 et Cys241, permettant ainsi l'activation d'ArcB. A l'inverse, en conditions aérobies, ces mêmes cystéines réduisent l'UQ₈ oxydée, ce qui entraîne la formation des ponts disulfures et l'inactivation d'ArcB (Figure 9B) (Alvarez, Rodriguez and Georgellis, 2013).

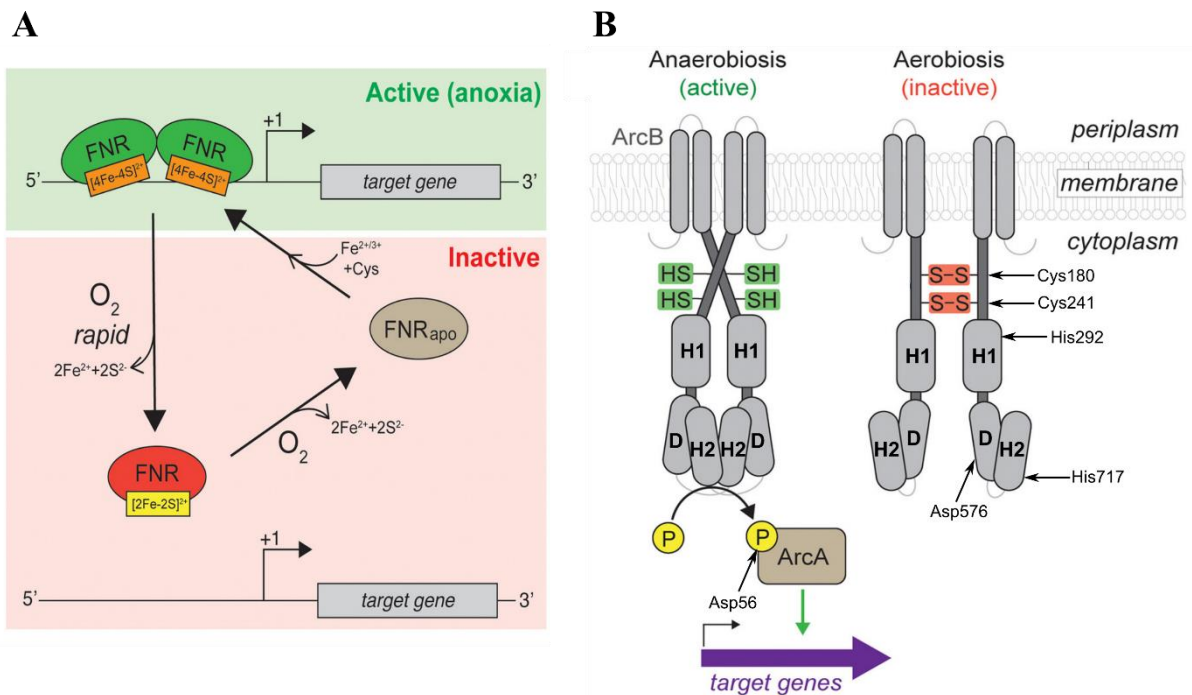


Figure 9. Schéma d'activation et de régulation des systèmes FNR et ArcA/B chez *E. coli*. (A) FNR est actif via une forme homodimérique dans les conditions anoxiques et chaque monomère possède un centre [4Fe-S]. Ces centres favorisent l'homodimérisation. A l'état dimérique, FNR est capable de se lier à l'ADN et de réguler l'expression des gènes cibles soit positivement soit négativement. En présence d'O₂, les centres [4Fe-4S] sont oxydés ce qui entraîne une conversion rapide en [2Fe-2S] et ainsi la monomérisation de la protéine. FNR oxydée a une affinité réduite pour l'ADN et par conséquent est inactive pour la régulation de l'expression des gènes. Lors d'une exposition continue à l'O₂, le centre [2Fe-2S] se dégrade pour former l'apo-FNR. (B) En aérobiose, des ponts disulfures se forment entre les cystéines 180 et 241 du domaine linker d'ArcB, ce qui conduit à son inactivation. En revanche en conditions anaérobies, les ponts se rompent en entraînant l'activation d'ArcB. Une fois active, ArcB phosphoryle et active la protéine régulatrice ArcA. Cette dernière, une fois activée, régule l'expression des gènes cibles soit positivement soit négativement. Les acides aminés impliqués dans le processus de phosphorylation sont indiqués sur la protéine ArcA et sur un monomère inactif d'ArcB. Ces acides aminés sont localisés sur les différents domaines cytoplasmiques (domaine C-terminal) d'ArcB et sur le domaine N-terminal d'ArcB. Adapté de Price *et al.* (Price, Román-Rodríguez and Boyd, 2021).

II.2.3.2. Régulation par le nitrate

E. coli possède deux systèmes à deux composants, NarX-NarL et NarQ-NarP, impliqués dans la détection et la réponse au nitrate et au nitrite. Chacun de ces deux systèmes est composé d'une kinase membranaire qui joue le rôle de senseur du nitrate et du nitrite (NarX et NarQ) et d'une protéine cytoplasmique régulatrice (NarL et NarP). En présence de nitrate et de nitrite, chaque kinase senseur s'autophosphoryle. Une fois phosphorylée, NarX et NarQ phosphorylent leur protéine régulatrice, respectivement NarL et NarP. Ces deux dernières sont actives sous leur forme phosphorylée et participent à la régulation de l'expression de leurs gènes cibles (Unden and Bongaerts, 1997). De manière générale, elles régulent positivement l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du nitrate et du nitrite et négativement ceux codant pour les autres systèmes respiratoires anaérobies tels que la fumarate et la DMSO réductases (Figure 10) (Noriega *et al.*, 2010). Toutefois, il existe une régulation croisée entre ces deux systèmes. En effet, NarQ, une fois phosphorylée, est capable de transphosphoryler à la fois NarP et NarL en aérobiose et en anaérobiose (Stewart, Chen and Wu, 2003; Noriega *et al.*, 2010). A l'inverse, après avoir été phosphorylée, NarX transphosphoryle principalement NarL mais de manière moins efficace que NarP (Noriega *et al.*, 2010). Notons que NarX est plus efficacement activé en présence du nitrate. A l'opposé, NarQ est aussi bien activée par le nitrate que par le nitrite (Unden and Schirawski, 1997; Noriega *et al.*, 2010). En absence de nitrate et de nitrite, NarX et NarQ sont déphosphorylées et déphosphorylent NarL et NarP, qui sont alors inactivées. (Figure 10).

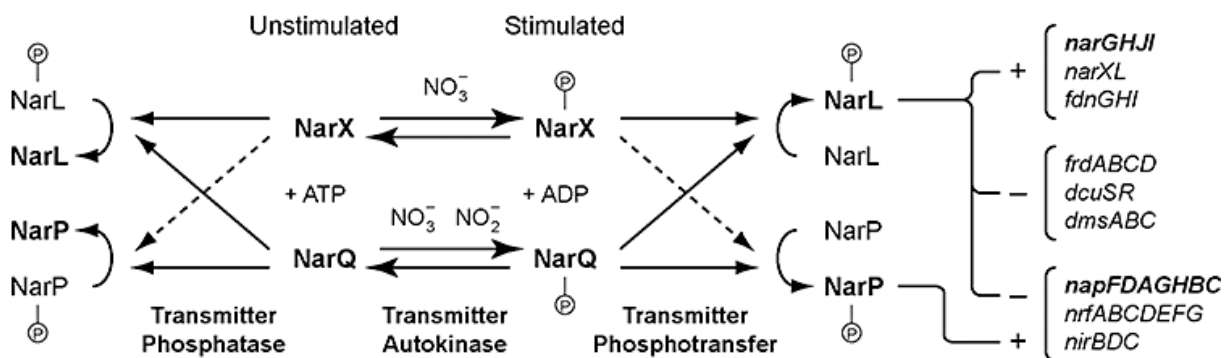


Figure 10. Modèle de régulation croisée des systèmes NarX-NarL et NarQ-NarP. Les protéines senseurs (NarX et NarQ) sont stimulées et activées en présence de leurs ligands (NO_3^- et NO_2^-) et phosphorylent les deux protéines régulatrices (NarL et NarP) pour les rendre actives. Une fois active, les protéines régulatrices activent (+) ou répriment (-) la transcription de leurs opérons cibles. En revanche en absence du stimulus, les protéines senseurs déphosphorylent les protéines régulatrices. Les flèches en pointillés représentent des réactions relativement lentes. Cette figure est tirée de l'article de Noriega *et al.* (Noriega *et al.*, 2010)

III. Biosynthèse des quinones chez *E. coli*

Les voies de biosynthèse de l'UQ (Figure 11) et de la MK (Figure 24) ont été largement étudiées chez *E. coli*. Dans ce chapitre, je présenterai en premier lieu les voies de biosynthèse de l'UQ₈ ainsi que leur régulation chez cette bactérie et j'évoquerai ensuite brièvement la voie de biosynthèse de la MK₈.

III.1. Voies de biosynthèse de l'UQ₈

E. coli est capable de synthétiser de l'UQ₈ via une voie multi-étape aussi bien en conditions aérobies (voie classique ou O₂-dépendante) qu'en conditions anaérobies (voie O₂-indépendante, identifiée récemment (Pelosi *et al.*, 2019)) (Alexander and I. G. Young, 1978).

III.1.1. Voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ₈

La voie de biosynthèse O₂-dépendante de l'UQ₈ est la mieux caractérisée dans la littérature (L. Aussel *et al.*, 2014; Abby *et al.*, 2020). La voie nécessite d'une part un précurseur du noyau aromatique et d'autre part un précurseur de la chaîne octaprényle, l'octaprényl diphosphate. (Figure 11).

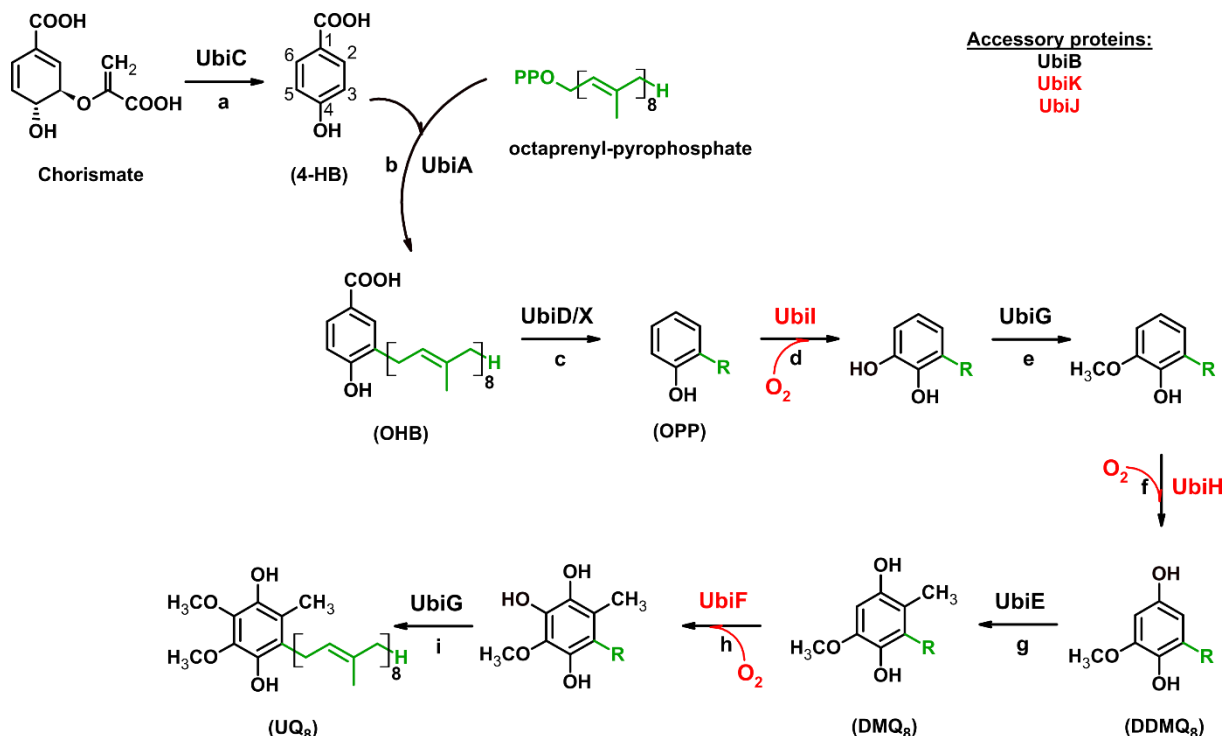


Figure 11. Voie O₂-dépendante de la biosynthèse de l'UQ₈ chez *E. coli*. Les protéines Ubi communes avec la voie O₂-indépendante sont en noir. Les protéines Ubi qui sont essentielles à la voie O₂-dépendante et le donneur d'atome d'oxygène pour les réactions d'hydroxylation en conditions aérobies (O₂) sont en rouge. R, chaîne octaprényle en vert, est présent sur les molécules OHB et UQ₈ ; 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid ; OHB, 3-octaprenyl-

4-hydroxybenzoate ; OPP, 3-octaprénylphenol ; DDMQ₈, 3-octaprényl-5-méthoxyquinol ; DMQ₈, 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxyquinol. Afin de faciliter la désignation des atomes de carbone du cycle aromatique, nous nous affranchissons de la nomenclature chimique et nous appliquerons la numérotation des atomes de carbone donnée pour le 4-HB à tous les intermédiaires de biosynthèse.

III.1.1.1. Biosynthèse du précurseur aromatique

Le précurseur aromatique de la voie de biosynthèse de l'UQ₈ est l'acide 4-hydroxybenzoïque (noté par la suite 4-HB) (Figure 11) (Cox and Gibson, 1966). Chez *E. coli*, le 4-HB est synthétisé à partir du chorismate (composé qui découle de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, voir figure 23) par une chorismate-pyruvate-lyase, UbiC (Figure 11, réaction a) (Siebert, Severin and Heide, 1994). UbiC est une protéine cytoplasmique (Nichols and Green, 1992; Gallagher *et al.*, 2001) et sa structure cristallographique a été résolue avec son produit de réaction, le 4-HB (Gallagher *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006). Cette structure qui correspond à une protéine monomérique (Gallagher *et al.*, 2001), révèle deux sites de fixation aux ligands liés par un tunnel contenant le site actif de l'enzyme (Smith *et al.*, 2006). Le premier site (ou site primaire) qui est protégé du solvant correspond au site de fixation du 4-HB. Le second (ou site secondaire), plus accessible au solvant, correspondrait au site de fixation du substrat (le chorismate) (Smith *et al.*, 2006). Il a été proposé que la liaison du substrat au site secondaire conduirait à la libération du 4-HB. Le chorismate serait alors déplacé vers le site primaire puis transformé en 4-HB soit dans le tunnel, soit dès son arrivée dans le site primaire. Le pyruvate, un autre produit de la réaction, est libéré de l'enzyme et le 4-HB qui se lie fermement à l'enzyme inhibe son activité (Gallagher *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2002) jusqu'à la liaison d'une autre molécule de chorismate (Smith *et al.*, 2006). La synthèse d'UQ₈ n'est pas totalement éliminée dans des souches mutantes d'*E. coli* pour le gène *ubiC*, et celles-ci synthétisent encore environ 10 % d'UQ₈ par rapport à une souche WT quelles que soient les conditions de cultures (Nichols and Green, 1992; Siebert, Severin and Heide, 1994; Xie *et al.*, 2015; Pelosi *et al.*, 2019). Cela suggère qu'*E. coli* pourrait synthétiser le 4-HB via une autre voie indéterminée (Fernández-del-Río and Clarke, 2021).

III.1.1.2. Biosynthèse du précurseur octaprényl diphosphate

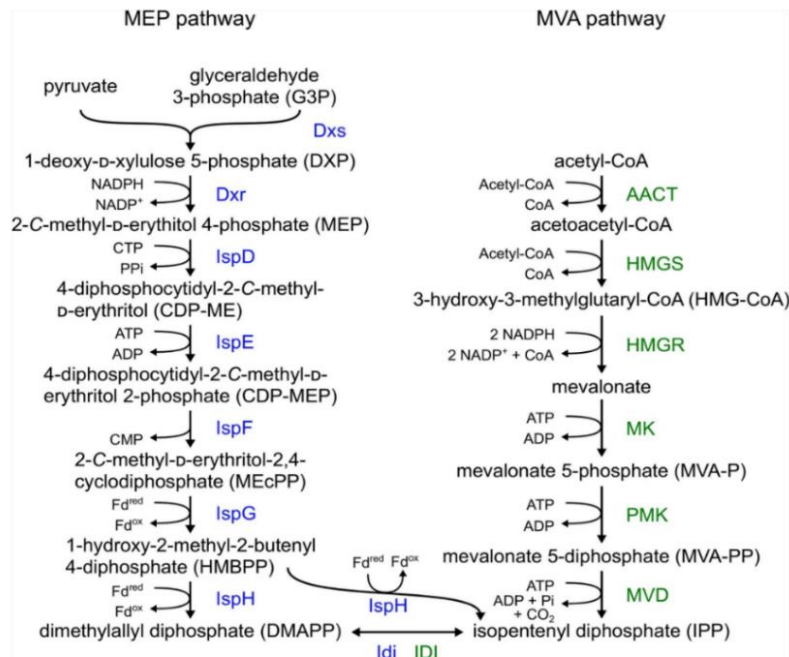
La chaîne octaprényle est synthétisée à partir de deux précurseurs, l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthyl-allyl-diphosphate (DMAPP) (Meganathan, 2001; Kawamukai, 2016; Pierrel *et al.*, 2022). Ces deux précurseurs sont issus de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Figure 12A) (Rohmer *et al.*, 1993; Rohmer and Rohmer, 1999). Brièvement, cette voie commence par la condensation du glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) et du pyruvate

par la DXP synthase (Dxs) qui forme du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP). Puis, après plusieurs réactions catalysées successivement par la 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase (IspD), la 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (IspE), la 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF), la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase (IspG) et la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase (IspH), le MEP est converti en IPP. Enfin, le DMAPP est formé à partir de l'IPP par l'isopentényl-diphosphate isomérase (Idi) (Figure 12A) (Pierrel *et al.*, 2022).

A l'issue de la synthèse des deux précurseurs, la formation de la chaîne octaprényle diphosphate (OdP) se réalise de la manière suivante (Figure 12B) :

- Une molécule d'IPP est ajoutée à un DMAPP par une farnésyl diphosphate synthase (IspA) pour produire du géranyl diphosphate (GPP). Ensuite, il y a l'ajout d'une deuxième molécule d'IPP sur le GPP par IspA pour générer du farnésyl diphosphate (FPP) avec trois unités isoprényles (Fujisaki, Nishino and Katsuki, 1986; Pierrel *et al.*, 2022). IspA a besoin d'ions Mg^{2+} pour fonctionner (Fujisaki, Nishino and Katsuki, 1986; Hosfield *et al.*, 2004).
- Puis, l'octaprényle diphosphate avec 40 atomes de carbone (C40, Figure 12B) est formé par l'octaprényle diphosphate synthase (IspB) suite à des réactions de condensations séquentielles ajoutant des molécules d'IPP sur le FPP (Fujisaki, Nishino and Katsuki, 1986; K Asai *et al.*, 1994). IspB est essentielle pour la croissance d'*E. coli* (Okada *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 2006) et les ions Mg^{2+} sont nécessaires pour son activité enzymatique. Comme mentionné dans la partie des quinones isoprénoïdes (voir I.2), la longueur de la chaîne polyprényle varie en fonction des organismes et elle est caractéristique de l'isoprényl diphosphate synthase de l'organisme étudié (Kainou *et al.*, 2001). Plus précisément, la longueur de la chaîne est déterminée par la poche catalytique de l'enzyme qui accueille le polyprényl diphosphate en cours de polymérisation (Nagel, Schmidt and Peters, 2019). Chez *E. coli*, IspB permet principalement la formation d'une chaîne octaprényle (C40). Cependant de l'heptaprényl diphosphate (C35) est également observé. Notons que l'expression hétérologue de polyprényle diphosphate synthases dans une souche $\Delta ispB$ d'*E. coli* conduit à la synthèse de chaînes polyprényles de tailles différentes, conformes à celles de l'organisme d'origine, tout en permettant une croissance bactérienne (Okada *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2009).

A



B

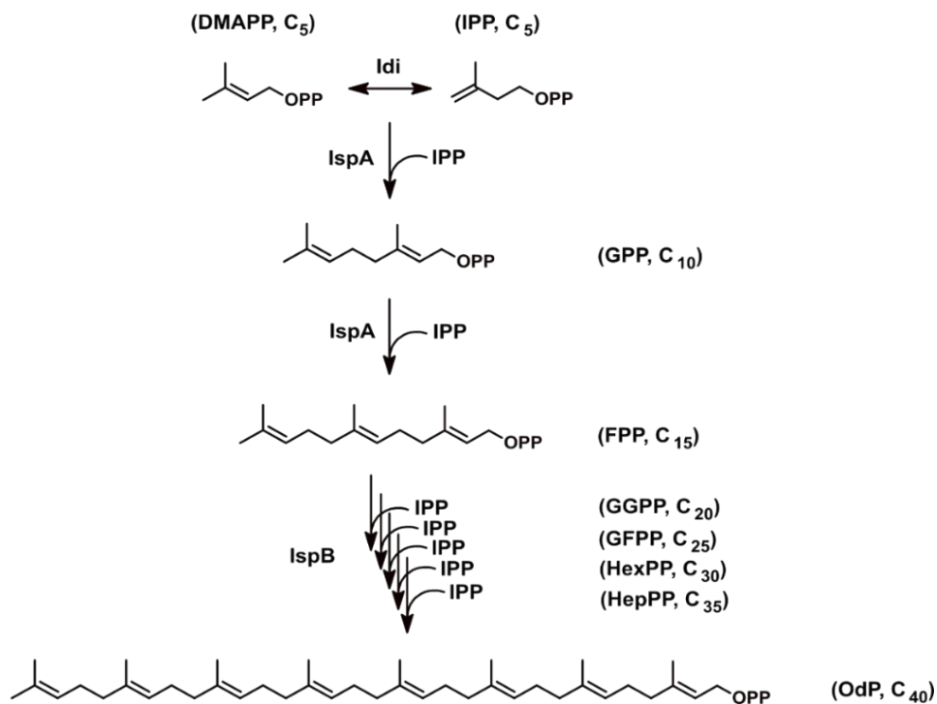


Figure 12. Biosynthèse du polyprényl diphosphate. (A) Présentation des voies méthylérythritol phosphate (MEP) et mévalonate (MVA). Les enzymes de la voie MEP chez *E. coli* et la voie MVA chez *S. cerevisiae* sont respectivement en bleu et vert. Les produits finaux des deux voies, l'isopentényl diphosphate (IPP) et diméthylallyldiphosphate (DMAPP), sont ensuite utilisés comme précurseur pour la biosynthèse du polyprényl diphosphate. Ce panel est tiré de la revue de Pierrrel *et al.* (Pierrrel *et al.*, 2022). (B) La biosynthèse de l'octaprényl diphosphate (Odp) chez *E. coli* à partir d'IPP et de DMAPP. IspA ajoute deux molécules d'IPP sur DMAPP en deux étapes et ensuite IspB produit la chaîne latérale octaprényle (C40) en ajoutant cinq molécules d'IPP sur la molécule Farnésyl diphosphate (FPP) en cinq étapes. GPP, Géranyl diphosphate ; GGPP, géranylgéranyle diphosphate ; GFPP, géranylfarnésyle diphosphate ; HexPP, hexaprényle diphosphate ; HepPP, heptaprényle diphosphate ; OPP, diphosphate. Le nombre d'atome de carbone dans chaque molécule est indiqué. Adapté de (Meganathan, 2001b).

III.1.1.3. Etapes et protéines de la voie Ubi

Au total douze protéines (appelées communément protéines Ubi) sont impliquées dans les étapes conduisant à la biosynthèse de l'UQ à partir du chorismate et de l'octaprényl diphosphate. Il s'agit des protéines UbiA à K et UbiX. Certaines de ces protéines sont des enzymes (UbiA, UbiC à UbiI et UbiX) tandis que d'autres sont des protéines accessoires essentielles telles que UbiB et UbiJ ou importante comme UbiK (Abby *et al.*, 2020). Comme illustré sur la figure 11, UbiC convertit le chorismate en 4-HB et par la suite, le noyau de ce dernier sera modifié via l'action des enzymes Ubi de la manière suivante : une prénylation et une décarboxylation catalysées respectivement par UbiA et le système à deux composants UbiD/UbiX, trois hydroxylations réalisées par les monooxygénase à flavine UbiI, UbiH et UbiF et enfin trois méthylations catalysées par UbiG et UbiE. Comme illustré dans la figure 13, certains gènes codant pour les protéines Ubi sont organisés en opéron alors que d'autres sont soit seuls, soit en opéron avec des gènes supposément non impliqués dans la biosynthèse de l'UQ₈. La structure des protéines Ubi, leurs fonctions biochimiques et leurs régulations seront décrites plus en détails ci-après, à l'exception de la protéine UbiC qui a été décrite dans la section III.1.1.1.

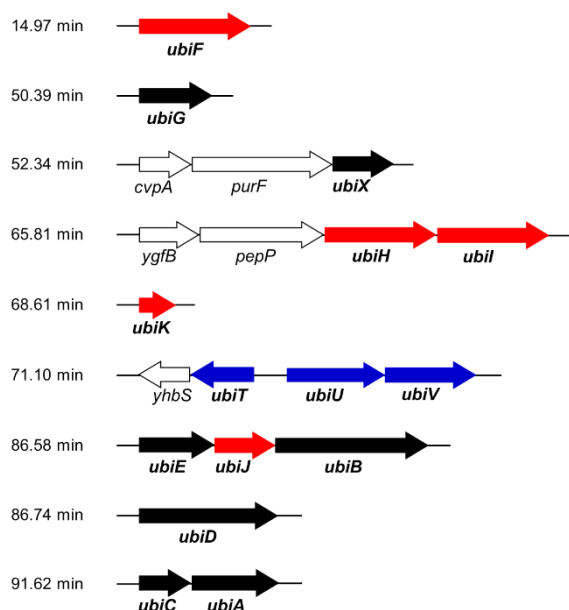


Figure 13. Organisation génétique et localisation des gènes *ubi* sur le chromosome d'*E. coli*. Tous les gènes qui sont en opéron sont représentés groupés. Les gènes nécessaires à la biosynthèse de l'UQ₈ sont indiqués en gras. Les flèches noires symbolisent les gènes communs entre les voies O₂-dépendante et O₂-indépendante. Les flèches rouges symbolisent les gènes essentiels à la voie O₂-dépendante et les gènes essentiels à la voie O₂-indépendante sont en bleu. Adapté de (L. Aussel *et al.*, 2014; Pelosi *et al.*, 2019).

III.1.1.3.a. Enzymes Ubi

III.1.1.3.a.i. Prényltransférase : UbiA

UbiA est une protéine transmembranaire (Young *et al.*, 1972; Melzer and Heide, 1994; Daley *et al.*, 2005) qui catalyse la condensation de l'octaprényl diphosphate sur le 4-HB pour former le 3-octaprényl-4-hydroxybenzoate (OHB) (Figure 11, réaction b) (Young *et al.*, 1972).

La structure de la protéine UbiA a été modélisée par Bräuer et coll. (Bräuer, Brandt and Wessjohann, 2004; Bräuer *et al.*, 2008). Des études biochimiques ont montré que les ions Mg^{2+} sont nécessaires pour l'activité optimale de l'enzyme (Young *et al.*, 1972). En effet, il a été proposé qu'ils puissent participer à la liaison entre le résidu aspartate 75 de l'enzyme et le pyrophosphate de l'octaprényl diphosphate (Bräuer, Brandt and Wessjohann, 2004). Le groupement carboxyle du 4-HB, est également nécessaire pour l'activité d'UbiA (Wessjohann and Sontag, 1996). Des approches *in silico* complètent ce résultat et suggèrent la formation d'un pont salin entre la fonction carboxylate du 4-HB et la chaîne latérale de l'arginine 137 d'UbiA (Bräuer, Brandt and Wessjohann, 2004). Des données biochimiques et structurales ont pu être obtenues via la résolution par Cheng et Li de la structure de la prényltransférase de la superfamille UbiA d'*Aeropyrum pernix* (une archée) en présence de 4-HB, d'un analogue sulfaté non clivable du géranyl (deux unités isoprénoides) pyrophosphate et d'ions Mg^{2+} (Figure 14A). Même si cette protéine ne participe pas à la synthèse de l'UQ, elle partage une similarité de séquence de 52% avec UbiA d'*E. coli* et présente les mêmes résidus dans le site actif (Cheng and Li, 2014). Cette structure met en évidence un site de liaison au 4-HB et un site de liaison à l'isoprényl diphosphate qui sont proches l'un de l'autre (Figure 14B). La protéine est constituée de neuf hélices transmembranaires et d'un domaine extra-membranaire entourant une cavité centrale qui contient le site actif. Les auteurs ont proposé que cette cavité s'ouvre latéralement dans la bicouche lipidique pour accueillir la chaîne isoprényle diphosphate localisée au niveau de la membrane. Une fois la prénylation catalysée, cette ouverture permettrait la libération du produit OHB dans la membrane. Le groupe pyrophosphate de l'isoprényl diphosphate est clivé par l'enzyme pour générer un intermédiaire de type carbocation qui réagit ensuite en position méta (le carbone 3) du 4-HB pour former l'OHB (Cheng and Li, 2014). Une autre étude a également résolu la structure d'une UbiA d'une autre archée, *Archaeoglobus fulgidus*. Malgré quelques différences structurales avec l'UbiA d'*A. pernix*, le mécanisme réactionnel proposé est similaire à celui proposé précédemment (Huang *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont démontré qu'UbiA peut utiliser des chaînes isoprénoides de longueurs variées (Hachimi, Samuel and Azerad, 1974) et d'autres noyaux aromatique (à condition qu'ils portent un groupement carboxylate) (Wessjohann and Sontag, 1996; Xie *et al.*, 2015). Cela suggère qu'UbiA n'est spécifique ni pour la longueur de la chaîne isoprényle ni pour la nature du noyau aromatique. Une souche d'*E. coli* mutante pour le gène *ubiA* n'est pas capable de synthétiser de l'UQ₈ ni en conditions aérobies ni en conditions anaérobies (Pelosi *et al.*, 2019).

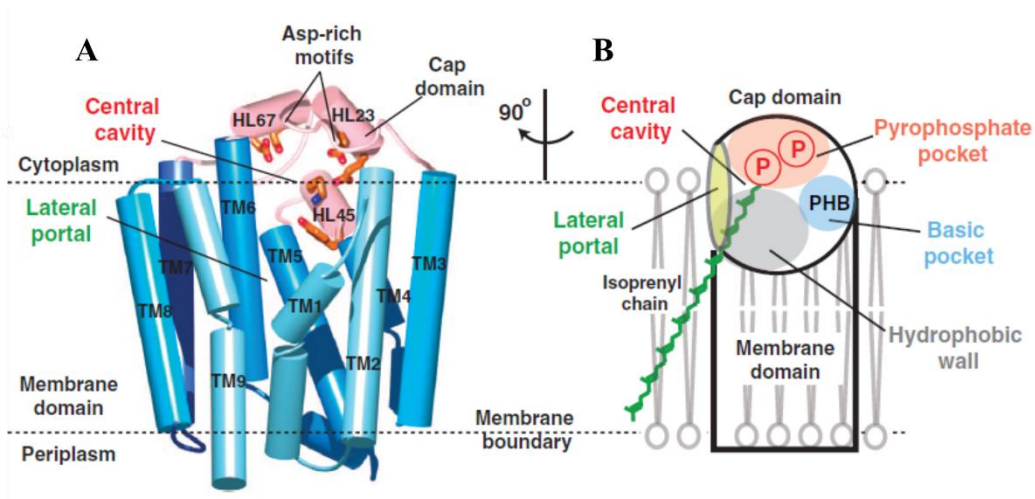


Figure 14. Structure de la protéine UbiA d’*Aeropyrum pernix*. (A) La vue de profil de la protéine d’UbiA d’*A. pernix*. Cette structure met en évidence 9 hélices transmembranaires (en bleu) et 3 hélices formant un chapeau (en rose). Le domaine chapeau forme une cavité centrale contenant le site actif. (B) La présentation schématique de la protéine révèle une ouverture unique de la cavité centrale sur la membrane. La grande cavité centrale contient une poche polaire (en rose) pour la fixation du pyrophosphate, un « mur » hydrophobe (en gris) pour la liaison des chaînes isoprényle, et une petite poche (en bleu) pour la liaison au 4-HB (=PHB, parahydroxybenzoate). Cette figure est tirée de l’article de Cheng *et al.* (Cheng and Li, 2014).

III.1.1.3.a.ii. Décarboxylase : UbiD/UbiX

Le système de décarboxylation de la voie de biosynthèse de l’UQ₈ chez *E. coli* est composé de deux protéines, UbiD et UbiX. UbiD catalyse la décarboxylation de l’OHB en 3-octaprényle phénol (OPP) (Figure 11, réaction c) et les ions Mn²⁺ sont nécessaires pour son activité enzymatique (Cox *et al.*, 1969; Leppik, Young and Gibson, 1976). La structure cristallographique d’UbiD d’*E. coli* a été résolue et révèle une structure quaternaire correspondant à un trimère de dimères (Figure 15A) (Marshall *et al.*, 2017). La structure d’UbiD ne semble pas présenter de domaine d’interaction à la membrane ni de site de liaison pour la chaîne octaprényle de son substrat l’OHB (Marshall *et al.*, 2017). Pourtant, UbiD est détectée aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction membranaire d’extraits protéiques d’*E. coli* (Hajj Chehade *et al.*, 2019). L’activité enzymatique d’UbiD est dépendante d’un cofacteur correspondant à une flavine mononucléotide prénylée (prFMN) synthétisée par UbiX (Lin *et al.*, 2015; Payne *et al.*, 2015; White *et al.*, 2015). La liaison de prFMN à UbiD nécessite des ions Mn²⁺ (Marshall *et al.*, 2017). Les monomères d’UbiD possèdent trois domaines : un domaine N-terminal de liaison à la prFMN, un domaine de multimérisation et un domaine C-terminal en hélice qui interagit avec le domaine de liaison à la prFMN d’un monomère adjacent (Figure 15B). Ainsi, le site actif d’UbiD se situe à l’interface de deux monomères (Marshall *et al.*, 2017). Il a été proposé chez *E. coli* que le groupement carboxylate de l’OHB forme un pont salin avec le résidu conservé arginine 180 d’UbiD. De plus, le cycle

benzyle de l'OHB est en interaction avec les cycles de la prFMN. Enfin, le groupement hydroxyle en position para du cycle aromatique du 4-HB est à proximité de l'arginine 197 d'UbiD. Le mécanisme réactionnel postulé pour les protéines UbiD correspond à une cycloaddition 1,3-dipolaire (pour les détails de ce mécanisme, voir le papier (Baunach and Hertweck, 2015)). Ce mécanisme conduit à la formation d'un produit décarboxylé et à la production de CO₂ (Marshall *et al.*, 2017).

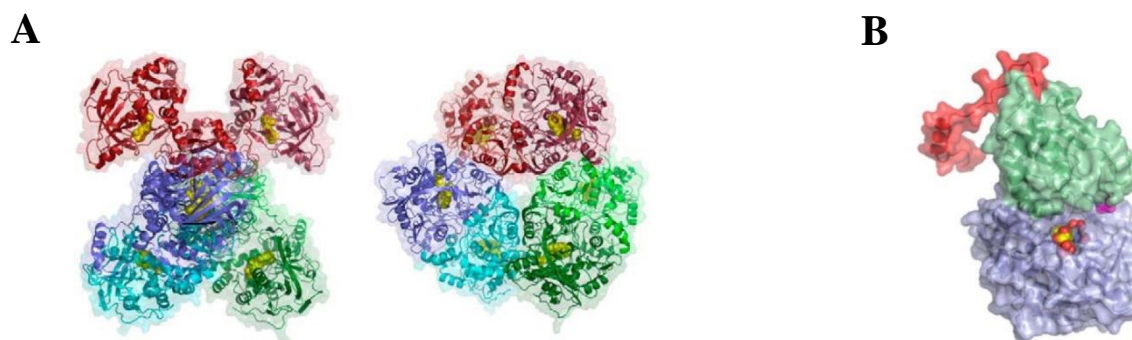


Figure 15. Structure cristallographique d'UbiD d'*E. coli*. (A) Représentation schématique de l'hexamère UbiD avec les sous-unités individuelles en couleurs distinctes. La vue du panel de droite est liée au panel de gauche par une rotation de 90° le long de l'axe vertical. Le domaine N-terminal de liaison à la prFMN dépasse du cœur de l'hexamère UbiD qui est assemblé par les interactions du domaine de multimérisation. Le domaine C-terminal de chaque monomère interagit avec le domaine N-terminal du monomère adjacent. (B) Structure d'un monomère d'UbiD dans la conformation fermée. Le domaine N-terminal de liaison à la prFMN est représenté en bleu, le domaine de multimérisation est en vert et le domaine C-terminale en hélice qui interagit avec le domaine de liaison à la prFMN d'un monomère adjacent est en rouge. La surface accessible aux solvants est représentée par une surface transparente. Cette figure est tirée de l'article Marshall *et al.* (Marshall *et al.*, 2017).

UbiX qui a été initialement proposée comme une isoenzyme d'UbiD (Zeng *et al.*, 1998) est en réalité une flavine prényltransférase qui catalyse la réaction d'addition de diméthylallyl monophosphate (DMAP) sur les atomes d'azote 5 et 6 de la FMNH₂ (FMN à l'état réduit) pour produire le cofacteur prFMNH₂ (Figure 16) (Lin *et al.*, 2015; Payne *et al.*, 2015; White *et al.*, 2015). Ce cofacteur est produit sous une forme réduite inactive, et subit une maturation oxydative après son transfert dans UbiD, générant la forme active, le prFMN^{iminium} qui est essentiel pour l'activité d'UbiD (Figure 16) (Marshall *et al.*, 2017).

Comme UbiD, UbiX est identifiée à la fois dans les fractions solubles et membranaires d'extraits protéiques d'*E. coli*. L'analyse de la fraction soluble d'*E. coli* sur gel d'électrophorèse en conditions native a montré que les deux protéines co-migrent à la même taille (vers 700 kDa), suggérant qu'elles forment un complexe cytosolique (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Les mutants d'*ubiD* (Cox *et al.*, 1969; Alexander and I. G. Young, 1978) et d'*ubiX* (Gulmezian *et al.*, 2007) accumulent naturellement l'OHB et montrent un défaut de synthèse de l'UQ₈ en conditions aérobies et anaérobies par rapport aux souches WT (Alexander and I. G. Young,

1978; Pelosi *et al.*, 2019). Cependant, ces mutants sont encore capables de synthétiser l'UQ₈ à un niveau proche de 15% par rapport à la souche WT mais seulement en conditions aérobies (Pelosi *et al.*, 2019). Cela suggère la présence d'un système de décarboxylation alternatif au système UbiD/UbiX dépendant des conditions d'oxygénation du milieu de culture.

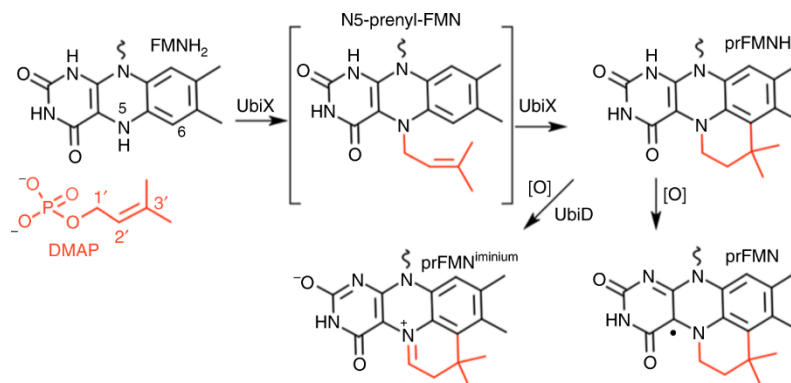


Figure 16. Production du cofacteur FMNH₂ prénylé (prFMNH₂) et son activation par UbiD. UbiX ajoute une molécule de diméthylallyl monophosphate (DMAP) sur la flavine mononucléotide réduite (FMNH₂) pour générer la prFMNH₂. Après son transfert dans UbiD, ce cofacteur subit une maturation oxydative qui le convertit en cofacteur actif prFMN^{iminium} pour UbiD. Cette figure est tirée de l'article Marshall *et al.* (Marshall *et al.*, 2019).

III.1.1.3.a.iii. Hydroxylases : UbiI, UbiH et UbiF

La voie de biosynthèse de l'UQ₈ nécessite trois réactions d'hydroxylation sur les carbones 1, 5 et 6 (C1, C5 et C6) du noyau aromatique (Figure 11, réactions d, f et h) (L. Aussel *et al.*, 2014; Abby *et al.*, 2020). Chez *E. coli*, ces trois réactions sont catalysées par trois monooxygénases à flavine (FMOs), UbiH, UbiI et UbiF qui utilisent la molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD) (Figure 17A) comme cofacteur, le dioxygène comme donneur d'atome d'oxygène et le nicotine adénine dinucléotide (phosphate) (NAD(P)H) comme donneur d'électrons (Alexander and Ian G. Young, 1978; Pelosi *et al.*, 2016). Ces trois Ubi-FMOs appartiennent aux monooxygénases de la classe A et l'enzyme para-hydrobenzoate hydroxylase (PHBH) est le prototype de cette classe (Mascotti *et al.*, 2016). PHBH n'est pas impliquée dans la biosynthèse de l'UQ et catalyse l'ortho-hydroxylation du 4-hydroxybenzoate pour générer le 3,4-dihydroxybenzoate (Figure 17B). Le mécanisme catalytique proposé pour cette enzyme est illustré dans la figure 17C. UbiI, UbiH et UbiF sont principalement cytosoliques (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Chacune de ces trois Ubi-FMOs hydroxyle le noyau aromatique des intermédiaires de biosynthèse de l'UQ₈ sur un carbone spécifique (Pelosi *et al.*, 2016). Ainsi, chacune de ces enzymes présente une régiosélectivité qui lui est propre et la position de l'atome de carbone hydroxylé par une Ubi-FMO est dictée par l'orientation du substrat par rapport à l'intermédiaire réactionnel hydroperoxyde de flavine (composé IV, Figure 17C) dans son site actif (Crozier-Reabe and Moran, 2012; Ozeir *et al.*, 2015).

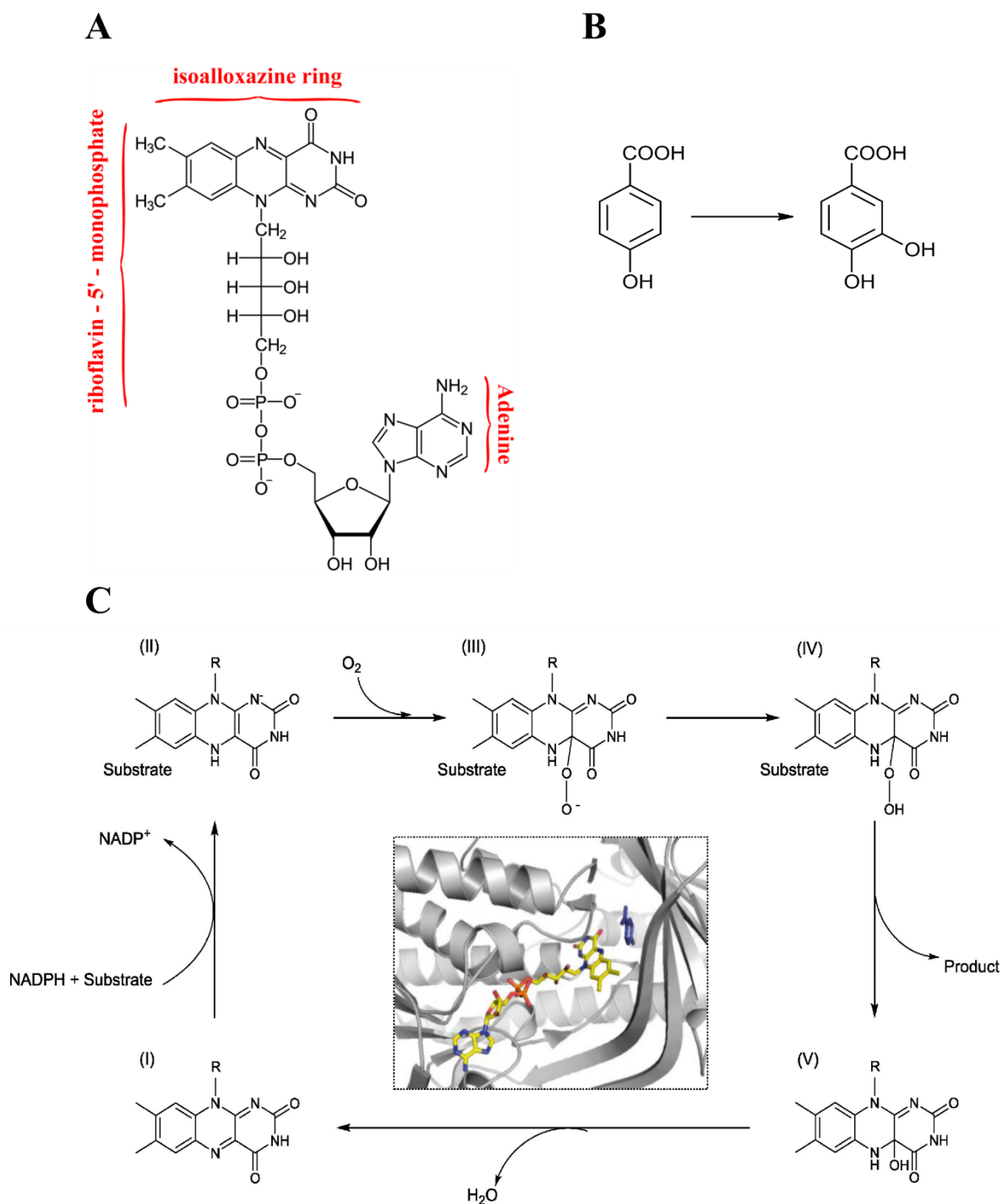


Figure 17. Mécanisme catalytique des FMO de classe A. (A) Structure chimique du FAD qui est le cofacteur des monoxygénases de classe A, auxquelles appartient UbiI, H et F. (B) Réaction catalysée par PHBH. Cette enzyme permet la production de 3,4-dihydroxybenzoate à partir de 4-HB. (C) Représentation schématique du cycle catalytique des monoxygénases de classe A. Le cycle commence lorsque le complexe enzyme-substrat (PHB, parahydroxybenzoate = 4-HB) est formé (I) et la flavine oxydée (sur son cycle isoalloxazine) est réduite par NADPH (II). Ensuite, la réaction avec la molécule d'oxygène (O_2) permet la formation successive de C4a-peroxyflavine et de C4a-flavine hydroperoxyde (composés III et IV respectivement). Enfin, le substrat est oxydé et le produit est libéré. Au centre, la structure du site actif de l'enzyme para-hydrobenzoate hydroxylase (PHBH) de *Pseudomonas fluorescens* est représentée avec la molécule FAD en jaune et le substrat 4-HB en bleu foncé. Les panels (A) et (C) sont tirés respectivement des articles de Esposito *et al.* (Esposito *et al.*, 2011) et de Mascotti *et al.* (Mascotti *et al.*, 2016).

UbiI catalyse l'hydroxylation en position C5 de l'OPP pour générer le 3-octaprényl-5-hydroxy-4-phénol (Figure 11, réaction d) (Hajj Chehade *et al.*, 2013). En aérobiose, une souche d'*E. coli* $\Delta ubiI$ continue à synthétiser de l'UQ₈ (environ 20% du contenu en UQ₈ de la souche WT) et accumule du 3-octaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP₈) qui correspond à de l'OPP hydroxylé en C1 (Figure 18) (Hajj Chehade *et al.*, 2013; Pelosi *et al.*, 2016). L'activité d'hydroxylation résiduelle en position C5 chez la souche $\Delta ubiI$ est assurée par la protéine UbiF (Hajj Chehade *et al.*, 2013). Ce résultat est conforme à la proposition selon laquelle le gène d'*ubiF* provient d'une duplication du gène *ubiI* dans l'ancêtre des γ -protéobactéries (Pelosi *et al.*, 2016). La protéine UbiF aurait donc pu conserver une activité résiduelle ancestrale d'hydroxylation sur la position C5 en plus d'acquérir la capacité d'hydroxyler la position C6. La structure cristallographique de la protéine UbiI d'*E. coli* tronquée de sa partie C-terminale ($\Delta 34$ acides aminés) a été obtenue. Elle montre une organisation tétramérique d'UbiI (Figure 19A) dans laquelle les acides aminés G301 et N303 prédits dans le site de liaison au FAD jouent un rôle clé dans l'activité (Hajj Chehade *et al.*, 2013). Il est également intéressant de noter que la protéine UbiI d'*E. coli* est capable de rétablir la biosynthèse de l'UQ₆ dans une souche de *S. cerevisiae* inactivée pour le gène *coq6* (l'homologue fonctionnel d'*ubiI*) (Ozeir *et al.*, 2011; Hajj Chehade *et al.*, 2013).

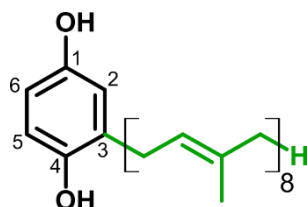


Figure 18. Structure chimique du 3-octaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP₈). D'après Hajj Chehade *et al.* (Hajj Chehade *et al.*, 2013).

UbiH catalyse l'hydroxylation en position C1 du 3-octaprényl-5-méthoxy-4-phénol pour produire le 3-octaprényl-5-méthoxyquinol (Figure 11, réaction f). L'accumulation de 4-HP₈ dans une souche $\Delta ubiI$ montre qu'UbiH est capable d'effectuer l'hydroxylation sur le carbone 1 en absence du groupement méthoxyle en position C5 (voir figure 11) (Hajj Chehade *et al.*, 2013). Les souches d'*E. coli* mutantes pour le gène *ubiH* accumulent de l'OPP, du 3-octaprényl-5-hydroxy-4-phénol et du 3-octaprényl-5-méthoxy-4-phénol (Young *et al.*, 1973; L. Aussel *et al.*, 2014) et présentent un défaut de croissance en conditions aérobies sur des substrats respiratoires tels que le succinate (Gupta *et al.*, 2000) et le glycérol (Joyce *et al.*, 2006). La structure d'UbiH n'est pas connue.

Finalement, UbiF dont la structure est également inconnue, catalyse l'hydroxylation en position C6 en transformant le 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxyquinol (DMQ₈) en 3-

octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxyquinol (Figure 11, réaction h). En conditions aérobies, la souche $\Delta ubiF$ accumule du DMQ₈ (Young *et al.*, 1971; Kwon, Kotsakis and Meganathan, 2000) et présente un défaut de croissance dont la sévérité varie en fonction des milieux de culture (Wallace and Young, 1977a). Ce phénotype s'explique par le fait que le DMQ₈ est capable de transporter efficacement les électrons dans les chaînes respiratoires qui utilisent la NADH déshydrogénase, la D-lactate déshydrogénase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Wallace and Young, 1977a). Par contre, le DMQ₈ ne peut pas être utilisé par la succinate déshydrogénase (Wallace and Young, 1977a). Ainsi, une souche mutante d'*E. coli* pour le gène *ubiF* montre un défaut de croissance dans un milieu contenant du succinate comme seule source de carbone (Kwon, Kotsakis and Meganathan, 2000). La protéine UbiF d'*E. coli* est capable de rétablir la biosynthèse de l'UQ dans une souche mutante de *S. cerevisiae* pour le gène *coq7* (l'homologue fonctionnelle d'*ubiF* chez les eucaryotes et certaines bactéries) (Tran *et al.*, 2006). En retour, les protéines Coq7 de *P. aeruginosa* et de *C. elegans* rétablissent la biosynthèse de l'UQ₈ dans une souche d'*E. coli* $\Delta ubiF$ (Stenmark *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003).

Les trois protéines UbiI, UbiH et UbiF partagent 29 à 38% d'identité de séquence. Une forte conservation est observée au niveau de trois motifs - le « Rossman fold FAD binding », les motifs GD et DG - qui participent à la fixation du cofacteur FAD (Figure 19B) (Eppink, Berkel and Schreuder, 1997; Pelosi *et al.*, 2016). Les modèles Alphafold d'UbiH et d'UbiF sont disponibles. Ces modèles présentent un repliement global très similaire à celui d'UbiI. Cette dernière structure cristallographique est par ailleurs superposable à celle de la PHBH de *Pseudomonas fluorescens* (Figure 19C). Il est important de préciser que la structure d'UbiI a été obtenue sans FAD ce qui empêche d'obtenir des informations précises sur la géométrie de son site actif.

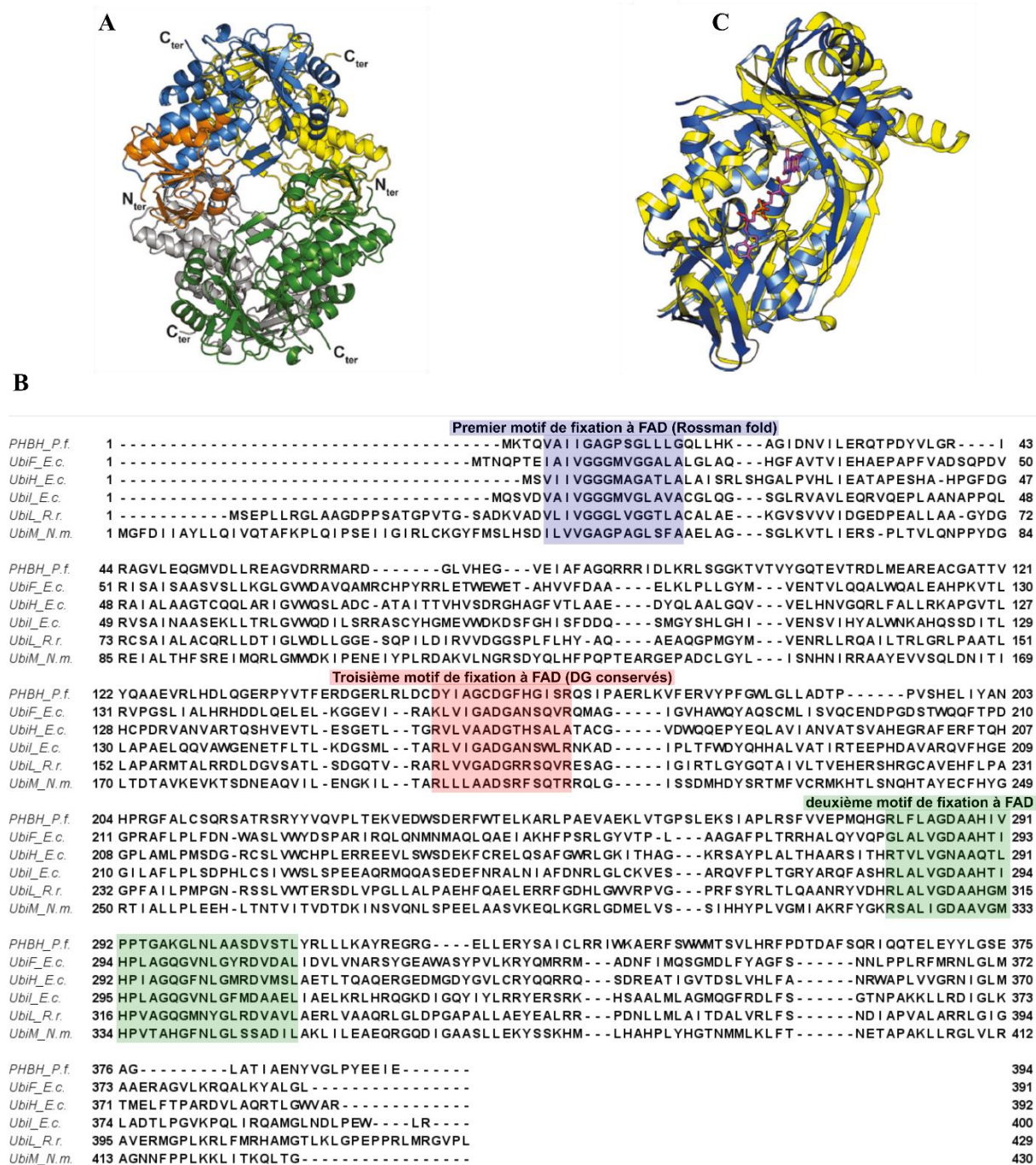


Figure 19. Similarité structurale et de séquence des monoxygénases à flavine (A) Structure cristallographique du tétramère d'UbiI tronquée d'*E. coli* (code PDB : 4K22). Chaque sous-unité est représentée avec une couleur différente. Pour la sous-unité bleue, le motif Rossmann fold est représenté en orange. **(B)** L'alignement de séquences des FMOs UbiI (NP_417382.1), UbiH (NP_417383.1) et UbiF (NP_415195.1) d'*E. coli* (*E.c.*), UbiL (WP_011391454.1) de *Rhodospirillum rubrum* (*R.r.*), UbiM (EFM05404) de *Neisseria meningitidis* (*N.m.*) et PHBH (P00438) de *Pseudomonas fluorescens*. L'alignement de séquence a été généré par Clustal Omega et a été affiché par le programme Jalview. A l'exception de PHBH qui a un numéro d'accès Uniprot, les autres numéros d'accès correspondent à ceux du NCBI. Les trois motifs de la liaison au FAD sont surlignés en bleu, rose et vert, d'après (Eppink, Berkel and Schreuder, 1997; Pelosi *et al.*, 2016). **(C)** Superposition d'un monomère d'UbiI tronquée d'*E. coli* (bleu) et de PHBH de *P. fluorescens* (jaune). La molécule de FAD de PHBH est représentée en violet. Les panels (A) et (C) sont tirés de l'article de Hajj Chehade *et al.* (Hajj Chehade *et al.*, 2013).

III.1.1.3.a.iv. Méthyltransférases : UbiE et UbiG

Trois réactions de méthylation sont catalysées dans la voie de biosynthèse de l'UQ. Deux d'entre elles sont réalisées sur les atomes d'oxygène des groupements hydroxyles portés par les carbones 5 et 6 du noyau aromatique. La troisième correspond à l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 2 du cycle aromatique. Ces réactions de méthylation s'intercalent avec les trois réactions d'hydroxylation de la voie (Figure 11, réactions e, j, i) et sont catalysées par deux méthyltransférases dépendantes de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) : UbiG et UbiE.

UbiG catalyse les deux réactions de méthylations sur l'O5 du 3-octaprényl-5-hydroxy-4-phénol et l'O6 du 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxyquinol pour former respectivement le 3-octaprényl-5-méthoxy-4-phénol et l'UQ₈ (Figure 11 réactions e et j). Cette enzyme est principalement cytosolique. (Leppik, Young and Gibson, 1976; Hajj Chehade *et al.*, 2019). La protéine UbiG a été cristallisée en présence de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH, le produit déméthylé de la SAM). Sa structure est monomérique (Xing *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015, 2016). Chez *E. coli*, il a été montré que la région d'UbiG allant des acides aminés 165 à 187 était essentielle à la biosynthèse de l'UQ₈ *in vivo* et pour l'interaction *in vitro* de cette protéine avec des liposomes. Les auteurs de ce travail ont également proposé que l'interaction de cette région avec la membrane plasmique pourrait ouvrir un canal permettant à la SAM d'accéder à son site de liaison (Zhu *et al.*, 2015, 2016). Cependant, cette proposition reste spéculative. Les souches mutantes pour le gène *ubiG* accumulent de l'OPP et du 3-octaprényl-2-méthyl-5-méthoxy-6-hydroxyquinol (Figure 11) (Stroobant, Young and Gibson, 1972) et sont incapables de croître dans des milieux contenant une source de carbone non fermentescible tel que le succinate ou le glycérol (Wu *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 1996; Joyce *et al.*, 2006) aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose (Pelosi *et al.*, 2019). La protéine UbiG d'*E. coli* possède 40% d'identité de séquence avec son homologue fonctionnel Coq3 de *S. cerevisiae* (Hsu *et al.*, 1996) et l'expression d'UbiG d'*E. coli* fusionnée à une séquence d'adressage mitochondriale rétablit la biosynthèse de l'UQ₆ dans la souche mutante $\Delta coq3$ et lui permet de croître sur un milieu respiratoire (Hsu *et al.*, 1996).

Contrairement à UbiG, UbiE, ajoute un groupement méthyl sur un atome de carbone et non sur un atome d'oxygène. La méthyltransférase UbiE est commune aux voies de biosynthèse de l'UQ₈ et de la MK₈ (Figure 24). UbiE catalyse la réaction de méthylation du carbone 2 du 3-octaprényl-5-méthoxyquinol (DDMQ₈) pour produire du DMQ₈ (Figure 11, réaction g) et du carbone 2 du cycle A de la DMK₈ pour former de la MK₈ (Figure 1D et 24). UbiE est majoritairement soluble chez *E. coli* (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Une souche mutante d'*E. coli* pour le gène *ubiE* synthétise une seule quinone, la DMK₈, et accumule un intermédiaire de la

voie de l'UQ₈, le DDMQ₈ (Figure 11) à la fois en aérobie et en anaérobie (Young *et al.*, 1971; Wissenbach, Ternes and Unden, 1992; Lee *et al.*, 1997). En anaérobie, un mutant d'*E. coli* pour le gène *ubiE* peut se développer dans un milieu contenant du glucose ou une source de carbone non fermentescible, telle que le fumarate, et un accepteur d'électron tel que le DMSO ou le TMAO (mais pas le nitrate) (Wissenbach, Ternes and Unden, 1992; Britta Soballe and Robert K. Poole, 1997). Notons qu'UbiE d'*E. coli* possède 44% identité de séquence avec la protéine Coq5 qui est son homologue fonctionnel chez *S. cerevisiae* (Barkovich *et al.*, 1997). UbiE fusionnée à une séquence d'adressage mitochondriale est capable de compléter une souche mutante $\Delta coq5$ (Lee *et al.*, 1997). La structure tridimensionnelle de la protéine UbiE d'*E. coli* n'est pas connue. Tout comme les protéines UbiG et Coq3, UbiE et Coq5 contiennent trois motifs structuraux conservés caractéristiques des méthyltransférases qui utilisent la SAM comme donneur de groupement méthyle (Clarke, Williams and Teruya, 1991; Wu *et al.*, 1992; Kagan R.M. and Clarke S., 1994; Lee *et al.*, 1997). Il a été proposé que ces motifs puissent être impliqués dans la liaison à la SAM (Schluckebier *et al.*, 1995).

III.1.1.3.b. Protéines accessoires

III.1.1.3.b.i. Protéines de la famille d'UbiB

La protéine UbiB est essentielle à la biosynthèse de l'UQ₈ puisque la souche mutante d'*E. coli* $\Delta ubiB$ ne synthétise presque plus d'UQ₈ à la fois en conditions aérobies et anaérobies (Poon *et al.*, 2000; Aussel *et al.*, 2014; Pelosi *et al.*, 2019). Les mutants du gène *ubiB* accumulent principalement de l'OPP (Cox *et al.*, 1969; Young *et al.*, 1973; Alexander and I. G. Young, 1978; Poon *et al.*, 2000). De façon concomitante, le mutant d'*E. coli* pour le gène *ubiB* présente un défaut majeur de croissance sur milieu respiratoire avec le succinate comme seule source de carbone (Macinga *et al.*, 1998).

A l'origine, UbiB a été proposée comme l'hydroxylase ajoutant le groupement hydroxyle sur le carbone 5 du noyau aromatique (Poon *et al.*, 2000). Depuis, il a été démontré que la protéine UbiI catalyse cette réaction (Hajj Chehade *et al.*, 2013). UbiB, comme ses homologues eucaryotes (Coq8 et ADCK3 par exemple) fait partie de la famille des protéines kinases atypiques de par leur repliement qui les distingue des autres kinases (Leonard, Aravind and Koonin, 1998; Stefely *et al.*, 2015). Reidenbach et coll. ont purifié UbiB d'*E. coli*, fusionnée avec la maltose binding protéine (MBP). Dans cette chimère, UbiB est également tronquée de ses 47 derniers acides aminés qui sont prédits pour former un domaine transmembranaire. Les auteurs de ce travail ont montré que l'OPP et l'OHB co-purifient avec UbiB (Reidenbach *et al.*, 2018). Il a également été démontré que Coq8 et ADCK3 interagissent

également avec des intermédiaires de biosynthèse de l'UQ (Stefely *et al.*, 2015, 2016). De plus, les protéines appartenant à la famille d'UbiB présentent toutes une activité ATPasique et cette dernière est stimulée en présence de lipides tels que la cardiolipine et de composés structurellement proches des intermédiaires de biosynthèse de l'UQ (Reidenbach *et al.*, 2018). La fonction des protéines UbiB dans la biosynthèse de l'UQ fait toujours l'objet d'interrogations. Toutefois, il a été proposé qu'elles puissent en hydrolysant de l'ATP, permettre l'extraction hors de la membrane des précurseurs de l'UQ afin de les rendre disponibles aux enzymes de la voie de biosynthèse de l'UQ (Reidenbach *et al.*, 2018; Abby *et al.*, 2020). Pour *E. coli*, UbiB permettrait de transloquer l'OPP localisé dans la membrane vers le complexe cytosolique de biosynthèse de l'UQ₈ (voir III.1.1.4.) puis de récupérer l'UQ₈ néosynthétisé afin de l'insérer dans la membrane (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Ce modèle reste néanmoins spéculatif.

III.1.1.3.b.ii. Protéines UbiJ et UbiK

UbiJ est une protéine accessoire qui est essentielle à la biosynthèse de l'UQ₈ en conditions aérobies (Aussel *et al.*, 2014; Pelosi *et al.*, 2019). En conditions aérobies, la souche mutante d'*E. coli* pour le gène *ubiJ* est déficiente pour la synthèse d'UQ₈, accumule de l'OPP et montre un défaut de croissance sur milieu respiratoire. L'expression des 50 acides aminés de l'extrémité C-terminale d'UbiJ permet de restaurer en partie la biosynthèse de l'UQ₈ et de palier le défaut de croissance (Aussel *et al.*, 2014). En conditions anaérobies, la souche mutante d'*E. coli* Δ *ubiJ* synthétise l'UQ₈ à un niveau comparable à celui de la souche WT (Aussel *et al.*, 2014; Pelosi *et al.*, 2019). UbiJ contient un domaine SCP2 (sterol carrier protein 2) à son extrémité N-terminale. Les domaines SCP2 sont connus pour fixer des lipides (Burgardt *et al.*, 2017). Celui d'UbiJ a été cristallisé (Figure 20A) et montre une cavité bordée d'acides aminés conservés hydrophobes dont la taille et la forme pourraient permettre de loger la chaîne octaprényle des intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'UQ₈ (Figure 20B) (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Cette hypothèse est confortée par des données biochimiques qui montrent que le domaine N-terminal d'UbiJ co-purifie avec l'UQ₈, l'OPP et la DMQ₈ (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Le domaine C-terminal d'UbiJ interagit de manière spécifique avec la protéine UbiK et ces deux protéines forment un complexe hétérotrimérique contenant un monomère d'UbiJ pour deux monomères d'UbiK (Figure 20C). En conditions aérobies et dans un milieu riche, la souche d'*E. coli* Δ *ubiK* ne montre aucun défaut de croissance mais synthétise seulement 18% du contenu en UQ₈ de la souche WT. A l'inverse, en anaérobiose, la souche Δ *ubiK* contient un niveau d'UQ₈ similaire à celui de la souche WT (Loiseau *et al.*, 2017). La protéine UbiK

exprimée et purifiée seule s'organise en homotrimère et ne lie pas de lipides. La co-expression d'UbiK et d'UbiJ permet de former un complexe stable et l'absence d'UbiK rend UbiJ insoluble (Loiseau *et al.*, 2017). Nous avons montré qu'UbiJ est essentielle pour la stabilisation du complexe de biosynthèse de l'UQ₈ chez *E. coli* (voir III.1.1.4.) (Hajj Chehade *et al.*, 2019). De plus, en utilisant des approches *in silico*, des collaborateurs ont démontré que le complexe UbiJ/UbiK interagissait avec la membrane (Launay *et al.*, 2022). Pris collectivement, ces résultats ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle le complexe UbiJ/UbiK formerait une plateforme d'amarrage permettant une interaction transitoire entre le complexe de biosynthèse qui est soluble et la membrane plasmique afin de faciliter la libération dans la membrane de l'UQ₈ néosynthétisée (Launay *et al.*, 2022) ou de rendre l'UQ₈ plus accessible à UbiB (Figure 21).

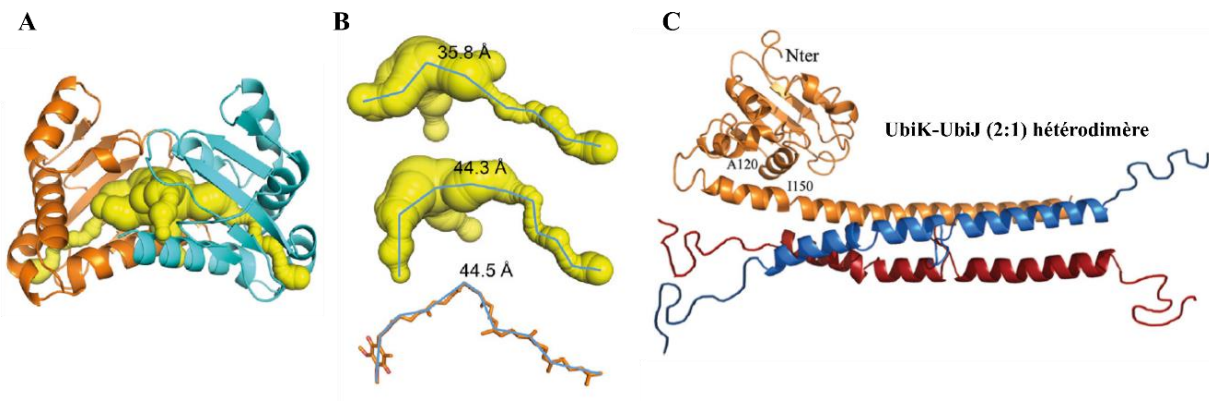


Figure 20. Structure de la protéine UbiJ et son complexe avec la protéine UbiK (A) Structure cristallographique dimérique du domaine stérol carrier protein 2 (SCP2) de la protéine UbiJ d'*E. coli* (code PDB : 6H6N). Ces monomères (chaîne A en orange et chaîne B en bleu) sont asymétriques et contiennent chacun, un feuillet β de cinq brins et cinq hélices α . Les sphères jaunes représentent la cavité trouvée dans le domaine SCP2 d'UbiJ. (B) Cavités hydrophobes dans la chaîne A (en haut) et la chaîne B (au milieu) du domaine SCP2 d'UbiJ et la comparaison avec l'UQ₈ (en bas). Les longueurs des cavités et l'UQ₈ sont indiquées. (C) Modèle hypothétique de complexe hétérotrimère UbiK-UbiJ (2:1) généré par Phyre 2. Le monomère d'UbiJ est en orange et les deux monomères d'UbiK sont en bleu et rouge. Dans ce modèle, le domaine C-terminal d'UbiJ qui est une hélice forme un motif « helical triple coil » avec l'homodimère d'UbiK constitué principalement d'hélices. Les panels (A) et (B) sont tirés de l'article de Hajj Chehade *et al.* (Hajj Chehade *et al.*, 2019) et celui de (C) de Loiseau *et al.* (Loiseau *et al.*, 2017).

III.1.1.4. Organisation supramoléculaire de la voie de biosynthèse de l'UQ

En 2019 notre équipe a mis en évidence la présence d'un complexe multiprotéique impliqué dans la biosynthèse de l'UQ₈ chez *E. coli* en aérobiose (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Contre toute attente et malgré la localisation membranaire de l'UQ₈, ce complexe estimé à 1 MDa est localisé dans la fraction soluble d'extraits d'*E. coli*. L'analyse protéomique du complexe purifié a révélé qu'il est composé de sept protéines Ubi (UbiE, UbiF, UbiG, UbiH, UbiI, UbiJ et UbiK) mais leur stœchiométrie au sein du complexe n'est pas connue (Figure 21)

(Hajj Chehade *et al.*, 2019). UbiJ est essentielle à la stabilisation de ce complexe, contrairement aux autres protéines Ubi (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Le complexe Ubi co-purifie avec l'OPP et le DMQ₈ qui sont des intermédiaires de biosynthèse de l'UQ₈. Etant donné le caractère très hydrophobe de ces molécules, nous avons proposé que le domaine SCP2 d'UbiJ pourrait lier la chaîne octaprényle des intermédiaires de biosynthèse au sein du complexe afin de la masquer du solvant. Le noyau aromatique serait accessible aux enzymes Ubi du complexe (UbiI, UbiH, UbiF, UbiG et UbiE) afin qu'elles puissent réaliser les différentes modifications (Figure 11 et 21). Comme mentionné précédemment, le complexe UbiJ/UbiK et/ou UbiB via son activité ATPasique pourrait permettre d'importer l'OPP au complexe de biosynthèse et de délivrer à la membrane l'UQ₈ néosynthétisé (Figure 21).

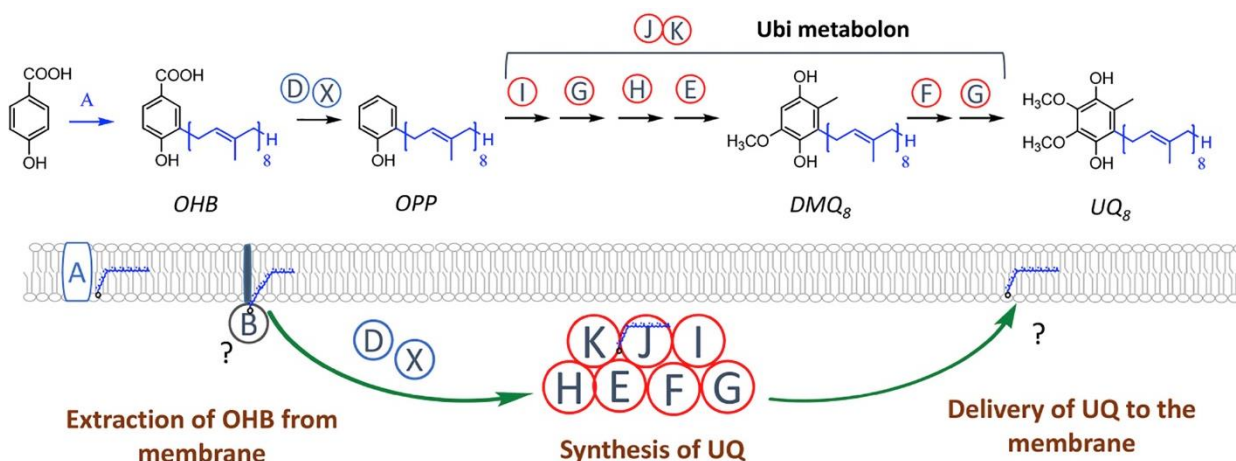


Figure 21. Modèle du complexe de biosynthèse de l'UQ₈ (Ubi-métabolon) chez *E. coli*. Voie de biosynthèse de l'UQ₈ (en haut) et modèle proposé de l'organisation physique des protéines Ubi et des intermédiaires prénylés de l'UQ₈ par rapport à la membrane interne. La même représentation est utilisée pour tous les composés octaprénylés, quels que soient les substituants du groupe de tête benzoquinone. UbiA liée à la membrane, prényle le 4HB pour donner l'OHB qui se localise dans la bicouche lipidique. UbiJ/UbiK et/ou UbiB pourrait aider à l'extraction de l'OHB de la membrane et l'OHB est ensuite décarboxylé en OPP par UbiD-X. L'OPP est lié par UbiJ dans le complexe Ubi et le métabolon formé par les sept protéines Ubi encerclées en rouge synthétise l'UQ₈, qui est finalement acheminé vers la membrane probablement grâce aux UbiJ/UbiK et/ou UbiB. Cette figure est tirée de l'article de Hajj Chehade *et al.* (Hajj Chehade *et al.*, 2019).

III.1.2. Voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ₈

En 1978, Alexander et Young (Alexander and I. G. Young, 1978) ont rapporté qu'*E. coli* est capable de synthétiser l'UQ₈ même en conditions anaérobies. Ce résultat était surprenant étant donné la nécessité d'O₂ pour les réactions d'hydroxylation par UbiI, UbiH et UbiF et suggérait donc qu'il existait une voie de biosynthèse de l'UQ₈ indépendante du dioxygène. Cette dernière a été récemment caractérisée par notre équipe (Pelosi *et al.*, 2019). Les auteurs de cette étude ont d'abord démontré que le 4-HB est le précurseur commun aux

deux voies de biosynthèse et que les protéines accessoires UbiJ et UbiK ne sont pas essentielles pour la synthèse de l'UQ₈ en anaérobiose puisque les souches mutantes $\Delta ubiJ$ ou $\Delta ubiK$ présentent un contenu WT en UQ₈ lorsqu'elles sont cultivées en absence d'O₂. Toutes les enzymes mentionnées pour la voie O₂-dépendante sont également impliquées dans la voie O₂-indépendante de biosynthèse d'UQ₈, à l'exception des Ubi-FMOs (Pelosi *et al.*, 2019). En criblant une collection de mutants de délétion d'*E. coli* pour leur capacité à synthétiser l'UQ₈ en condition anaérobie, l'équipe a pu identifier trois nouveaux gènes -*yhbT*, *yhbU* et *yhbV*- (renommés par la suite *ubiT*, *ubiU* et *UbiV*). Ceux-ci sont essentiels pour la synthèse de l'UQ₈ en conditions anaérobies et totalement dispensables en conditions aérobies (Pelosi *et al.*, 2019). L'analyse bio-informatique de ces trois gènes montrent qu'ils sont répandus au sein des génomes de bactéries capables de synthétiser l'UQ, et que, de manière générale, ils sont co-localisés au même locus chromosomique (Figure 13).

III.1.2.1. Protéine accessoire UbiT

UbiT est une petite protéine cytosolique constituée de 174 acides aminés (Arends *et al.*, 2016). Chez *E. coli*, l'expression du gène *ubiT* est régulée positivement par FNR et négativement par CsgD (un régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans la formation de biofilms chez *E. coli*) (Ogasawara, Yamamoto and Ishihama, 2011; Federowicz *et al.*, 2014). La protéine UbiT est exprimée en début de la phase exponentielle de croissance (en conditions aérobies) et dégradée par FtsH (la seule protéase liée à la membrane chez *E. coli*) (Arends *et al.*, 2016). A ce jour, la fonction d'UbiT est inconnue. Cette dernière est néanmoins essentielle à la synthèse de l'UQ₈ chez *E. coli* en anaérobiose (Pelosi *et al.*, 2019). La protéine UbiT est principalement constituée d'un domaine SCP2 (acides aminés 45 à 133) qui contient des acides aminés hydrophobes conservés formant une cavité ouverte de part et d'autre de la protéine (Arends *et al.*, 2016; Pelosi *et al.*, 2019). La structure tridimensionnelle de la protéine UbiT n'est pas connue. Il a été rapporté que PA3911, une protéine cytoplasmique de la bactérie *P. aeruginosa* et homologue à UbiT d'*E. coli*, est capable de lier l'acide phosphatidique (Groenewold *et al.*, 2018). Notre équipe a récemment démontré que cette même protéine se lie également à la chaîne polyisoprénoïde de l'UQ₉ présent chez *P. aeruginosa* (Vo *et al.*, 2020). L'ensemble de ces résultats a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle UbiT via son domaine SCP2 pourrait être l'homologue fonctionnel d'UbiJ en conditions anaérobies.

III.1.2.2. Protéines UbiU et UbiV

UbiU et UbiV sont composées respectivement de 331 et 292 acides aminés et appartiennent à la famille des peptidases U32 (Pelosi *et al.*, 2019). L'expression des deux protéines est régulée par FNR (voir II.2.3.1.a.) (Federowicz *et al.*, 2014). Notre équipe a démontré que chacune des deux protéines contient un centre [4Fe-4S] (Pelosi *et al.*, 2019). La purification de ces protéines en conditions aérobies conduit à la dégradation oxydative partielle de leurs centres [Fe-S]. Ce résultat est en accord avec d'autres études sur les protéines à centre [Fe-S] (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2000; M. *et al.*, 2007). Les centres [Fe-S] identifiés dans UbiU et UbiV sont coordonnés par un motif conservé de quatre cystéines (Figure 22A) (Pelosi *et al.*, 2019) qui est caractéristique des protéines à centre [Fe-S] (Johnson *et al.*, 2005; Fontecave *et al.*, 2008; Esquilin-Lebron *et al.*, 2021). Des résultats similaires ont également été obtenus chez la bactérie *P. aeruginosa* (Vo *et al.*, 2020). La structure tridimensionnelle des protéines UbiU et UbiV n'est pas connue mais ces deux protéines forment un hétérodimère caractérisé biochimiquement. Ainsi, l'absence d'une des deux protéines conduit à une inhibition de la synthèse de l'UQ₈ en anaérobiose (Pelosi *et al.*, 2019). Bien que la fonction d'UbiU et d'UbiV ne soit pas déterminée, notre équipe a pu montrer que ces deux protéines sont impliquées dans la réaction d'hydroxylation du carbone 6 sur l'intermédiaire DMQ₈ (le substrat d'UbiF sur la figure 11) en conditions anaérobies (Pelosi *et al.*, 2019). Ainsi, il est tentant de proposer qu'UbiU et UbiV, en plus de catalyser au moins l'hydroxylation en position C6 dans la voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ₈, puissent hydroxyler les deux autres positions restantes. Concernant les protéines UbiU et UbiV, de nombreuses questions restent sans réponse. En effet, si elles correspondent à une nouvelle famille d'hydroxylases anaérobies, utilisent-elles l'eau comme donneur de groupement hydroxyle à l'image des hydroxylases à cofacteur à molybdoptérine (Hille, 2005) ? Si ce n'est pas le cas, quel est le donneur de groupement hydroxyle utilisé ? Quel est le rôle des centres [4Fe-4S] dans le mécanisme d'hydroxylation ?

UbiU et UbiV ne sont pas les seules peptidases U32 identifiées chez *E. coli* et susceptibles de catalyser des hydroxylation en conditions anaérobies. En effet, les peptidases U32, RlhA (YdcP) et Trhp (YegQ), sont impliquées respectivement pour l'hydroxylation de la cytidine 2501 sur l'ARN ribosomique 23S (Kimura *et al.*, 2017) et pour l'hydroxylation de l'uracile 34 de certains ARNt (Lauhon, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). De façon intéressante, il a été montré que ces réactions d'hydroxylation sont dépendantes d'un métabolite de la voie du shikimate, probablement le préphénate (Kimura *et al.*, 2017; Lauhon, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). La délétion de gènes *isc* impliqués dans la biogénèse des centres

[Fe-S] (Py and Barras, 2010) conduit à une diminution de l'hydroxylation de l'ARN ribosomique 23S. Ce résultat suggère que la fonction de RlhA est également dépendante d'un centre [Fe-S] (Kimura *et al.*, 2017) tout comme pour UbiU et UbiV. L'hypothèse selon laquelle les centres [Fe-S] présents dans les peptidases U32 seraient importants à leur fonction est également supportée par une étude récente qui a démontré que TrhP contient également un centre [4Fe-4S] (Bak and Weerapana, 2023).

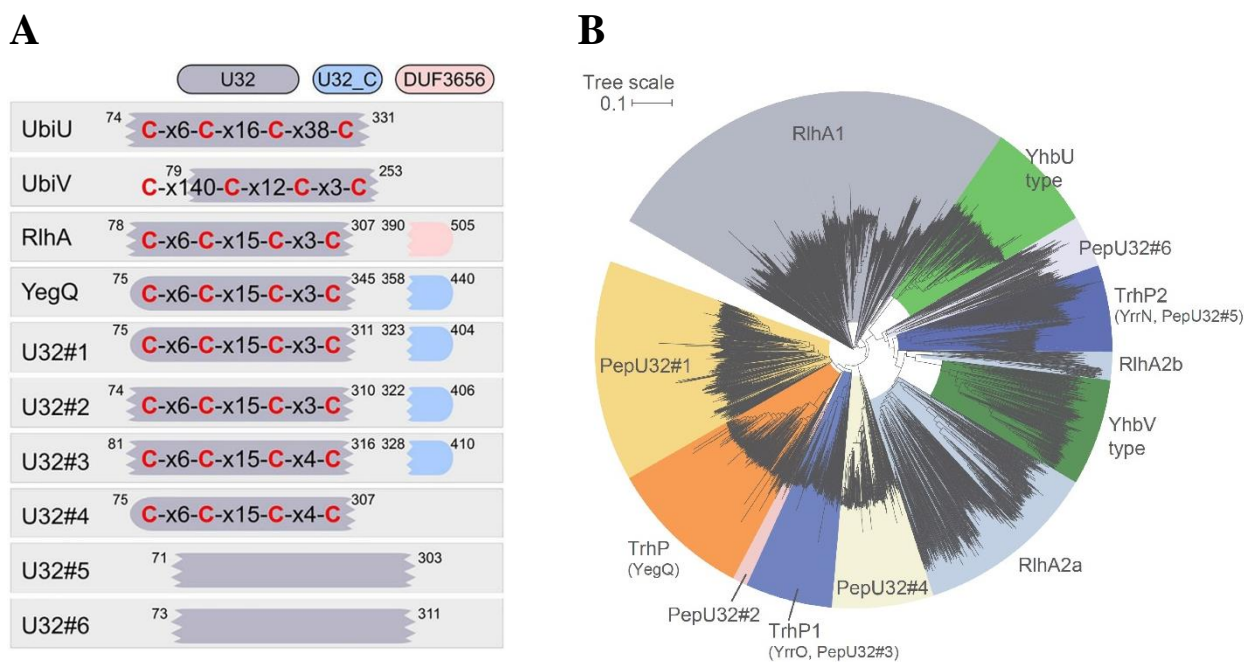


Figure 22. Analyse phylogénétique et motif de cystéines conservées des peptidases U32 (A) Motif de 4 cystéines conservées chez la plupart des peptidases U32. Les cystéines conservées sont en rouges et x6 indique que 6 résidus ont été trouvés entre deux cystéines conservées. La position du domaine sur la protéine référence est affichée à l'extérieur des cases grises. **(B)** Arbre phylogénétique de 3521 peptidases U32 révèle 12 groupes présentés à l'aide de couleurs différentes. Les panels **(A)** et **(B)** sont tirés respectivement des articles de Pelosi *et al.* et Sakai *et al.* (Pelosi *et al.*, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019).

III.1.2.3. Les peptidases U32

Les peptidases U32 sont des protéines annotées comme des collagénases dans la base de données MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) (Rawlings *et al.*, 2018). Cette base est une source de données sur les peptidases et leurs protéines inhibitrices. Elle utilise une classification hiérarchique basée sur la structure des peptidases (Rawlings, Barrett and Bateman, 2012) et selon cette classification, les protéines de cette base de données sont attribuées à une famille sur la base de leur homologie de séquences en acides aminés et les familles homologues sont regroupées dans un clan. Les peptidases U32 dont le mécanisme catalytique est inconnu, appartiennent au clan U- et une étude phylogénétique sur 3521

séquences de peptidases U32 a révélé 12 groupes appartenant à dix familles (Figure 22B) (Kimura *et al.*, 2017; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019; Bak and Weerapana, 2023). L'alignement de 3460 séquences de peptidases U32 représentant pas moins de 10 familles a montré l'existence d'un motif de quatre cystéines conservées dans huit familles sur dix (Figure 22A). Dans ces 8 groupes, nous trouvons les quatre peptidases U32 d'*E. coli*, c'est-à-dire UbiU, UbiV, RlhA et TrhP (Figure 22A). Il est donc fort probablement que la présence d'un centre [4Fer-4S] soit une caractéristique commune à une majorité de ces protéines (Pelosi *et al.*, 2019).

Les peptidases U32 se retrouvent principalement chez les bactéries et les archées et nombre d'entre-elles sont pathogènes pour l'homme (Jasilionis *et al.*, 2012). Par exemple, la peptidase U32 PrtC de *Porphyromonas gingivalis* présente une activité protéolytique sur le collagène de type I qui pourrait être liée à des maladies parodontales (Kato, Takahashi and Kuramitsu, 1992; Odell *et al.*, 1999; Schacherl *et al.*, 2015). La peptidase U32 HP0169 est une collagénase sécrétée par la bactérie *Helicobacter pylori* qui est essentielle pour la colonisation gastrique de cette bactérie chez l'Homme (Kavermann *et al.*, 2003). YdcP qui est l'homologue de RlhA chez *E. coli* est une collagénase présumée de la famille des peptidases U32 chez *Salmonella typhimurium* et la souche mutante de *S. typhimurium* $\Delta ydcP$ montre une prolifération intracellulaire atténuée de cette bactérie dans les macrophages murins et humains (Hajra *et al.*, 2022). Il a également été rapporté dans la littérature qu'YegQ (homologue de TrhP chez *E. coli*) de *Salmonella* contribue à sa pathogénicité (Wu, Carlson and Meyerholz, 2002; Xiong *et al.*, 2011) et qu'un membre des peptidases U32 est associé à la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *Providencia stuartii* (Mc Gann *et al.*, 2012). Les protéines YprA et YprB de *Yersina ruckeri* sont les homologues respectivement d'UbiU et d'UbiV. Leur implication dans la virulence de cette bactérie est avérée (Navais *et al.*, 2014).

La structure cristallographique du domaine U32 de la protéine Mk0906 de *Methanopyrus kandleri*, une archée méthanogène hyperthermophile, a été résolue par Schacherl et coll. en 2015 (Schacherl *et al.*, 2015). Cette protéine présente une structure dimérique et chaque monomère possède une séquence conservée contenant une histidine et une cystéine permettant de lier un ion Zn^{2+} . Cette structure en forme de tonneau TIM (motif découvert dans l'enzyme triosephosphate isomérase) manque de motifs structuraux apte à catalyser l'hydrolyse de liaisons peptidiques ou à activer de l'eau et les analyses biochimiques montrent d'ailleurs l'absence d'activité peptidase chez cette protéine. Mk0906 pourrait donc avoir une autre fonction indéterminée actuellement. (Schacherl *et al.*, 2015).

III.1.2.4. Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (voie du Shikimate)

La voie du shikimate fournit les précurseurs pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques, dont le chorismate qui est également le précurseur du 4-HB utilisé dans la biosynthèse de l'UQ (Figure 23). La voie du shikimate est commune aux microorganismes, aux plantes et absente des animaux (Herrmann and Weaver, 1999). Elle est largement décrite dans la littérature. En résumé, l'érythrose-4-phosphate (un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) et le phosphoénolpyruvate (PEP) (un métabolite de la glycolyse) sont deux précurseurs à partir desquels est synthétisé le chorismate via sept réactions chimiques séquentielles (Figure 23). Il existe trois isoenzymes - AroH, AroF et AroG- qui agissent comme 3-déoxy-D-arabino-héptulosonique acide-7-phosphate (DAHP) synthase pour synthétiser le DAHP à partir de l'érythrose-4-phosphate. AroH, AroF et AroG sont inhibées respectivement par le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (Pittard and Yang, 2008). Ensuite, AroB, la 3-dehydroquinase (DHQ) synthase, convertit le DAHP en DHQ. Ce dernier composé est à son tour transformé en 3-déhydroshikimate par AroD, une DHQ déshydratase. Le produit d'AroD est enfin converti en shikimate par la shikimate déshydrogénase AroE. Les shikimate kinase I (AroK) et II (AroL) phosphorylent le shikimate pour générer du shikimate 3-phosphate. AroK et AroL sont des isoenzymes qui présentent une différence d'affinité pour le shikimate, celle d'AroK étant inférieure à celle d'AroL (Pittard and Yang, 2008). La 5-énolpyruvoyl-shikimate 3-phosphate (EPSP) synthase (AroA) convertit à son tour le PEP et le shikimate 3-phosphate en EPSP. Finalement, le chorismate est produit par la chorismate synthase (AroC) qui finalise l'oxydation du cyclique aromatique. Le chorismate est utilisé comme substrat pour la synthèse des acides aminés aromatiques, du 4-HB (le précurseur aromatique de la biosynthèse de l'UQ₈), de l'isochorismate (le précurseur aromatique de la biosynthèse des (D)MK₈) et de l'entérobactine qui est un sidérophore qui chélate le fer ferrique avec une haute affinité (Figure 23). Toutes les enzymes mentionnées sont exprimées constitutivement à l'exception des protéines AroH, AroF, AroG, AroL et AroA qui sont soumises à un rétrocontrôle négatif par les acides aminés aromatiques (Pittard and Yang, 2008).

Comme évoqué précédemment, UbiC convertit le chorismate en 4-HB et MenF et EntC le convertissent en isochorismate. Le tryptophane est synthétisé à partir du chorismate suite aux cinq réactions séquentielles catalysées par les enzymes codées par les gènes *trpA* à *E* (Figure 23). La synthèse des deux autres acides aminés aromatiques -tyrosine et phénylalanine- à partir du chorismate commence par la conversion du chorismate en préphénate (Figure 23). Chez *E. coli*, les deux enzymes responsables de cette réaction sont la chorismate mutase-préphénate déshydratase (PheA) et la chorismate mutase-préphénate déshydrogénase (TyrA) (Pittard and

Yang, 2008). PheA contient un domaine N-terminal chorismate mutase (CM) d'une part et un domaine C-terminal préphénate déshydratase (PDT) d'autre part. Le domaine CM catalyse la conversion du chorismate en préphénate tandis que le domaine PDT catalyse la réaction de conversion du préphénate en phénylpyruvate. Le phénylpyruvate est ensuite transformé en phénylalanine par la tyrosine aminotransférase TyrB et/ou l'aminotransférase d'acide aminé à chaîne ramifiée IlvE et/ou l'aspartate aminotransférase AspC (Figure 23). TyrA possède également une activité chorismate mutase convertissant le chorismate en préphénate et une activité préphénate déshydrogénase qui convertit le préphénate en 4-hydroxyphénylpyruvate. Ce dernier est ensuite transformé en tyrosine par AspC ou TyrB (Figure 23) (Pittard and Yang, 2008).

Il est important de noter que dans les souches inactivées à la fois pour TyrA et le domaine CM de PheA, et qui sont donc déficientes en préphénate (Figure 23), les réactions d'hydroxylation impliquant les deux peptidases U32, RlhA et Trhp, sont inhibées. L'expression du domaine CM de PheA dans ces souches rétablit les réactions d'hydroxylation (Kimura *et al.*, 2017; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). Enfin, l'ajout du préphénate dans le milieu de culture rétablit également l'hydroxylation de certains ARNt dans la souche double mutante d'*E. coli* $\Delta tyrA \Delta pheA$ (Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). L'ensemble de ces résultats suggère que le préphénate puisse jouer un rôle clé dans les réactions d'hydroxylation en lien avec les peptidases U32. Un rôle de co-facteur ou de donneur de groupement OH a été envisagé.

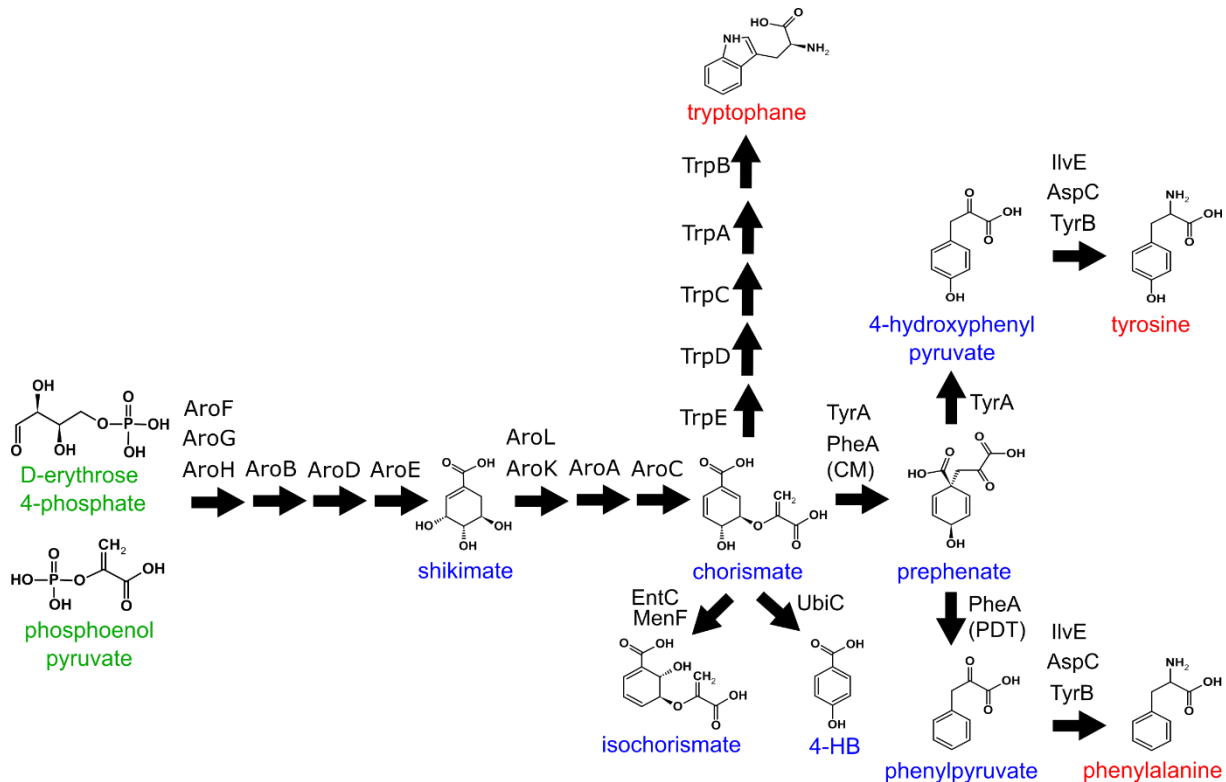


Figure 23. Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (voie du shikimate) chez *E. coli*. Les précurseurs et les métabolites de la voie ainsi que les trois acides aminés synthétisés sont respectivement désignés en vert, bleu et rouge. La structure de tous les métabolites acides est représentée sous une forme protonée mais leurs noms indiquent la forme déprotonée. Adapté de Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 2017).

III.1.3. Régulation de la biosynthèse de l'UQ₈

Chez *E. coli*, la tension en dioxygène détermine le contenu cellulaire des trois quinones respiratoires. En conditions aérobies, le niveau d'UQ₈ est plus élevé. A l'inverse, en anaérobiose, les niveaux des MK₈ et DMK₈ augmentent respectivement de ~20 et de ~40 fois par rapport à ceux mesurés en aérobiose (Nitzschke and Bettenbrock, 2018). Il a été montré que les gènes *ubiA*, *ubiC*, *ubiG*, *ubiD* et *ubiX* sont plus exprimés en conditions aérobies et la présence du glucose dans le milieu entraîne une diminution de l'expression de ces gènes (Gibert, Llagostera and Barbé, 1988; Kengo Suzuki *et al.*, 1994; Britta Soballe and Robert K. Poole, 1997; Zhang and Javor, 2003; Kwon, Druce-Hoffman and Meganathan, 2005). En outre, il a été rapporté que l'utilisation du glycérol comme source carbonée à la place du glucose permet à *E. coli* d'augmenter la synthèse d'UQ₈ d'environ un facteur deux (Martínez *et al.*, 2019). Notons également que la transcription de l'opéron *ubiCA* ainsi que les gènes *ubiD* et *ubiX* est régulé négativement par FNR chez *E. coli* (Britta Soballe and Robert K. Poole, 1997; Zhang and Javor, 2003).

Sachant que le chorismate est un métabolite utilisé pour générer à la fois les précurseurs aromatiques de l'UQ₈ et ceux des (D)MK₈ ainsi que de l'entérobactine (Figure 23), une souche double mutante d'*E. coli* $\Delta menF \Delta entC$ présente une augmentation d'environ 1,5 fois du contenu en UQ₈ comparé à la souche WT (Martínez *et al.*, 2019). La chaîne octaprényle est utilisée à la fois dans la biosynthèse de l'UQ₈ et dans celle de la (D)MK₈. Ainsi, une souche mutante d'*E. coli* $\Delta menA$ dépourvue de la prényltransférase impliquée dans la prénylation des naphtoquinones (Figure 24) contient environ 2 fois plus d'UQ₈ que la souche WT (Xu *et al.*, 2014). Il est important de préciser que Xu et coll. ont également montré que le contenu en UQ₈ augmente d'environ 3 fois dans une souche WT et dans une souche $\Delta menA$ d'*E. coli* en combinant la surexpression des protéines Dxs et UbiA et en ajoutant du 4-HB et du pyruvate dans le milieu de culture (Xu *et al.*, 2014). Dxs est impliquée dans la synthèse du précurseur octaprényl (voir III.1.1.2.) et UbiA est la prényltransférase de la voie de la biosynthèse de l'UQ₈ (voir III.1.1.3.a.i.). L'ensemble de ces résultats montrent que le 4-HB et la chaîne isoprénoïde tout comme les gènes *ubiA* et *dxs* sont des facteurs limitants pour la biosynthèse de l'UQ₈ chez *E. coli*. La régulation des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* par FNR a été démontrée et ce travail fait l'objet d'une publication qui se trouve dans la partie des résultats de ce manuscrit de thèse.

III.2. Voie de biosynthèse de la MK₈

La MK₈ est synthétisée par la voie « Men » chez *E. coli* (Figure 24). Cette voie tout comme celle de biosynthèse de l'UQ₈ est constituée de plusieurs étapes (Figure 24). Comme le noyau polaire de l'UQ₈ (4-HB), la tête polaire de la MK₈ -l'1,4-dihydroxy-2-naphthoate (DHNA)- est synthétisée à partir du chorismate (Figure 23) après plusieurs réactions consécutives catalysées respectivement par les enzymes MenF (isochorismate synthase), MenD (2-succinyl-5-énolpyruvoyl-6-hydroxy-3-cyclohexène-1-carboxylate synthase), MenH (2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiène-1-carboxylate synthase), MenC (o-succinylbenzoate synthase), MenE (o-succinylbenzoate-CoA ligase), MenB (1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase) et MenI (1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase) (Figure 24) (Nowicka and Kruk, 2010; Chen *et al.*, 2013). Les voies de biosynthèse de l'UQ₈ et de la MK₈ chez *E. coli* partagent la même chaîne octaprényle. La prénylation du DHNA est catalysée par la prényltransférase MenA et permet la production de la DMK₈ qui est à la fois le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de la MK₈ et une des trois quinones isoprénoïdes d'*E. coli*. Enfin, cette voie se termine avec la méthylation sur le carbone 2 du cycle A de la DMK₈ (Figure 1D) pour produire de la MK₈ (Figure 24). Cette méthylation est catalysée par UbiE

(voir III.1.1.3.a.iv.), la méthyltransférase commune entre la voie de biosynthèse de l'UQ₈ et de la MK₈. UbiE est également appelée MenG dans la voie Men (Nowicka and Kruk, 2010).

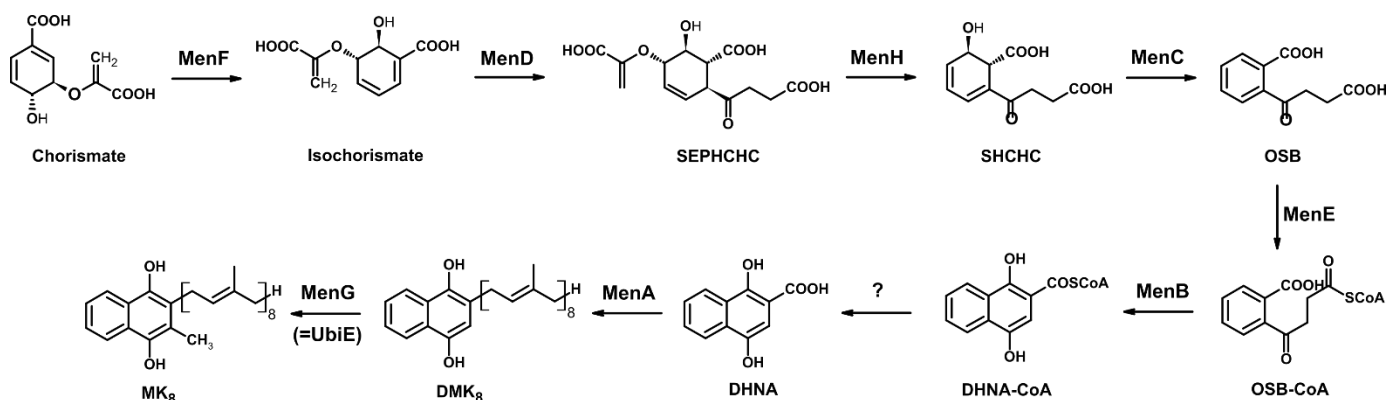


Figure 24. Voie de biosynthèse de la MK₈ chez *E. coli*. SEPHCHC, 2-succinyl-5-énolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexène-1-acide carboxylique ; SHCHC, (1R, 6R)-2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiène-1-acide carboxylique ; OSB, o-succinylbenzoate ; DHNA, 1,4-dihydroxy-2-naphtoate ; CoA, coenzyme A. Adapté de Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2013).

IV. Biosynthèse de l'UQ chez d'autres bactéries et les eucaryotes

Outre *E. coli*, les voies de biosynthèse de l'UQ ont été étudiées chez d'autres bactéries telles que *P. aeruginosa* (Jiang *et al.*, 2019) et *Xanthomonas campestris* (Zhou *et al.*, 2019) et chez les eucaryotes en utilisant *S. cerevisiae* comme modèle principal. Les données de la littérature montrent que ces voies de biosynthèse qui comportent plusieurs étapes sont assez bien conservées avec notamment des gènes homologues entre les bactéries et les eucaryotes, même si les données évolutives restent pour l'instant assez sommaire (Abby *et al.*, 2020; Pierrel *et al.*, 2022). Dans ce chapitre de mon introduction et à l'aide de la littérature, je réaliserai une étude comparative des voies de biosynthèse de l'UQ₈ chez *E. coli* avec celles d'autres bactéries et eucaryotes.

IV.1. Etude des voies de biosynthèse de l'UQ chez d'autres bactéries

IV.1.1. Voie de biosynthèse de l'UQ chez *X. campestris*

X. campestris est une γ -protéobactérie gram négatif. Cet organisme est une bactérie strictement aérobie et un pathogène des plantes. La forme majoritaire d'UQ produite chez *X. campestris* est l'UQ₈ (Zhou *et al.*, 2013, 2019) et la présence de cette quinone contribue à la virulence de la bactérie chez le radis chinois (Zhou *et al.*, 2019). Aucun homologue de la chorismate-pyruvate lyase UbiC n'est présent dans le génome de *X. campestris*, et le 4-HB est produit par la chorismatase bifonctionnelle XanB2 qui utilise le chorismate pour générer à la

fois du 4-HB et du 3-HB (ortho-hydroxybenzoate). Le 4-HB est utilisé comme précurseur aromatique pour synthétiser de l'UQ₈ tandis que le 3-HB sert à produire la xanthomonadine qui est un pigment. UbiC rétablit la production du 4-HB dans une souche de *X. campestris* mutée pour le gène *xanB2* (Zhou *et al.*, 2013). *X. campestris* présente des gènes *ubi* homologues à ceux identifiés chez *E. coli*: *ubiA_{Xc}*, *ubiB_{Xc}*, *ubiE_{Xc}*, *ubiG_{Xc}*, *ubiH_{Xc}*, *ubiI_{Xc}*, *ubiJ_{Xc}* et *ubiK_{Xc}* (Zhou *et al.*, 2019). La délétion individuelle des gènes *ubiB_{Xc}*, *ubiH_{Xc}*, *ubiI_{Xc}*, *ubiJ_{Xc}* et *ubiK_{Xc}* conduit à une perte totale ou partielle de synthèse d'UQ₈ dans cette bactérie. Les souches mutantes $\Delta ubiB_{Xc}$, $\Delta ubiJ_{Xc}$ et $\Delta ubiK_{Xc}$ accumulent l'intermédiaire précoce OHB (Zhou *et al.*, 2019). La surexpression d'UbiJ_{Xc} ne complémente pas une souche mutante d'*E. coli* $\Delta ubiJ$. Outre l'étape de formation du 4-HB, la voie de biosynthèse de l'UQ chez *X. campestris* se distingue de celle d'*E. coli* sur deux points principaux : l'hydroxylation en position C6 est catalysée par la monooxygénase à centre binucléaire à fer Coq7 (Zhou *et al.*, 2019). Cette dernière est donc l'homologue fonctionnel d'UbiF. La substitution d'UbiF par Coq7 dans la voie de biosynthèse n'est pas une situation isolée. Au contraire, elle est assez répandue chez les bactéries capables de synthétiser de l'UQ (Stenmark *et al.*, 2001; Behan and Lippard, 2010; Pelosi *et al.*, 2016). Le second point concerne l'étape de décarboxylation de l'OHB. En effet, les homologues des protéines UbiD et UbiX n'ont pas été identifiés chez *X. campestris*. Ce résultat suggère l'existence dans cette bactérie d'un système de décarboxylation de l'OHB alternatif à celui constitué par le système UbiD/UbiX. Enfin, une quatrième Ubi-FMO a été identifié chez *X. campestris*. Il s'agit d'UbiM (Pelosi *et al.*, 2016) dont la fonction dans la voie de biosynthèse de l'UQ n'est pas connue.

IV.1.2. Voie de biosynthèse de l'UQ chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une γ -protéobactérie gram négatif anaérobie facultative et un pathogène opportuniste chez l'Homme. En 2019, Jiang *et coll.* se sont intéressés à la voie de biosynthèse de l'UQ chez *P. aeruginosa*. Ils ont démontré que la forme majoritaire de l'UQ chez cette bactérie est l'UQ₉ (Jiang *et al.*, 2019; Vo *et al.*, 2020). La nonaprényl diphosphate synthase, l'homologue d'IspB d'*E. coli*, est essentielle pour la croissance de *P. aeruginosa* (Jiang *et al.*, 2019). Tout comme *X. campestris*, *P. aeruginosa* possède une protéine de type Coq7 qui est capable de rétablir la biosynthèse de l'UQ₈ dans une souche mutante d'*E. coli* $\Delta ubiF$ (Jiang *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Des homologues des protéines UbiA, UbiB, UbiC, UbiD, UbiE, UbiG, UbiH, UbiI, UbiJ, UbiK et UbiX d'*E. coli* sont identifiés chez *P. aeruginosa* (Jacewicz *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2019). La surexpression d'UbiJ_{Pa} complémente partiellement le défaut de synthèse en UQ₈ d'une souche mutante d'*E. coli* $\Delta ubiJ$ mais la souche mutante de

P. aeruginosa $\Delta ubiJ_{Pa}$ n'est pas complétée par l'UbiJ d'*E. coli*. Tout comme UbiJ_{Pa}, UbiB_{Pa} est essentielle pour la synthèse de l'UQ₉ chez *P. aeruginosa* (Jiang *et al.*, 2019) et des homologues des protéines UbiD et UbiX ont été identifiés chez cette bactérie. UbiX_{Pa} qui synthétise le cofacteur prFMN nécessaire à l'activité d'UbiD_{Pa} est essentielle à la croissance de *P. aeruginosa* (Payne *et al.*, 2015; White *et al.*, 2015). La structure cristallographique d'UbiX_{Pa} a été résolue. La protéine est organisée en dodécamères (Kopec, Schnell and Schneider, 2011).

Récemment, notre équipe a identifié chez *P. aeruginosa* les homologues des protéines UbiU, UbiV et UbiT d'*E. coli*. Les gènes codant pour ces trois protéines sont organisés en opéron (Vo *et al.*, 2020). UbiV_{Pa}, comme son homologue chez *E. coli*, contient un centre [4Fe-4S] chélaté par quatre cystéines conservées. Contrairement à UbiV_{Pa}, UbiU_{Pa} co-purifie avec l'UQ₉ et la DMQ₉ tandis qu'UbiT_{Pa} co-purifie seulement avec l'UQ₉. Il est intéressant de noter que ces trois protéines sont essentielles pour la croissance de cette bactérie en conditions de respiration anaérobie sur nitrate (appelée communément dénitrification) (Vo *et al.*, 2020). Il a également été montré que l'abondance de la protéine UbiT_{Pa} est augmentée dans le biofilm couvrant les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Groenewold *et al.*, 2018). Sachant d'une part que l'UQ₉ est la seule quinone isoprénoïde de *P. aeruginosa* et d'autre part que la dénitrification est un métabolisme clé dans la pathogénicité au long terme de cette bactérie, notre équipe a proposé que la voie de biosynthèse O₂-indépendante de l'UQ pourrait être utilisée comme une cible privilégiée pour développer de nouveaux antibiotiques contre ce pathogène (Vo *et al.*, 2020).

IV.1.3. Voie de biosynthèse de l'UQ chez *Salmonella enterica*

S. enterica est une γ -protéobactérie gram négatif anaérobie facultative et un pathogène qui peut infecter un large éventail d'animaux et l'Homme. Les voies de biosynthèse de l'UQ chez *S. enterica* et *E. coli* sont très similaires (L. Aussel *et al.*, 2014). L'étude des gènes *ubiE*, *ubiJ* et *ubiB* chez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* a montré que les protéines codées par ces trois gènes sont essentielles à la biosynthèse de l'UQ chez cet organisme (Aussel *et al.*, 2014). De plus, les trois souches mutantes $\Delta ubiE_{Se}$, $\Delta ubiJ_{Se}$ et $\Delta ubiB_{Se}$ sont altérées dans leur prolifération intracellulaire dans les macrophages (Aussel *et al.*, 2014). L'UQ pourrait donc contribuer à la virulence de ce pathogène.

IV.1.4. Etudes à grande échelle

Les génomes de 5750 bactéries et archées ont été analysés *in silico* par notre équipe lors d'une étude menée en 2019 (Pelosi *et al.*, 2019). Cette dernière a révélé que les protéines UbiT,

UbiU et UbiV sont retrouvées chez de nombreuses α -, β - et γ -protéobactéries susceptibles de synthétiser de l'UQ (Figure 25A), ce qui suggère que la voie de biosynthèse O₂-indépendante de l'UQ est largement répandue (Pelosi *et al.*, 2019).

Durant une autre étude menée en 2016, notre équipe s'est intéressée aux hydroxylases de la voie aérobie de biosynthèse de l'UQ de 67 espèces d' α -, β - et γ -protéobactéries. Une recherche par homologie de séquence utilisant les séquences d'UbiF, d'UbiH, et d'UbiI d'*E. coli* et de Coq7 de *P. aeruginosa* comme références a permis d'identifier les hydroxylases putatives de la voie UQ. 11 séquences de Coq6 (une monooxygénase à flavine catalysant l'hydroxylation en C5 chez les eucaryotes) ont été incluses pour construire un arbre phylogénétique qui a révélé l'existence de deux nouveaux clades (ou groupe monophylétique = des organismes ou des gènes issus d'un ancêtre commun) de Ubi-FMOs qui ont été nommés UbiL et UbiM (Figure 25B). L'analyse de la distribution des gènes a révélé que les gènes codant pour UbiL et UbiF se trouvent uniquement dans les génomes d' α - et de γ -protéobactéries, respectivement, les gènes codant UbiI et UbiH sont retrouvés chez les β - et γ -protéobactéries mais pas chez les α -; les gènes codant les protéines UbiM et Coq7 sont répartis dans des génomes d' α -, β - et γ -protéobactéries (Figure 25B et C) (Pelosi *et al.*, 2016). De façon surprenante, la branche des séquences de Coq6 des eucaryotes est retrouvée au sein des séquences de γ -protéobactéries (Pelosi *et al.*, 2016). Ce résultat est assez inattendu compte tenu de la théorie endosymbiotique selon laquelle les mitochondries auraient évoluées à partir d'une bactérie de la classe sœur des α -protéobactéries (Roger, Muñoz-Gómez and Kamikawa, 2017; Martijn *et al.*, 2018; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022). Pour rationaliser ce paradoxe, il a été proposé que les protéines Coq6 pourraient dériver d'un événement de transfert horizontal à partir des γ -protéobactéries, postérieurement à l'évènement endosymbiotique (Pelosi *et al.*, 2016).

Lors de cette étude, en plus de la combinaison des gènes *ubiI*, *ubiH* et *ubiF* qui est retrouvée chez *E. coli*, 18 autres combinaisons impliquant les cinq gènes *ubi*-FMOs et le gène *coq7* ont été identifiées dans les génomes des bactéries analysées (Figure 25C) (Pelosi *et al.*, 2016). Il a été observé que le nombre total d'hydroxylases de la voie UQ varie de 1 à 4 dans les génomes. De manière générale, les gènes *ubiI*, *ubiH*, *ubiF* et *coq7* se trouvent dans des génomes ayant trois hydroxylases, le gène *ubiL* dans les génomes contenant un nombre total de deux hydroxylases et enfin, le gène *ubiM* peut se trouver seul dans certains génomes ou en combinaison avec 1 à 3 autres gènes d'hydroxylases *ubi* dans d'autres génomes (Figure 25C). Ces résultats remettent en question le paradigme caractéristique de la voie de biosynthèse de l'UQ chez *E. coli*, à savoir que trois enzymes -UbiI, UbiH et UbiF- hydroxylent chacune une seule position. Dans les génomes qui présentent 2 voire 1 gène codant une hydroxylase Ubi, il

a été proposé que les enzymes présenteraient une régiosélectivité plus large en catalysant l'hydroxylation de deux voire même trois positions. Cette hypothèse a été validée biochimiquement via l'expression hétérologue d'UbiM de *N. meningitidis* et d'UbiL et de Coq7 de *R. rubrum* dans des souches mutantes d'*E. coli* inactivées pour une, deux ou trois *ubi*-FMOs. En effet, il a été prouvé UbiM_{Nm} hydroxyle les 3 positions, alors qu'UbiL_{Rr} hydroxylent les positions C1 et C5 et que Coq7_{Rr} hydroxyle C6 (Pelosi *et al.*, 2016). En résumé, cette étude a challengé le modèle de trois enzymes pour trois réactions d'hydroxylation connu comme un paradigme dans la biosynthèse de l'UQ et une question reste pour l'instant sans réponse. Quels sont les mécanismes permettant aux Ubi-FMOs d'être plus ou moins régiosélectives ? La position de l'atome de carbone du substrat qui est hydroxylé par une Ubi-FMOs donnée est imposée par l'orientation du substrat par rapport à la C4a-hydro-peroxyflavine dans le site actif de l'enzyme (composé IV, Figure 17C). En conséquence, il est probable que les intermédiaires de biosynthèse de l'UQ adoptent différentes orientations dans le site actif des Ubi-FMOs en fonction de la nature de la protéine et de la position qu'elle hydroxyle.

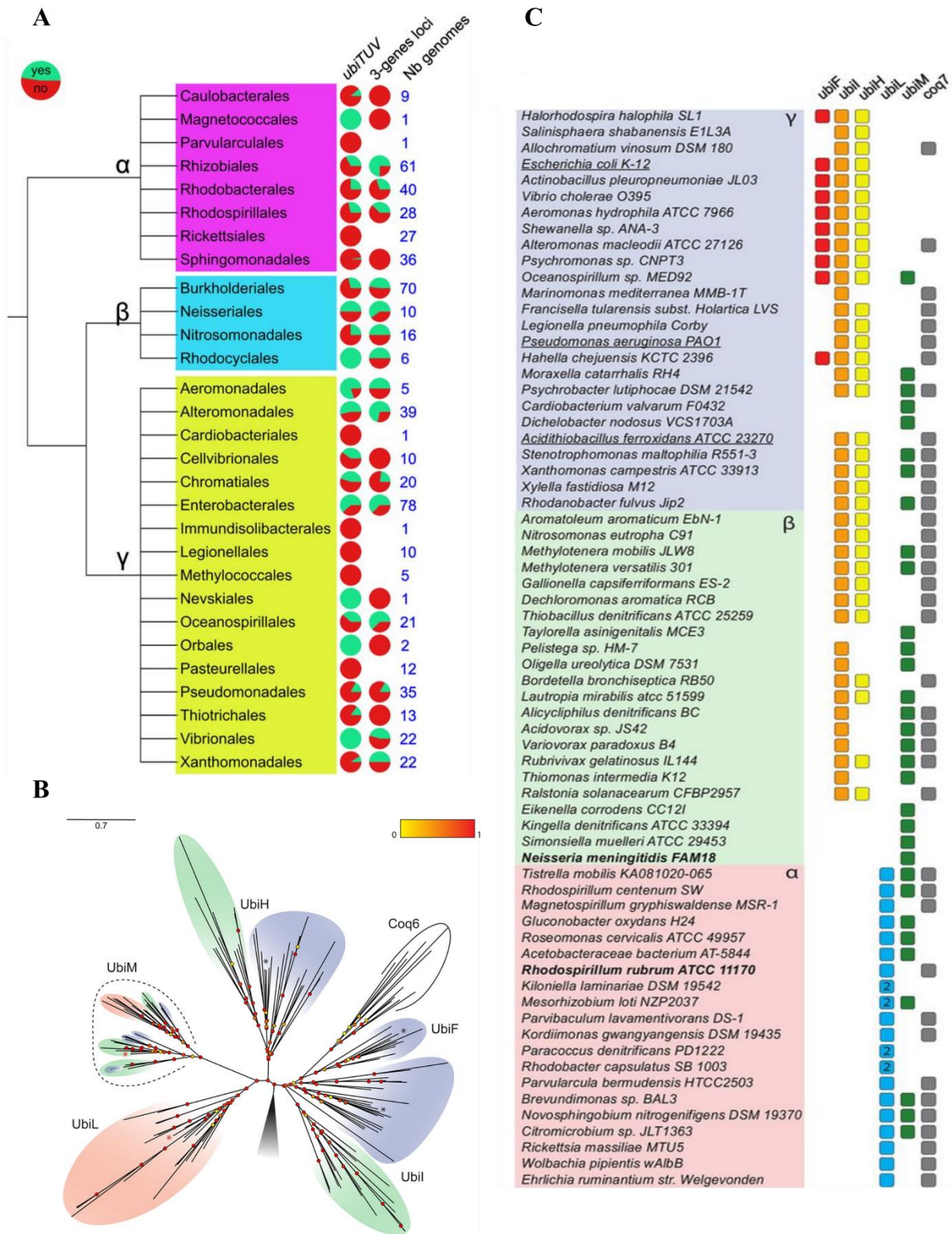


Figure 25. Analyse et distribution des gènes *ubiT*, *ubiU*, *ubiV* et des *ubi*-hydroxylases de la voie aérobie chez des protéobactéries. (A) Analyse de génomes complets de 29 ordres de protéobactéries qui révèle que 22 ordres possèdent jusqu'au 50% d'espèces contenant les trois gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV*. La proportion de génomes avec (vert) et sans (rouge) les trois gènes *ubiT*, *U* et *V* (colonne de gauche), est indiquée pour chaque ordre présumé de synthétiser l'UQ. La colonne du milieu (3-genes loci) indique la proportion de génomes avec les trois gènes soit sur un seul locus (vert) soit sur différents loci (rouge). Le nombre de génomes analysés pour chaque ordre est donné dans la colonne droite (Nb genomes). (B) Arbre phylogénétique des monooxygénases à flavines impliquées dans la biosynthèse de l'UQ (Ubi-FMOs). Dans cet arbre construit à partir de 67 génomes de protéobactéries (leurs

noms se trouvent dans la partie C de cette figure), les protéines présentes chez les α -, β - et γ -protéobactéries sont entourées respectivement en rose, vert et bleu. Le nom des différentes hydroxylases est indiqué à côté de chaque clade. (C) Distribution des gènes *ubiI*, *ubiH*, *ubiF*, *ubiL*, *ubiM* et *coq7*, codant pour les hydroxylases impliquées dans la biosynthèse de l'UQ chez des α -, β - et γ -protéobactéries (respectivement en rose, vert et bleu) indiquée par des carrés de couleur dans les colonnes correspondantes. Les colonnes sont laissées vides lorsque les gènes sont absents. La paralogie est désignée par le nombre de copies de gènes trouvées dans des génomes donnés. Les espèces dont les UQ-hydroxylases ont été caractérisées sont soit soulignées soit en gras. Les différents panneaux sont tirés des articles de Pelosi *et al.* (Pelosi *et al.*, 2016, 2019).

IV.2. Etude de la voie de biosynthèse de l'UQ chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, la voie de biosynthèse de l'UQ (encore appelé coenzyme Q) a été étudiée et caractérisée en utilisant principalement *S. cerevisiae* comme modèle (Figure 26) (Kawamukai, 2016). Dans la suite de cette partie, j'évoque brièvement la voie de biosynthèse de l'UQ de cette levure et les protéines homologues de la voie sont citées chez l'Homme.

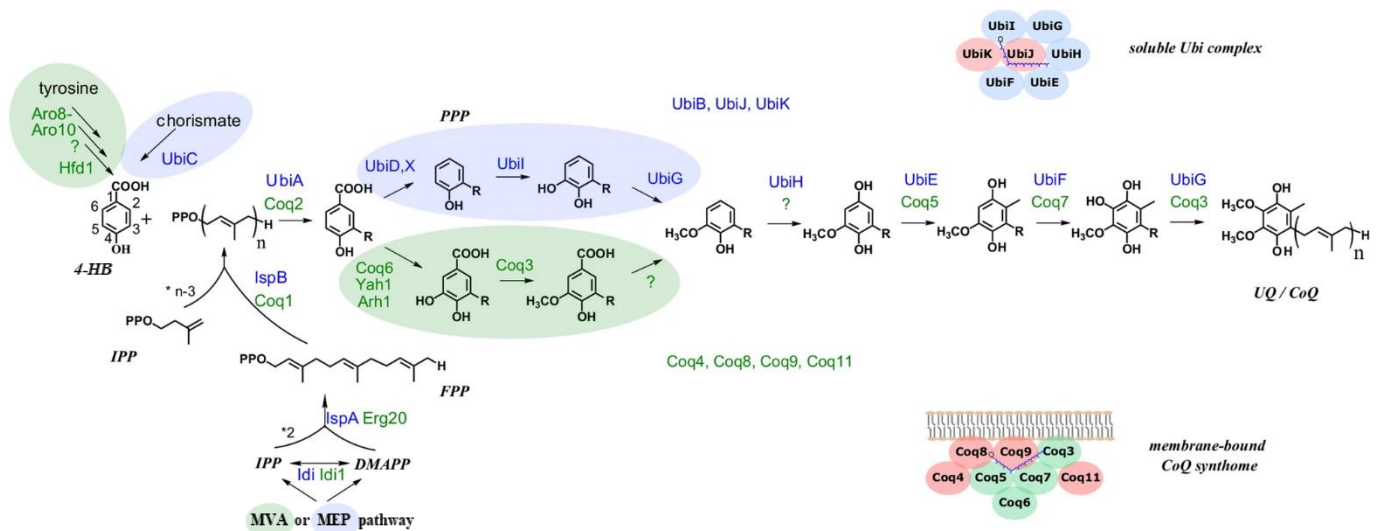


Figure 26. Schéma comparatif des voies de biosynthèse de l'UQ chez *E. coli* et *S. cerevisiae*. Les protéines des voies sont en bleu et en vert respectivement chez *E. coli* et *S. cerevisiae* et les étapes qui diffèrent entre les deux organismes sont surlignées de la couleur correspondante. Les enzymes sont affichées sur les flèches et les protéines accessoires ou les protéines de fonction inconnue sont présentées au-dessus et en-dessous des voies respectivement chez *E. coli* et chez *S. cerevisiae*. La numérotation des atomes de carbone appliqués à tous les intermédiaires est donnée pour l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB). « R » représentant la chaîne polyprényle ($n = 6$ pour *S. cerevisiae* et $n = 8$ pour *E. coli*) est issu des voies MEP et MVA (voir figure 12A). IPP, isopentényl diphosphate ; DMAPP, diméthylallyl diphosphate ; FPP, farnésyl diphosphate. Le complexe Ubi et le synthome-CoQ illustrent l'organisation supramoléculaire de certaines protéines des voies (enzymes en bleu/vert, protéines accessoires en rose). Cette figure est tirée de la revue de Pierrel *et al.* (Pierrel *et al.*, 2022).

IV.2.1. Etapes et protéines de la voie Coq

La biosynthèse de l'UQ s'effectue dans les mitochondries chez les eucaryotes et plus précisément au niveau de la membrane interne mitochondriale (Kawamukai, 2016). Les deux précurseurs IPP et DMAPP nécessaires à la formation de la chaîne polyprényle sont dérivés de la voie du mévalonate (MVA) (Figure 12A) qui est cytosolique. Toutes les protéines nécessaires

à la biosynthèse de l'UQ chez les eucaryotes sont codées par le génome nucléaire. Après leur import à l'intérieur des mitochondries, Coq1 (chez *S. cerevisiae*) et PDSS1/2 (chez l'Homme), deux prényltransférases associées à la membrane, catalysent la biosynthèse respectivement des chaînes hexaprénoïdes et decaprénoïdes (Gin and Clarke, 2005; Awad *et al.*, 2018). Le 4-HB est le précurseur du noyau aromatique, comme chez les bactéries. Il est généré dans le cytoplasme à partir de tyrosine ou également à partir de phénylalanine chez les végétaux (Xu *et al.*, 2022), puis importé dans les mitochondries. La production de 4-HB à partir de tyrosine se fait en plusieurs étapes nécessitent plusieurs protéines dont quatre sont connues à ce jour : Aro8, Aro9, Aro10 et HFD1 (Figure 26) (Payet *et al.*, 2016; Stefely and Pagliarini, 2017; Awad *et al.*, 2018; Kawamukai, 2018; Wang and Hekimi, 2019; Robinson *et al.*, 2021). Notons que *S. cerevisiae* est capable d'utiliser un autre précurseur aromatique, le para-aminobenzoate (pABA) qui est un analogue du 4-HB dans lequel le groupement hydroxyle en para est remplacé par un groupement amino. Le pABA est un précurseur du métabolisme des folates (vitamine B9) et, tout comme le 4-HB, il est synthétisé à partir du chorismate (Marbois *et al.*, 2010; Pierrel *et al.*, 2010; Payet *et al.*, 2016). Après la formation des deux précurseurs polyisoprénoïdes et aromatiques, la biosynthèse de l'UQ se déroule selon une voie globalement similaire à celle d'*E. coli* (Figure 26). Des homologues des protéines Ubi existent chez *S. cerevisiae* et chez l'Homme. Elles sont listées dans le tableau 3. Certaines des protéines Coq sont des enzymes (Coq2, Coq3, Coq5, Coq6 et Coq7) qui catalysent les différentes réactions de la voie, alors que d'autres sont des protéines accessoires : Coq8 qui est un homologue d'UbiB, Coq9, Coq10 et enfin Coq11 (Figure 26). La fonction de Coq4 n'est pas encore connue. En résumé, chez *S. cerevisiae*, la condensation de la chaîne isoprénoïde sur le noyau aromatique du 4-HB est réalisée par la protéine Coq2. Contrairement à la voie de biosynthèse décrite chez *E. coli*, le 4-hydroxybenzoate hexaprénylé est tout d'abord hydroxylé sur le carbone 5 par Coq6 et le groupe hydroxyle ajouté est ensuite méthylé par Coq3. L'intermédiaire ainsi formé est alors décarboxylé puis hydroxylé sur le carbone 1 par des protéines qui restent inconnues à ce jour. Il s'en suit une méthylation sur le carbone 2 catalysée par Coq5. Enfin, un groupement hydroxyle est ajouté sur le carbone 6 par Coq7. Ce dernier est ensuite méthylé par Coq3 (Figure 26) (Kawamukai, 2016; Pierrel *et al.*, 2022). Il est intéressant de noter que chez certains végétaux tel qu'*Arabidopsis thaliana*, la protéine Coq7 qui est une monooxygénase à centre binucléaire à fer est remplacée par la monooxygénase à flavine CoqF (Latimer *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021).

| Protéine chez <i>E. coli</i> | Fonction | Taille (kDa) | Homologue fonctionnel | |
|------------------------------|---|--------------|-----------------------|-------------------|
| | | | <i>S. cerevisiae</i> | Homme |
| IspA | Synthèse de géranyl et farnésyl diphosphate | 36 | Erg20 | FNTA |
| IspB | Synthèse de la chaîne octaprényle | 35.2 | Coq1 | PDSS1 et PDSS2 |
| UbiC | Conversion du chorismate en 4-HB | 19 | - | - |
| UbiA | Prénylation du cycle en position C3 | 32 | Coq2 | COQ2 |
| UbiD | Décarboxylation du cycle en position C1 | 55.6 | - | - |
| UbiX | Synthèse de FMN prénylé, cofacteur d'UbiD | 21 | - | - |
| UbiI | Hydroxylation du cycle en position C5 | 44.2 | Coq6 | COQ6 |
| UbiG | O-méthylation du cycle en position C5 et C6 | 26.6 | Coq3 | COQ3 |
| UbiH | Hydroxylation du cycle en position C1 | 42.3 | - | - |
| UbiE | C-méthylation du cycle en position C2 | 28.1 | Coq5 | COQ5 |
| UbiF | Hydroxylation du cycle en position C6 | 43 | Coq7 | COQ7 |
| UbiB | Inconnue | 63.2 | Coq8 | ADCK3 et ADCK4 |
| UbiJ | Stabilisation de complexe Ubi, fixation des intermédiaires de l'UQ ₈ | 22.2 | - | - |
| UbiK | Protéine accessoire formant un complexe avec UbiJ | 11.3 | - | - |
| UbiU | Inconnue | 37 | - | - |
| UbiV | Inconnue | 32.5 | - | - |
| UbiT | Inconnue | 19.7 | - | - |
| - | Inconnue | - | Coq4 | COQ4 |
| - | Formation et stabilisation de complexe CoQ-synthase | - | Coq9 | COQ9 |
| - | Inconnue | - | Coq10 | COQ10A et COQ10B |
| - | Inconnue | - | Coq11 | - |
| - | Conversion multi-étape de la tyrosine en 4-HB | - | Aro8, Aro9 et Hfd1 | PAH, TAT, ALDH3A1 |
| - | Ferrédoxine qui achemine les électrons du NAD(P)H au Coq6 | - | YAH1 | FDX1 et FDX2 ? |
| - | Réduction de ferrédoxine | - | ARH1 | FDXR ? |

Tableau 3 : Les protéines impliquées dans la biosynthèse de l'UQ chez *E. coli* et leurs homologues fonctionnels chez *S. cerevisiae* et l'Homme. Les points d'interrogations indiquent que les homologues des protéines Yah1 et Arh1 de *S. cerevisiae* chez l'Homme sont respectivement FDX1/2 et FDXR mais elles ne semblent pas impliquées dans la biosynthèse de l'UQ (Schulz *et al.*, 2023). L'absence d'homologue est indiquée avec un trait. Les fonctions surlignées en vert désignent celles des protéines Coq. Ce tableau est adapté de (Awad *et al.*, 2018; Pierrel *et al.*, 2022).

IV.2.2. Organisation supramoléculaire de la biosynthèse de l'UQ

La présence d'un complexe de biosynthèse de l'UQ a été proposé chez *S. cerevisiae* grâce aux travaux de l'équipe de Catherine Clarke (Marbois *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2007; Tran and Clarke, 2007; Allan *et al.*, 2015). Ce complexe appelé CoQ-synthase est composé des protéines Coq3, Coq4, Coq5, Coq6, Coq7, Coq8, Coq9 et Coq11 (Allan *et al.*, 2015; Awad

et al., 2018). Son modèle est illustré dans la figure 27, mais sa structure et la stœchiométrie des sous-unités sont inconnues. D'autres études supportent également l'existence d'un complexe de biosynthèse de l'UQ chez l'Homme et chez des modèles mammifères tels que la souris (Lohman *et al.*, 2014; Stefely *et al.*, 2016; Yen *et al.*, 2016; Stefely and Pagliarini, 2017). Subramanian *et coll.* ont montré que les protéines humaines impliquées dans la biosynthèse de l'UQ s'assemblent dans des domaines adjacents aux points de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique et les intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'UQ sont nécessaires pour la formation de ces domaines (Subramanian *et al.*, 2019).

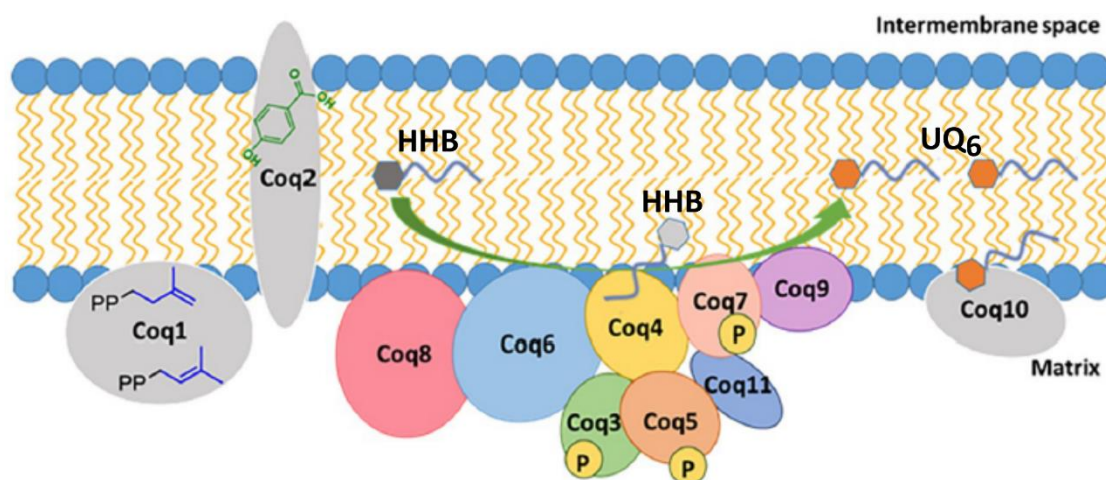


Figure 27. Modèle du complexe de biosynthèse de l'UQ (CoQ-synthome) chez *S. cerevisiae*. A l'exception des trois protéines Coq1, Coq2 et Coq10, toutes les autres protéines Coq font partie du CoQ-synthome. Après la synthèse de la chaîne hexaprényle par Coq1, Coq2 ajoute cette chaîne sur le précurseur aromatique (4-HB en vert dans la protéine Coq2) pour produire du 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoate (HHB). Ce premier intermédiaire est ensuite localisé dans le complexe en association avec Coq4 et différentes réactions enzymatiques permettent sa conversion en UQ₆. Dans ce complexe, Coq8 est une kinase atypique supposée être responsable de la phosphorylation de Coq3, Coq5 et Coq7. Cette figure est tirée de l'article de Awad *et al.* (Awad *et al.*, 2020).

IV.2.3. Carence en UQ₁₀ chez l'Homme

Les déficiences en UQ₁₀ sont classées en deux grandes catégories : les déficiences primaires et celles secondaires (Stefely and Pagliarini, 2017; Wang and Hekimi, 2019; Hargreaves, Heaton and Mantle, 2020). Notons que les patients présentent toujours une quantité détectable d'UQ₁₀, car une déficience totale en UQ₁₀ est incompatible avec le développement embryonnaire comme l'ont montré des expériences avec des souris transgéniques (Laredj, Licitra and Puccio, 2014).

Les déficiences primaires résultent de mutations dans les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'UQ₁₀. Chez l'Homme, ces mutations touchent les gènes *PDSS1/2*, *coq2*, *coq4*, *coq6*, *coq7*, *ADCK3/4*, *coq9* et se manifestent par des dysfonctionnements de divers organes. Les tissus cérébraux, musculaires, rénaux et le cœur sont particulièrement affectés en

raison de leurs besoins énergétiques élevés. L'encéphalopathie, l'ataxie cérébelleuse, la cardiomyopathie hypertrophique, le syndrome néphrotique et la myopathie sont diverses maladies causées par la déficience primaire de l'UQ₁₀ (Kawamukai, 2016; Stefely and Pagliarini, 2017; Hargreaves, Heaton and Mantle, 2020).

Les déficiences secondaires de l'UQ₁₀ résultent de mutations dans les gènes n'étant pas directement impliqués dans la biosynthèse de l'UQ₁₀. De manière général, les désordres mitochondriaux sont associés à un déficit en UQ₁₀ et la déficience secondaire en UQ₁₀ a été décrite chez des patients avec des défauts divers de la chaîne respiratoire mitochondriale (Wang and Hekimi, 2019; Hargreaves, Heaton and Mantle, 2020). Ces désordres pourraient modifier les membranes internes et externes mitochondriales qui pourraient impacter la stabilisation du CoQ-synthome et par conséquent causer un défaut dans la biosynthèse de l'UQ₁₀ (Stefely and Pagliarini, 2017; Wang and Hekimi, 2019). La déficience secondaire est également causée par certains médicaments tels que les statines qui inhibent l'HMG CoA réductase, une enzyme de la voie MVA (Figure 12A) ou l'amitriptyline (un antidépresseur) (Hargreaves, Heaton and Mantle, 2020). Un certain nombre de troubles associés à une déficience primaire ou secondaire en l'UQ₁₀ peuvent être traités avec succès par une supplémentation en UQ₁₀ (Hargreaves, Heaton and Mantle, 2020).

Objectifs de la thèse

Mes projets de thèse ont porté sur les deux axes principaux suivants :

I. Voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ

Cette partie du projet m'a amené à adopter deux angles d'approche décrits ci-après.

I.1. Une approche globale qui concerne l'étude des hydroxylases de la voie aérobie de biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries. Comme évoqué précédemment, chez *E. coli*, trois Ubi-FMOs -UbiI, UbiH et UbiF- assurent les trois réactions d'hydroxylation de la voie. Cependant, chez d'autres bactéries telles que *R. rubrum* et *N. meningitidis*, respectivement deux (UbiL et Coq7) et une (UbiM) hydroxylases catalysent ces trois réactions. Ces données suggèrent une régiosélectivité variable pour les hydroxylases impliquées dans la voie de biosynthèse de l'UQ (Ubi-hydroxylases). Par conséquent, en utilisant des approches phylogénétiques et biochimiques, nous avons étudié l'évolution des Ubi-hydroxylases chez les protéobactéries, en liant notamment avec la régiosélectivité. Ce travail a été financé par l'ANR et les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit soumis à *Molecular Biology and Evolution* (voir chapitre résultats I.1.).

I.2. Dans une seconde approche plus ciblée, nous avons étudié la voie de biosynthèse de l'UQ chez un pathogène aérobie strict, *Francisella novicida*. Lors de ce travail, nous avons caractérisé la voie de biosynthèse de l'UQ chez cette bactérie et nous avons exploré son rôle dans la pathogénicité en utilisant le modèle animal *Galleria mellonella*. Les résultats de ce travail ont été publiés dans *Journal of Bacteriology* à la fin de ma première année de thèse (voir le chapitre résultats I.2.).

II. Voie O₂-indépendant de biosynthèse de l'UQ

Cette partie des travaux de ma thèse est dans la continuité de ceux publiés en 2019. Ils ont été financés par l'ANR et mes résultats reposent sur un travail collaboratif avec l'équipe de Pr. Frédéric Barras à l'institut Pasteur à Paris et celle de Pr. Marc Fontecave au Collège de France à Paris Les objectifs de cette partie de mon projet de thèse ont été les suivants :

II.1. Etudier les hydroxylases de la voie anaérobie de biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries. Comme mentionné auparavant, les deux protéines UbiU et UbiV appartenant à la famille des peptidases U32 et formant un hétérodimère sont des candidats de choix pour catalyser ces réactions en absence de dioxygène. Nous nous sommes également intéressés à la

fonction de la protéine UbiT et à la régulation des gènes *ubiU*, *ubiV* et *ubiT*. De plus, sachant qu'en anaérobiose, la MK et la DMK sont des transporteurs d'électron privilégiés dans la chaîne respiratoire chez *E. coli*, nous nous sommes également intéressés au rôle physiologique de l'UQ synthétisée dans ces conditions dans l'intestin en utilisant la souris comme modèle. L'ensemble des résultats obtenus a été publié en juin 2023 dans mBio (voir le chapitre résultats II.1).

II.2. La dernière partie de mon projet s'est intéressée à l'identification du donneur d'atomes d'oxygène pour les réactions d'hydroxylation en anaérobiose. La littérature récente sur le sujet suggère qu'un métabolite de la voie du shikimate pourrait être impliqué. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons combiné des approches génétiques et biochimiques. Les résultats de cette partie seront publiés prochainement (voir le chapitre résultats II.2.).

Résultats

I. Voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ

I.1. Diversification de la biosynthèse de l'ubiquinone par duplications, transferts, pertes et évolution parallèle de gènes

La voie de biosynthèse de l'UQ comporte trois réactions d'hydroxylation sur des atomes de carbone contiguës du cycle aromatique des intermédiaires de l'UQ. Chez *Escherichia coli*, ces trois réactions sont catalysées par trois hydroxylases qui sont des monooxygénases à flavine (FMOs), UbiI, UbiH et UbiF (L. Aussel *et al.*, 2014). Chez certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, UbiF est remplacée par une monooxygénase à fer (Coq7) (Stenmark *et al.*, 2001). Chacune de ces enzymes est capable d'hydroxyler un atome de carbone spécifique du noyau aromatique, elles sont donc régiosélectives. Ce modèle de trois enzymes catalysant les trois réactions d'hydroxylation a été accepté comme un paradigme dans la biologie de l'UQ jusqu'à la publication d'une étude menée par notre équipe en 2016. En effet, pendant ces travaux, l'analyse de 67 génomes d' α -, β - et γ -protéobactéries a permis l'identification de deux nouveaux clades de FMO, UbiL et UbiM, impliquées dans la biosynthèse de l'UQ (Ubi-FMOs) et a révélé que le nombre total d'hydroxylases de la voie de l'UQ (Ubi-hydroxylases) variait de 1 à 4 dans les génomes étudiés (Pelosi *et al.*, 2016). Ces résultats *in silico* suggéraient que dans les génomes contenant moins de trois Ubi-hydroxylases, ces enzymes pourraient hydroxyler plus d'une position du cycle aromatique et posséder une régiosélectivité plus vaste que celle des Ubi-FMOs d'*E. coli*. En accord avec cette proposition, l'équipe a montré qu'UbiL de *Rhodospirillum rubrum* et UbiM de *Neisseria meningitidis* hydroxylerent respectivement deux et trois atomes de carbones du cycle aromatique des intermédiaires de l'UQ (Pelosi *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats montraient que les protéobactéries ont développé un vaste répertoire de combinaisons d'hydroxylases pour synthétiser l'UQ.




Dans l'étude présentée ci-après, nous avons souhaité comprendre l'évolution des Ubi-hydroxylases et de leur régiosélectivité. Pour cela l'analyse bio-informatique a été étendue à 2352 génomes d' α -, β - et γ -protéobactéries. Nos analyses phylogénétiques ont mise en évidence l'existence d'une nouvelle Ubi-FMO (UbiN) et ont permis de prédire la régiosélectivité des Ubi-hydroxylases dans les génomes analysés. Ces prédictions ont été ensuite vérifiées biochimiquement en testant la complémentation d'une centaine d'Ubi-hydroxylases dans des mutants d'*E. coli* inactivés pour un, deux ou trois Ubi-FMOs. Dans l'ensemble, nos analyses phylogénétiques et biochimiques sont cohérentes avec un scénario évolutif dans lequel les Ubi-FMOs se sont diversifiées via trois événements de duplication associés à deux cas de néofonctionnalisation et un cas de sous-fonctionnalisation. Ceci a conduit à cinq sous-familles

d'Ubi-FMOs (UbiI, ubiH, UbiF, UbiL et UbiN) avec des régiosélectivités distinctes et a abouti à deux pertes indépendantes de l'enzyme ancestrale Coq7.

Mes contributions

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une ANR collaborative « dEEPEN » avec l'équipe de Dr. Isabelle André à Toulouse Biotechnology Institute. Toutes les analyses phylogénétiques de cet article ont été réalisées dans notre laboratoire à Grenoble par nos collègues bio-informaticiens, principalement Dr. Sophie Abby. J'ai réalisé une grande partie des analyses biochimiques avec l'aide de mon directeur de thèse, Pr. Ludovic Pelosi durant mon stage de master 2. Pendant ma thèse, j'ai poursuivi moi-même certaines expériences et j'ai également supervisé, en lien avec mes deux directeurs de thèse, des stagiaires et un collègue biochimiste (Dr. Mahmoud Hajj Chehade) qui ont participé au projet.

Diversification of Ubiquinone Biosynthesis via Gene Duplications, Transfers, Losses, and Parallel Evolution

Katayoun Kazemzadeh, Ludovic Pelosi, Clothilde Chenal, Sophie-Carole Chobert, Mahmoud Hajj Chehade, Margaux Jullien, Laura Flandrin, William Schmitt, Qiqi He, Emma Bouvet, Manon Jarzynka, Nelle Varoquaux , Ivan Junier, Fabien Pierrel ,* and Sophie S. Abby 

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France

*Corresponding authors: E-mails: fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr; sophie.abby@univ-grenoble-alpes.fr.

Associate editor: Fabia Ursula Battistuzzi

Abstract

The availability of an ever-increasing diversity of prokaryotic genomes and metagenomes represents a major opportunity to understand and decipher the mechanisms behind the functional diversification of microbial biosynthetic pathways. However, it remains unclear to what extent a pathway producing a specific molecule from a specific precursor can diversify. In this study, we focus on the biosynthesis of ubiquinone (UQ), a crucial coenzyme that is central to the bioenergetics and to the functioning of a wide variety of enzymes in Eukarya and Pseudomonadota (a subgroup of the formerly named Proteobacteria). UQ biosynthesis involves three hydroxylation reactions on contiguous carbon atoms. We and others have previously shown that these reactions are catalyzed by different sets of UQ-hydroxylases that belong either to the iron-dependent Coq7 family or to the more widespread flavin monooxygenase (FMO) family. Here, we combine an experimental approach with comparative genomics and phylogenetics to reveal how UQ-hydroxylases evolved different selectivities within the constrained framework of the UQ pathway. It is shown that the UQ-FMOs diversified via at least three duplication events associated with two cases of neofunctionalization and one case of subfunctionalization, leading to six subfamilies with distinct hydroxylation selectivity. We also demonstrate multiple transfers of the UbiM enzyme and the convergent evolution of UQ-FMOs toward the same function, which resulted in two independent losses of the Coq7 ancestral enzyme. Diversification of this crucial biosynthetic pathway has therefore occurred via a combination of parallel evolution, gene duplications, transfers, and losses.

Key words: biosynthetic pathway, enzyme diversification, neofunctionalization, subfunctionalization, flavin monooxygenase.

Introduction

Over billions of years, bacteria have evolved a tremendous diversity in their metabolic capacities. The enormous diversity of the natural products they synthesize is the result of a multitude of enzymes which have diversified over time (Crits-Christoph et al. 2018; Paoli et al. 2022). The evolution of individual enzymes and functional innovation among homologous protein families have been extensively studied, sometimes providing an atomic level of details of a family functional diversification, along with the documentation of the evolutionary events leading to such diversification (Zou et al. 2015; Kalluraya et al. 2023). The role of several phenomena, including enzymatic promiscuity, gene transfers, and gene duplications, has been extensively discussed and reviewed (Baier et al. 2016; Glasner et al. 2020; Jayaraman et al. 2022).

Deciphering the evolution of individual biochemical pathways is of high interest for evolutionary biology and for understanding the rules that might enable their

efficient engineering (Raman et al. 2014; Bachmann 2016). Of particular interest are the biosynthetic pathways of coenzymes, which produce small organic molecules that are essential to the function of a wide variety of enzymes (Kirschning 2022). The ever-increasing availability of genomic sequences provides valuable material for in-depth investigations into the origins and evolution of these biosynthetic pathways. However, such studies are often complicated by the fact that the pathways have only been characterized experimentally in a few model organisms and that homologs with distinct functions can be difficult to disambiguate (Zallot et al. 2016). Moreover, despite significant progress, the accuracy of automated annotation pipelines is still limited (Zallot et al. 2016; Salzberg 2019). Therefore, studying the evolution of biosynthetic pathways requires combining expert biochemical knowledge, detailed genomic and phylogenetic analyses, and experimental validation. For instance, biosynthetic pathways of coenzymes like cobalamins, tetrahydrofolate, or pyridoxal 5'-phosphate were shown to be diverse, with

Received: May 26, 2023. Revised: September 11, 2023. Accepted: September 26, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Society for Molecular Biology and Evolution.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Open Access

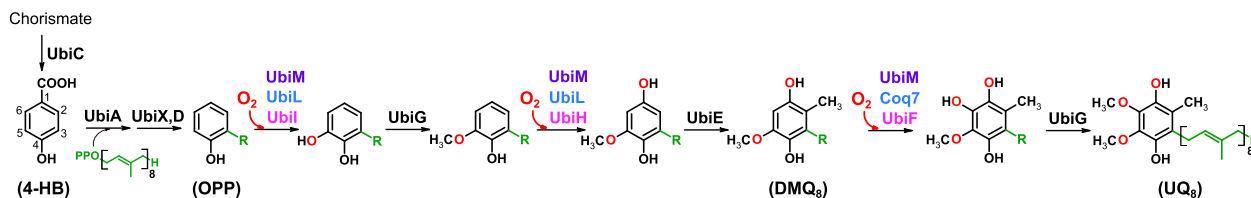


Fig. 1. Variety of O₂-dependent hydroxylases mapped on the UQ biosynthetic pathway of *E. coli*. The three O₂-dependent hydroxylation reactions of the UQ biosynthetic pathway employ different combinations of hydroxylases in *E. coli* (UbiI, UbiH, and UbiF, in pink), *N. meningitidis* (UbiM, in violet), or *R. rubrum* (UbiL and Coq7, in blue). The oxygen atoms added by the hydroxylation steps originate from dioxygen and are shown in red. The numbering of the carbon atoms of the phenyl ring used throughout this study is shown for the precursor 4-HB. The octaprenyl tail of UQ (in green) is represented by R on carbon 3 of the different biosynthetic intermediates. OPP, 3-octaprenylphenol; DMQ₈, C6-demethoxyubiquinone.

nonhomologous iso-functional enzymes acting at several steps and with the presence of alternate branches in specific clades (de Crécy-Lagard 2014; Balabanova et al. 2021; Denise et al. 2023). Overall, the contribution of nonorthologous displacements and convergent evolution to shaping extant biochemical pathways is well appreciated (Michael 2017). The role of the diversification of homologous protein families is also well recognized, notably to increase the diversity of biochemical pathways allowing to expand inputs (substrates) and outputs (products) (Forsberg et al. 2018; Vu et al. 2019; Hansen et al. 2021). However, to what extent a protein family can diversify within the frame of an evolutionary constrained biosynthetic pathway (i.e. a pathway that does not change its input and output) is currently an open question. A few pathways could serve as case studies, as they involve enzymes from the same family modifying various positions of a molecule in a sequential manner. For example, three O-methyltransferases sequentially add methyl groups on contiguous oxygen atoms on sugar moieties leading to the synthesis of specialized metabolites (Patallo et al. 2001; Kim et al. 2010; Simeone et al. 2013). However, the evolution of these enzymes could not be studied, owing to the narrow phylogenetic distribution of the pathways. Here, we show that the biosynthetic pathway of ubiquinone (UQ) represents an ideal case to address this question of the diversification of a protein family in the framework of an evolutionary constrained pathway.

UQ is a central component of bioenergetic electron transfer chains that sustains ATP production in the eukaryotic mitochondria and in the large bacterial group of Pseudomonadota (a portion of the formerly named Proteobacteria) (Nowicka and Kruk 2010; Pelosi et al. 2019). UQ also acts as a coenzyme (coenzyme Q) for several biological processes (Aussel et al. 2014; Franza and Gaudu 2022). The pathway to produce UQ in bacteria is ancient as UQ innovation is thought to have coincided with the Great Oxidation Event that irreversibly changed Earth's atmosphere 2.4 billion years ago (Schoepp-Cothenet et al. 2009). Moreover, it has evolutionary ties with the plastoquinone pathway found in Cyanobacteria and is very likely to have given rise to the UQ pathway in eukaryotes that slightly differs from its bacterial counterpart (Degli Esposti 2017; Kawamukai 2018; Abby et al. 2020).

The main pathway to produce UQ is O₂-dependent and involves, among other reactions, three hydroxylation steps on carbon atoms 5 (C5), 1 (C1), and 6 (C6) (Fig. 1). This pathway has been extensively studied in *Escherichia coli*, a gammaproteobacterium that employs three flavin-dependent monooxygenases (FMOs), UbiI, UbiH, and UbiF, to catalyze hydroxylation on C5, C1, and C6, respectively (Hajj Chehade et al. 2013) (Fig. 1). In a previous bioinformatic investigation of 67 Pseudomonadota genomes, we discovered UbiL and UbiM, 2 new UQ-FMOs related to UbiI, UbiH, and UbiF (Pelosi et al. 2016). In addition, an unrelated iron-dependent hydroxylase called Coq7 is known to hydroxylate C6 instead of UbiF in some bacterial species and in eukaryotes (Stenmark et al. 2001). Thus, in total, six enzymes—hereafter referred to as UQ-hydroxylases—are involved in the three hydroxylation steps of the O₂-dependent UQ biosynthetic pathway. Various combinations of these enzymes were observed in different species of Pseudomonadota, but very few have been experimentally confirmed to date (Fig. 1). We previously showed that the *Rhodospirillum rubrum* genome encodes a UbiL enzyme that modifies C1 and C5 and a Coq7 enzyme that hydroxylates C6 (Pelosi et al. 2016). We also found that UbiM, the only UQ-hydroxylase encoded in the genome of *Neisseria meningitidis*, was able to hydroxylate all three positions C1, C5, and C6 (Fig. 1) (Pelosi et al. 2016). Taken together, these data raise interesting evolutionary questions as they suggest that the related UQ-FMOs (UbiI, UbiH, UbiF, UbiL, and UbiM) have different capacities to modify a particular position on a same molecule, i.e. different regioselectivities. However, due to a lack of experimental data, it is currently unclear whether Coq7 and each of the five UQ-FMOs have a conserved regioselectivity. Moreover, it is not known how and why Pseudomonadota evolved such a large repertoire of UQ-hydroxylases. Thus, UQ-FMOs represent a case of pathway diversification within a constrained framework, i.e. with the imperative to keep UQ as the pathway's end product and 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) as the pathway's precursor. In the present study, we have examined the evolutionary history of the hydroxylases of the UQ biosynthetic pathway across the diversity of Pseudomonadota by combining phylogenetic and large-scale biochemical analyses. We propose a scenario for the diversification of the UQ-FMO protein family, which involves several gene

duplications followed by neo- and subfunctionalizations, two parallel losses of the unrelated Coq7 enzyme, and the horizontal transfer of the generalist enzyme UbiM. We also propose the existence of UbiN, a new member of the UQ-FMO protein family with a specific hydroxylation selectivity.

Results

Overall Distribution of UQ-Hydroxylases in Pseudomonadota

All complete genomes of Pseudomonadota were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and one genome per species was selected. In total, 2,373 genomes were selected, in which the genes coding for UQ-hydroxylases were annotated using previously designed hidden Markov model (HMM) protein profiles (Pelosi et al. 2019), except for that of Coq7, which was refined for the needs of this study (Table S1; Materials and Methods). The presence of the *ubiA*, *ubiE*, and *ubiG* genes was used as a proxy for the presence of the UQ biosynthetic pathway (Pelosi et al. 2019). From the 2,351 genomes harboring the three genes and thus considered as UQ-producers (99% of the data set), we extracted the sequences of the UQ-hydroxylases: the five UQ-FMOs UbiF, UbiH, UbiL, UbiM and the iron-dependent hydroxylase Coq7, a member of the ferritin-like superfamily. The relevance of these annotations was confirmed by phylogenetic analyses, from which we could observe that the enzymes were gathered in well-supported monophyletic groups and regrouped sequences from consistent taxonomic clades, except for UbiM (Fig. 2). These results are also in agreement with our previous analysis based on a smaller data set of 67 Pseudomonadota genomes (Pelosi et al. 2016). Overall, we could annotate 1,153 Coq7, 638 UbiF, 1,470 UbiH, 1,590 UbiL, 1,103 UbiM, and 243 UbiM sequences, amounting to a total of 5,044 UQ-FMOs.

We then analyzed the distribution of the UQ-hydroxylases across Pseudomonadota. Among the taxonomic orders presumably containing a complete UQ biosynthetic pathway, only one did not harbor any of the UQ-hydroxylases: the Magnetococcales. This was consistent with previous results, as we showed that the only complete genome available for the order, *Magnetococcus marinus* MC-1, had instead the proteins of the O₂-independent pathway: UbiT, UbiU, and UbiV (Pelosi et al. 2019). The possible combinations of UQ-hydroxylases found in genomes at the “order” taxonomic level were extracted, and their respective occurrences were calculated (Table S2). We mapped the fraction of the majority combinations of UQ-hydroxylases in each order, provided that the combination was found in more than five genomes (Fig. 3). To this end, a simplified representation of the species tree based on a survey of the literature was used, as reconstructing a species tree for Pseudomonadota is notoriously challenging (see Discussion). It was observed that the distribution of UQ-hydroxylases followed the species tree. In

particular, the enzymes UbiL and UbiF are restricted to Alphaproteobacteria and a subset of monophyletic Gammaproteobacteria orders, respectively. The enzymes UbiH and UbiL are found exclusively outside of the Alphaproteobacteria, across the monophyletic group formed by the Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria. Coq7 is more widespread, with occurrences found across Acidithiobacillia and Alpha-, Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria. The UbiM enzyme, which was proposed to have endured lateral gene transfer (LGT) (Pelosi et al. 2016), is restricted to a few scattered lineages from Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria (mostly Rhodospirillales, Neisseriales, and Xanthomonadales) and was found in only 240 out of 2,373 genomes.

Besides individual enzyme distribution, we observed that the repertoire of UQ-hydroxylases combinations is itself taxonomically well-conserved. Alphaproteobacteria harbor two main UQ-hydroxylase combinations: the UbiL/Coq7 pair for most orders or UbiL in two copies for the Hyphomicrobiales and the Rhodobacterales (Fig. 3). The Betaproteobacteria mainly display three hydroxylases: UbiH, UbiL, and Coq7. Several lineages of Gammaproteobacteria also harbor the UbiH, UbiL, and Coq7 combination, while others possess the UbiH, UbiL, and UbiF combination.

Based on the few previously reported activities (Table S3), these majority sets of UQ-hydroxylases seemed to correspond to combinations of enzymes with complementary hydroxylation activities on C1, C5, and C6 (Fig. 1). One exception was the combinations involving UbiM, which were neither consistent nor conserved across Pseudomonadota (Fig. S2). Indeed, UbiM was found as the only UQ-hydroxylase in some genomes but coexisted with diverse sets of UQ-hydroxylases in other genomes (Fig. 3, Fig. S2, Table S1). These elements could not provide a clear indication of a conserved hydroxylation activity for UbiM.

Despite indications for complementary hydroxylation activities within the major UQ-hydroxylase combinations, the scarcity of experimental data prevents any conclusion regarding the possible conservation of specific activities in the various UQ-hydroxylases. Moreover, the combination with two UbiL proteins, exclusively found in Rhodobacterales and Hyphomicrobiales (Alphaproteobacteria), has never been tested before. Thus, we decided to jointly explore the evolutionary events leading to the diversification of the UQ-hydroxylase repertoire and the functional diversification of the UQ-FMO family in terms of hydroxylation activities.

The Iron-Dependent Hydroxylase Coq7 Shows Conserved C6-Hydroxylation Activity and Endured Repeated Losses across Pseudomonadota

We first investigated the evolution of the Coq7 family. Coq7 is the only UQ-hydroxylase which spreads across Pseudomonadota. Moreover, when present in genomes, it is found in a single copy (Fig. 3, Text S2, Fig. S3A). Such a distribution could be the result of different events, including vertical gene transmission, but also LGTs and/or

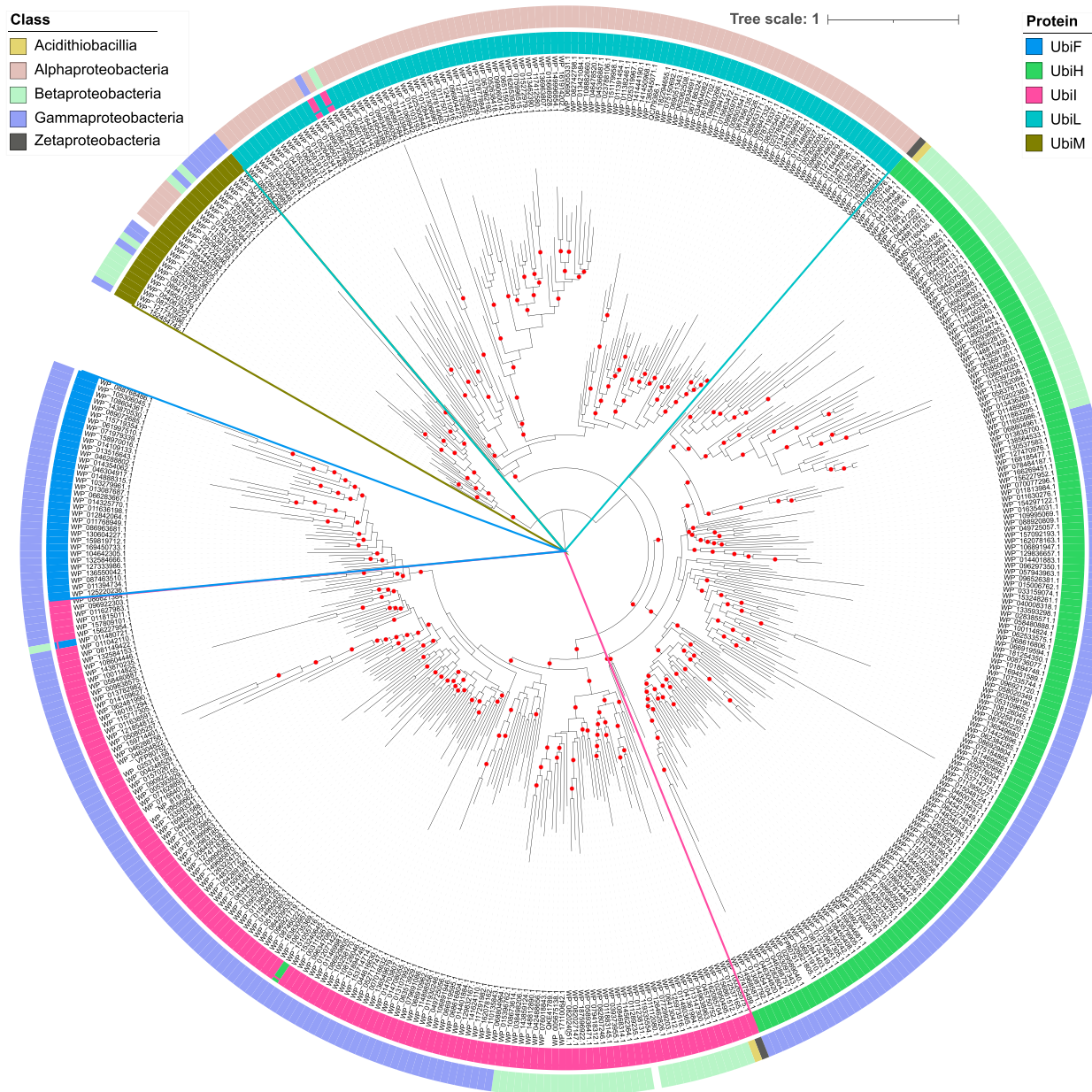


Fig. 2. Global UQ-FMO phylogeny based on a data set of representative sequences (CD-Hit, 50% sequence identity clustering). This maximum likelihood phylogenetic tree shows that the annotated sequences gather by protein families (inner colored ring) in well-supported groups. These families are, at the exception of UbiM, taxonomically consistent at the class level (outer colored ring). Red dots represent branches that harbor a high support (UFBoot \geq 95%). The tree was rooted between UbiM and other UQ-FMO according to UbiM deep position in phylogenies rooted with members of the FMO superfamily (Text S1, Fig. S1). IQ-Tree v2.2 tree with LG + F + R9 selected as best model of protein sequence evolution. Tree scale is expressed in substitutions per site.

duplications mixed with losses. We built a phylogenetic tree of Coq7 sequences (Fig. S3B). Even though not well-supported (see Text S2), the tree showed consistent grouping of sequences by taxa at several taxonomic levels: classes, orders, and families. The overall tree topology is in agreement with the species tree of Pseudomonadota; we thus advocate for a vertical transmission of the corresponding gene. Yet, Coq7 is absent from several lineages: the Rhodobacterales and Hyphomicrobiales within Alphaproteobacteria, and the Aeromonadales, Alteromonadales, Enterobacterales, Methylococcales, Pasteurellales, and Vibrionales within

Gammaproteobacteria (Fig. 3). Interestingly, it was previously proposed that five of these six lineages of Gammaproteobacteria could be monophyletic, Methylococcales excluded (Williams et al. 2010). Thus one loss event might explain Coq7 missing from these five lineages of Gammaproteobacteria. Similarly, a single loss of Coq7 in Alphaproteobacteria might suffice to explain its absence from Rhodobacterales and Hyphomicrobiales, which are closely related lineages (see also Discussion).

Given its broad conservation across Pseudomonadota and its likely vertical transmission, we hypothesized that

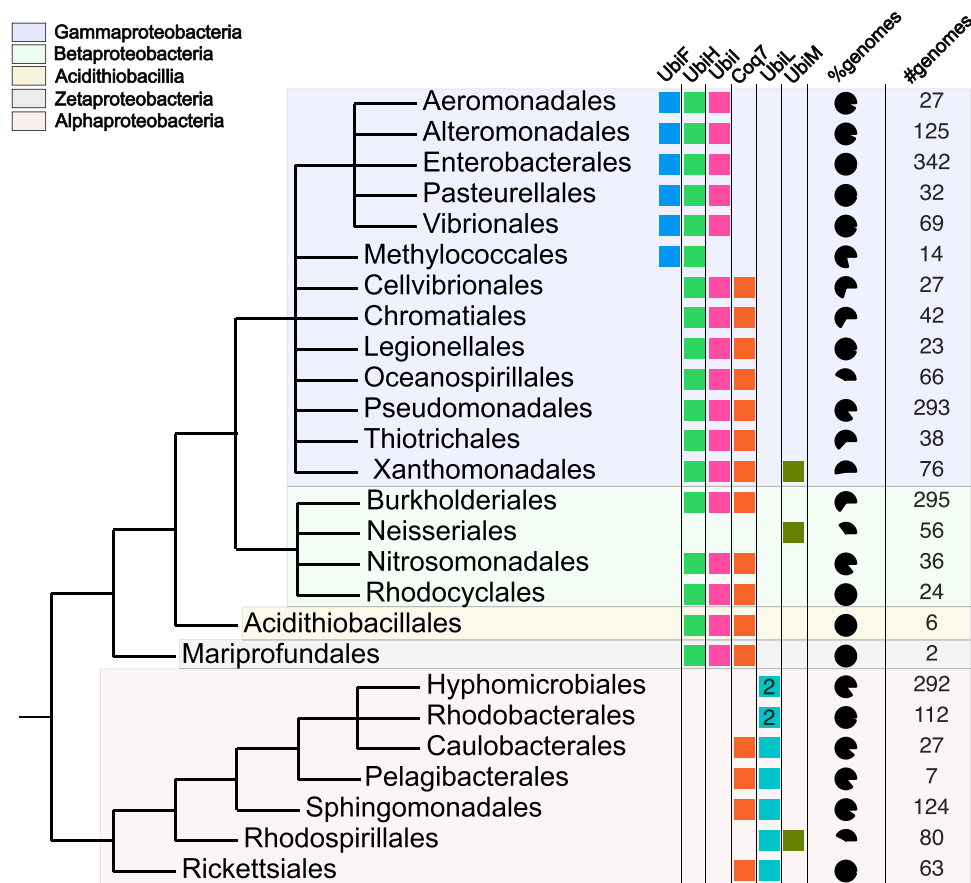


Fig. 3. The majority repertoire of UQ-hydroxylases along a tentative species tree of Pseudomonadota. The most represented combinations of UQ-hydroxylases are displayed for all the orders represented by more than five genomes, except for the only order of Zetaproteobacteria (Mariprofundales, only two genomes). Pie charts indicate the proportion of the genomes within the order displaying the majority combination, and the total number of genomes analyzed for each order is indicated in the last column “#genomes”. The species tree is drawn as a consensus from previous studies (Williams et al. 2010; Williams and Kelly 2013; Roger et al. 2017; Munoz-Gomez et al. 2019). See Discussion for more details and Fig. S2 for a representation including minor combinations of UQ-hydroxylases.

Coq7 might harbor a conserved C6-hydroxylation activity. In accord with this hypothesis, six bacterial Coq7 sequences were previously confirmed to possess a C6-hydroxylation activity (Kwon et al. 2000; Stenmark et al. 2001; Pelosi et al. 2016; Jiang et al. 2019; Zhou et al. 2019; Kazemzadeh et al. 2021) (Table S3). Their capacity to hydroxylate C1 or C5 in addition to C6 was nevertheless not systematically tested. Here, we chose to evaluate the activity and specificity of Coq7 orthologs across the whole diversity of Pseudomonadota by selecting 20 representative sequences and by testing them experimentally according to a previously developed heterologous complementation assay (Pelosi et al. 2016). In this assay, the UQ-hydroxylases of interest are expressed in *E. coli* strains lacking either *ubil*, *ubiH*, *ubiF*, or combinations of those genes. The production of DMQ₈ and UQ₈ provides a read-out of the C1-, C5-, or C6-hydroxylation activities, depending on the strains tested (Fig. 1, Table S4). We quantified DMQ₈ and UQ₈ in lipid extracts of the strains of interest by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection (ECD) and mass spectrometry (MS). As expected and as illustrated by

ECD chromatograms (Fig. 4a), the *ΔubiF* strain containing an empty plasmid accumulated DMQ₈ and was unable to produce UQ₈ (Fig. 4b). In contrast, plasmids containing Coq7 orthologs from Alpha-, Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria allowed for robust production of UQ₈ (Fig. 4a and b), demonstrating that these proteins possess C6-hydroxylase activity. Simultaneous MS detection confirmed the identity of UQ₈ (Fig. S3B). Among the 20 sequences tested, 15 showed significant C6-hydroxylase activity (Fig. 4b). Overall, the Coq7 protein sequences from Alphaproteobacteria showed lower activity when compared with those originating from Beta-, Gamma-, or Zetaproteobacteria, some of them allowing UQ₈ synthesis at levels close to the wild-type *E. coli* strain. We assessed C5- and C1-hydroxylase activities in *ΔubilF* and *ΔubiH* strains, respectively. We did not detect any C1-hydroxylase activity; however, a weak C5-hydroxylase activity was apparent for several Coq7 proteins (Table S5). Interestingly, C5 activity was detected only in Coq7 proteins displaying C6-hydroxylase activity and in all cases the C6 activity was much higher (Fig. 4c). Several reasons may explain the lack of activity of five

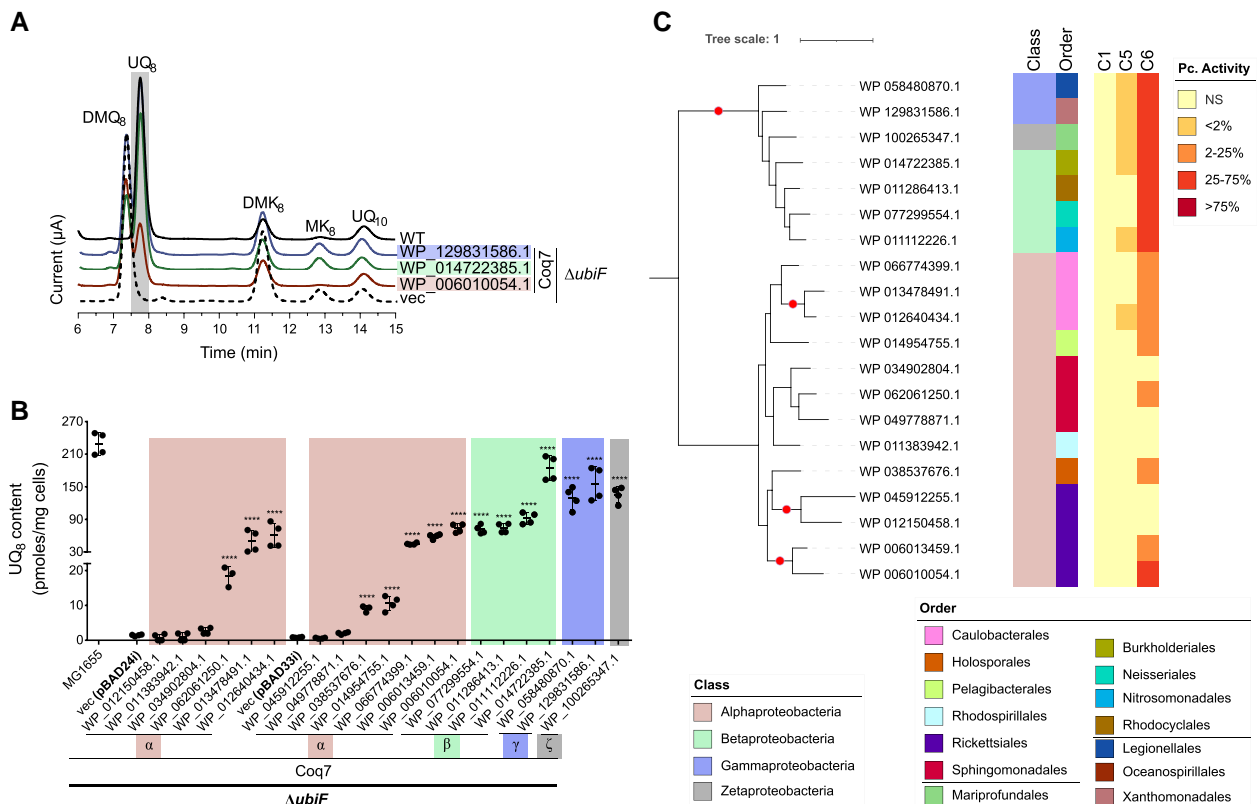


Fig. 4. Experimental characterization of the hydroxylase activities of Coq7. a) HPLC ECD analysis of lipid extracts from 1 mg of *E. coli* MG1655 WT cells and $\Delta ubiF$ cells containing an empty plasmid (vec) or a plasmid carrying the indicated *coq7* genes (from Alpha-, Beta, Gamma-, or Zetaproteobacteria). The chromatograms are representative of at least three independent samples. The peaks corresponding to UQ₈ (highlighted in gray), DMQ₈, DMK₈, MK₈, and the UQ₁₀ standard are indicated. Corresponding HPLC-MS profiles for UQ₈ are presented in Fig. S3C. b) UQ₈ content of $\Delta ubiF$ cells containing pBAD24i or pBAD33i with the indicated Alpha-, Beta, Gamma-, or Zeta-proteobacterial *coq7* genes or empty plasmids (vec). ****p < 0.0001 by unpaired Student's t-test comparing with vec. c) Experimental results reported along a phylogenetic tree of the tested Coq7 sequences (see Fig. S3B for broader Coq7 tree). The hydroxylase activity for each position (C1, C5, and C6) is displayed with a color gradient as a percentage of the maximal hydroxylation activity reported in the *E. coli* MG1655 WT strain (see Materials and Methods; NS, not significant). The taxonomy of the selected sequences (class and order) is shown with a color code along the tree. Branches displaying a UFBoot support above 95% are indicated with a red dot. The tree was obtained using IQ-tree with LG + I + G4 as best selected model of protein sequence evolution. Tree scale is expressed in substitutions per site.

sequences from Alphaproteobacteria (see Discussion). In any case, when considering the phylogenetic tree of experimentally tested Coq7 sequences, it was evident that Coq7 proteins sampled from all major bacterial classes possess C6 activity. We therefore conclude that Coq7 proteins display a selective C6-hydroxylase activity across the diversity of Pseudomonadota. Thus, our biochemical results fully support the usual annotation of Coq7 as a demethoxyubiquinone hydroxylase.

Duplication of a UQ-FMO Explains the Distribution and Activity of UQ-Hydroxylases in Alphaproteobacteria

We next investigated the reasons for the presence of the two major combinations of hydroxylases within the Alphaproteobacteria: UbiL and Coq7 for most orders and two UbiL proteins for Hyphomicrobiales and Rhodobacterales (Fig. 3). In these two orders, Coq7 loss(es) were invoked above. We then built a phylogenetic tree for

UbiL to understand the origins of the two copies. We observed before that the proteins annotated as UbiL were monophyletic (Fig. 2), in agreement with a previous phylogenetic analysis (Pelosi et al. 2016). In addition, the tree shows that UbiL sequences generally cluster according to taxonomic groups, even though the phylogenetic tree is not fully resolved (Fig. 5a, Fig. S4, Text S1). Interestingly, the UbiL tree harbors two subtrees of sequences for each of the two orders Rhodobacterales and Hyphomicrobiales (Fig. 5a), consistent with genomes having two copies of the gene. One pair of subtrees grouped together, while the two others were not grouped but close in the tree, as forming a group together with Caulobacterales and Hyphomonadales sequences. The former subtree grouping Rhodobacterales and Hyphomicrobiales was not highly supported in this version of the tree but was highly supported on the trees displayed on Fig. 5b and Fig. S4. We decided to call the underlying protein sequences “UbiN.” Based on the tree topology for UbiL, we firstly propose that UbiL was vertically transmitted in all Alphaproteobacteria lineages,

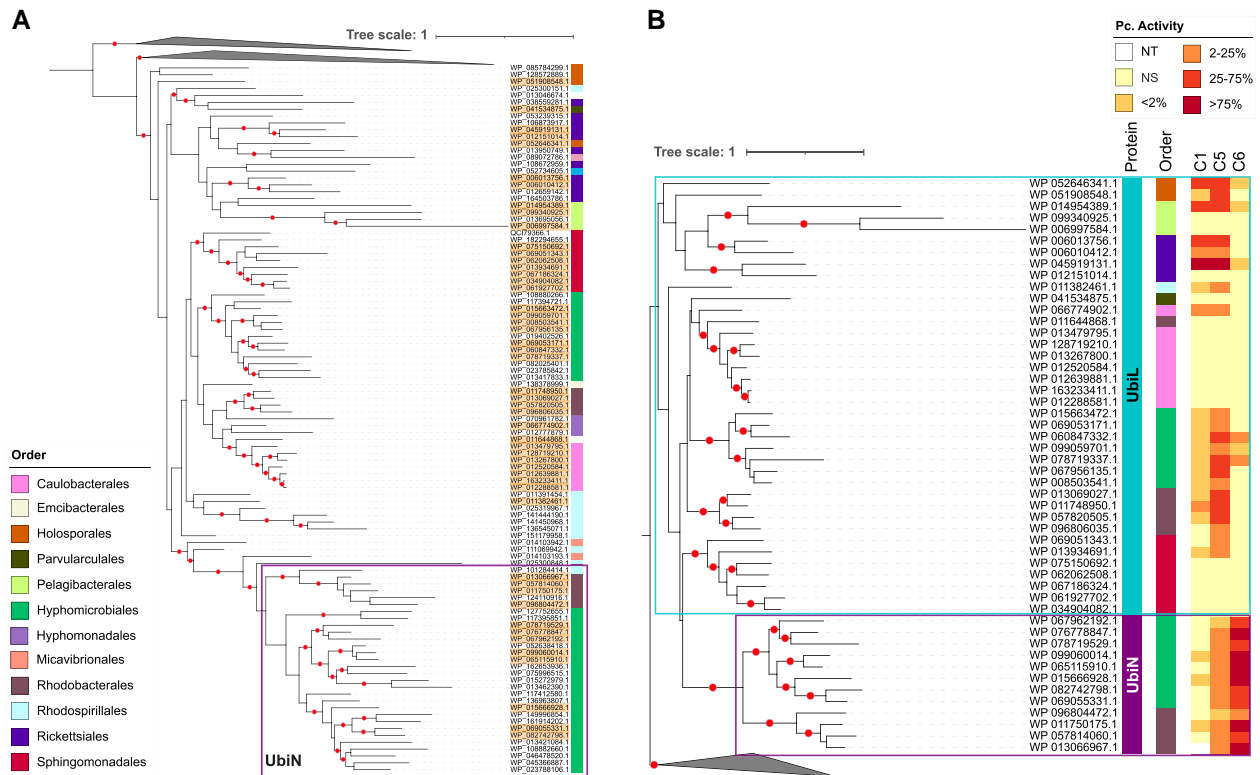


Fig. 5. Phylogenies of UbiL and UbiN proteins and experimental testing of their hydroxylase activities across the diversity of Alphaproteobacteria. a) An overview of the phylogeny obtained for the UQ-FMO specific to Alphaproteobacteria is provided, with UbiFHI and UbiM as outgroups (collapsed). This tree is based on a subset of representative protein sequences of UbiL and UbiN obtained from the CD-HIT clustering at the 50% identity level of all annotated UQ-FMO proteins. Sequences selected for experimental testing were picked across the diversity of UbiL and are highlighted in yellow. b) Experimental results obtained for tested UbiL and UbiN sequences are mapped on the corresponding phylogenetic tree, as in Fig. 4 (NT, not tested; NS, not significant). For both panels, the taxonomy of the selected sequences (order level) is shown with a color code along the trees. Branches displaying a UFBoot support above 95% are indicated with a red dot. The trees were obtained using IQ-tree with LG + F + R10 selected as the best model of sequence evolution for tree on panel a and Q.pfam + R6 for the tree on panel b. The subtrees gathering the outgroup sequences were collapsed (UbiM and UbiFHI in panel a and UbiFHI in panel b). A tree of UbiL without outgroup sequences is displayed in Fig. S4. The tree scale is expressed in substitutions per site.

resulting in one UbiL in all lineages. Secondly, we propose that the Rhodobacteriales and Hyphomicrobiales acquired a second copy from the duplication of the *ubil* gene, giving rise to *ubin* (Fig. 5a).

Based on previous findings that UbiL from *R. rubrum* harbors C1- and C5-hydroxylation activity (Pelosi et al. 2016) and on the observation that Coq7 hydroxylates C6 in Alphaproteobacteria lacking UbiN (Fig. 4c), we formulated two hypotheses: (i) UbiN evolved a C6-hydroxylation activity, thereby replacing the missing Coq7 protein in Hyphomicrobiales and Rhodobacteriales, and (ii) the ancestral UbiL possessed both C1- and C5-hydroxylation activities, which should be conserved in extant UbiL sequences across orders where UbiL did not undergo duplication.

In order to verify these hypotheses, we tested experimentally 38 UbiL and 12 UbiN paralogs. These proteins showed conserved sequence motifs characteristic of UQ-FMOs (Fig. S5). All UbiN sequences showed moderate to strong C6-hydroxylation activity in our heterologous complementation assay (Fig. 5b and Table S5). Interestingly, each UbiN also displayed a C5-hydroxylation activity, albeit much lower than for C6. A low C1 activity was detected for only 3

UbiN sequences (<2% of WT activity; Fig. 5b). Out of the 38 UbiL sequences tested, 17 did not show any hydroxylase activity, the majority belonging to Caulobacteriales and Sphingomonadales (Fig. 5b and Table S5). Nevertheless, one sequence of each clade (WP_066774902.1 from “*Caulobacteraceae bacterium OTSz_A_272*” and WP_013934691.1 from *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* ATCC 29192) showed C1 and C5 activities. Most UbiL sequences from Hyphomicrobiales and Rhodobacteriales displayed a major C5 activity associated with a lower C1 activity, and a minor C6 activity was detected in a few cases (Fig. 5b). In the unsupported group formed by sequences from Rhodospirillales, Rickettsiales, Pelagibacteriales, and Holosporales, the UbiL proteins displayed mostly comparable levels of C1 and C5 activities, with minor C6 activity detected in a few cases. Overall, these data strongly support a scenario in which an ancestral UbiL protein with C1 and C5 activities gave rise by duplication and neofunctionalization to UbiN proteins possessing a rather unselective C6 activity. The emergence of UbiN would have allowed the functional replacement of Coq7 in Hyphomicrobiales and Rhodobacteriales.

From One to Three UQ-FMOs: Two Duplications Occurred within the Clade Grouping Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zeta-proteobacteria

We next focused on the dynamics of the UQ-hydroxylase repertoire within the rest of the Pseudomonadota, i.e. the clade consisting of the Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria. These four bacterial classes possess UbiH, Ubil, and Coq7 as the major combination of hydroxylases, with the exception of (i) the order of Neisseriales (mostly UbiM alone, followed by the combination UbiH, Ubil, and Coq7); (ii) a subclade of Gammaproteobacteria—comprising the Aeromonadales, Alteromonadales, Enterobacterales, Pasteurellales, and Vibrionales—that showed the UbiH, Ubil, and UbiF combination (Fig. 3 and Fig. S2); and (iii) the order of Methylococcales, presenting UbiH and UbiF as the most frequent combination (see later and Discussion).

The evolutionary history of the UQ-FMO enzymes UbiH, Ubil, and UbiF was then considered. Interestingly, the two enzymes UbiH and Ubil formed two highly supported sister subtrees in the tree of UQ-FMO (Fig. 6a). Moreover, the grouping of sequences within the subtrees agreed with the species tree of Pseudomonadota, showing a split between Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria, and well-delineated taxonomic orders arranging in similar fashions between the two subtrees (Fig. S6). We therefore propose that UbiH and Ubil are two paralogs stemming from an ancestral UQ-FMO, which likely duplicated before the divergence of Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria. On the other hand, a highly supported UbiF subtree branched from within the Ubil subtree and showed a branching pattern overall supportive of another duplication event, that of a subclade of Ubil. More precisely, given the gene tree and species tree topologies and their consistency with UbiF distribution, we propose that a duplication of Ubil gave rise to UbiF. This duplication likely occurred in an ancestor of the five monophyletic lineages having lost Coq7 and acquired UbiF, namely the ancestor of the Aeromonadales, Alteromonadales, Enterobacterales, Pasteurellales, and Vibrionales (Fig. 3, Fig. 6a, and S5).

This scenario implies that changes in activities may have occurred following the duplications, as evidenced by the Ubil, UbiH, and UbiF proteins in *E. coli* that are known to hydroxylate C5, C1, and C6, respectively (Haji Chehade et al. 2013) (Fig. 1). However, our understanding of the activity of these protein families is currently limited, as only a few members outside of *E. coli* have been characterized to date (Table S3). To address this problem, we sampled several sequences for each protein across the diversity of Pseudomonadota (Fig. 6a) and assayed their hydroxylase activity. All three selected UbiF sequences had a robust C6 activity and a minor C5 activity, with no detectable C1 activity (Fig. 6b). These results fit perfectly with the minor C5 activity of *E. coli* UbiF that is found in addition to its main C6 activity (Haji Chehade et al. 2013). Among the 13 Ubil sequences, all but 1 displayed a strong C5 activity,

and a minor C1 activity was detected for 5 of them. The Ubil protein of *Mariprofundus ferrinatatus* CP-8 (WP_100265575.1) stood out as it showed equally robust activities at C1, C5, and C6 (Fig. 6b) and was able to restore high levels of UQ₈ in the *E. coli* Δ ubilHF strain (Table S5). C1-hydroxylation was the main activity detected in UbiH proteins, and it was associated with minor C5 or C6 activities in a few cases (Fig. 6b). Overall, our data demonstrate that the hydroxylation activities are globally homogeneous within each subfamily, with UbiF displaying a strong unselective C6 activity, whereas Ubil and UbiH are characterized by strong selective C5 and C1 activities, respectively.

The Case of UbiM

The case of the UbiM enzyme is more challenging to approach than the ones investigated above. UbiM is sometimes the only UQ-hydroxylase found in genomes, as previously observed in Neisseriales (Fig. 3). Accordingly, it was shown to hydroxylate three C positions in *N. meningitidis* (Pelosi et al. 2016). But UbiM is also found in genomes with either a fully fledged UQ-hydroxylase repertoire (e.g. UbiM in combination with UbiH, Ubil, and Coq7 in Xanthomonadales) or an “incomplete” set of UQ-hydroxylases (e.g. in *Acetobacter ascendens* with Ubil alone—Coq7 being missing; see Table S1). In addition, UbiM is found in scattered lineages across Pseudomonadota (Figs. 3 and 7a). The UbiM phylogenetic tree presents mixed groupings of UbiM sequences from Alpha-, Beta-, and Gammaproteobacteria, evidencing multiple cases of LGTs (Fig. 7a). While the lack of resolution of the UbiM tree in its deep nodes prevents the inference of a precise number of LGT events, some appear clearly. This is the case of a LGT likely to have occurred from Neisseriales to Moraxellales (Fig. 7a). Clades of Burkholderiales sequences appear six times in the tree, evidencing a complex history of LGT between Pseudomonadota. Interestingly, despite its scattered distribution and propensity to LGT, UbiM places as a sister group to other UQ-FMO (Fig. 2, Fig. S1). Overall, this makes it difficult to predict whether UbiM has a conserved regioselectivity or even to predict a candidate regioselectivity at all. We thus tested two UbiM sequences from major combinations of UQ-hydroxylases found in Rhodospirillales and Xanthomonadales, in which UbiM is respectively associated either to Ubil or to Ubil, UbiH, and Coq7 (Fig. 3). The UbiM sequences from *Xanthomonas campestris* and *Roseomonas gilardii* allowed robust production of UQ₈ in the *E. coli* Δ ubilHF strain (Fig. 7b and Table S5), demonstrating their capacity to hydroxylate C1, C5, and C6. To determine whether the UbiM protein from *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 is associated with a functional complete set of UQ-hydroxylases, the regioselectivity of the Ubil, UbiH, and Coq7 proteins from this species was tested. Ubil and Coq7 hydroxylated C5 and C6, respectively, but UbiH did not show a significant C1 activity (Table S5). However, the *ubiH* gene from the closely related *X. campestris* pv. *campestris* strain 8004

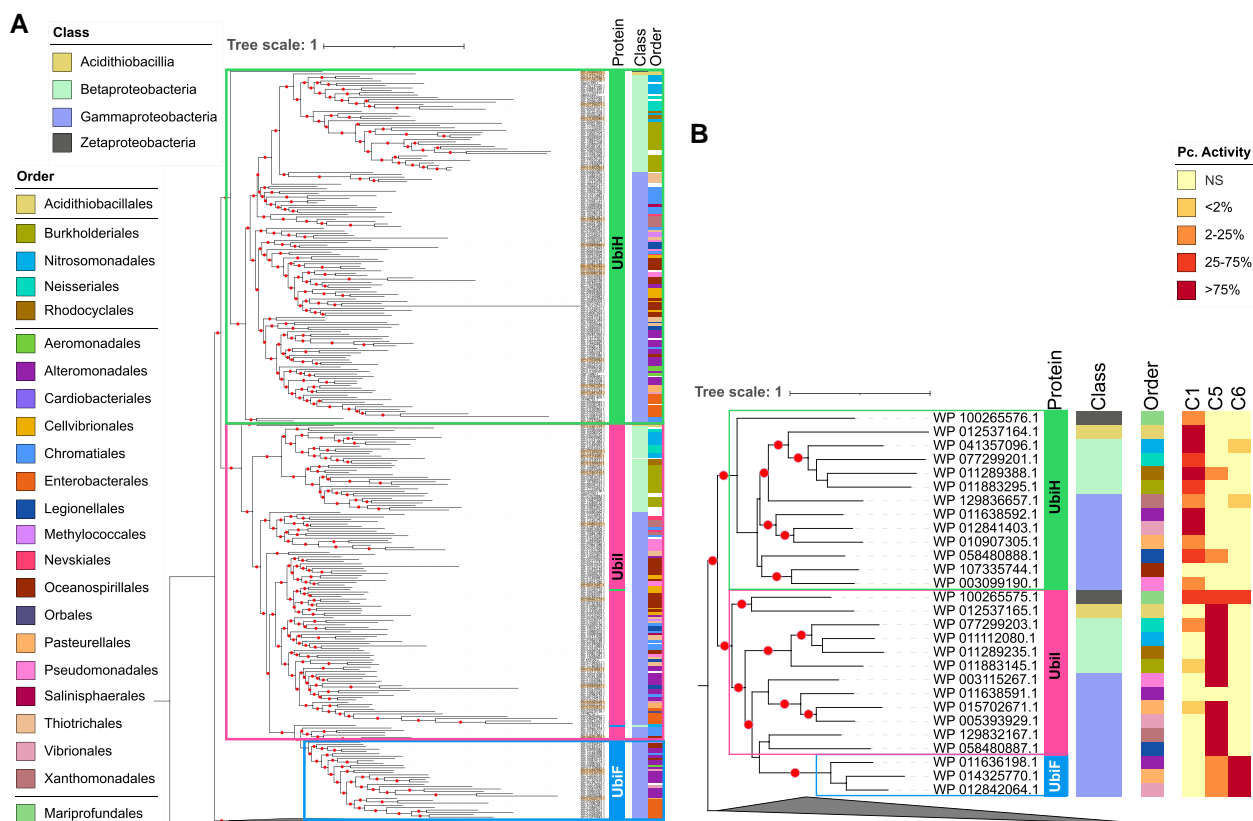


FIG. 6. Phylogenies of UbiFHI proteins and experimental testing of their hydroxylase activities across their diversity. a) An overview of the phylogeny obtained for the UQ-FMO specific to the Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria is provided, with UbiLN and UbiM as outgroups (collapsed). This tree is based on a subset of representative protein sequences of UbiFHI obtained from the CD-HIT clustering at the 50% identity level of all annotated UQ-FMO proteins. Sequences selected for experimental testing were picked across the diversity of UbiFHI and are highlighted in yellow. b) Experimental results obtained for tested UbiFHI sequences are mapped on the corresponding phylogenetic tree, as in Fig. 4. For both panels, the taxonomy of the selected sequences (class and order) is shown with a color code along the trees. Branches displaying a UFBoot support above 95% are indicated with a red dot. The trees were obtained using IQ-tree, with LG + F + R10 selected as the best model for protein sequence evolution in panel a and Q.pfam + R6 in panel b. The subtrees gathering the outgroup sequences were collapsed (UbiM and UbiLN in panel a and UbiLN in panel b). Tree scale is expressed in substitutions per site.

(see Table S6 for sequence homology between the two strains) was shown to be essential for UQ biosynthesis (Zhou et al. 2019). Overall, the data are coherent with UbiM harboring a consistent C1, C5, and C6 regioselectivity (Fig. 7) (Pelosi et al. 2016) and sometimes being associated with a complete set of UQ-hydroxylases, as in the case of *X. campestris*.

Evolutionary Scenario of the UQ-Hydroxylase Repertoire

Combining the results of the evolutionary and experimental analyses described above, we propose the following global scenario (Fig. 8): (i) the last common ancestor of contemporary Pseudomonadota had one UbiL-like enzyme and one Coq7 as UQ-hydroxylases, which were transmitted to the ancestor of Alphaproteobacteria and to the ancestor of all the other Pseudomonadota (Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria). (ii) Within Alphaproteobacteria, UbiL was duplicated in a common ancestor of Hyphomicrobiales and Rhodobacterales and gave rise to UbiN that evolved toward the functionality of

Coq7, which was lost in the process. (iii) In the common ancestor of the remaining Pseudomonadota (Acidithiobacillia and Beta-, Gamma-, and Zetaproteobacteria), the inherited UbiL-like protein was duplicated and subfunctionalized in UbiH and UbiI. (iv) UbiI was then duplicated, giving rise to UbiF in a sublineage of Gammaproteobacteria that evolved toward the function of Coq7, which once again was lost.

The reasoning for the proposed scenario is as follows: given that most UbiL proteins display a C1/C5-hydroxylation activity and that the sister lineage groups the two paralogs UbiH and UbiI with, respectively, C1- and C5-hydroxylation activity, we hypothesize that the enzyme ancestral to UbiH and UbiI had a dual C1/C5 activity similar to that found in UbiL. Upon duplication and subfunctionalization of the ancestor of UbiH and UbiI, this dual activity was split between the two paralogs. This implies that the ancestral UQ-FMO enzyme also had a C1/C5 activity. As for Coq7, it is shown to harbor a conserved C6 activity, has an evolutionary history compatible with its vertical transmission, and is found in all classes of Pseudomonadota, suggesting that a Coq7-type enzyme was also present in the ancestor of Pseudomonadota. Altogether, this leads us to the proposal

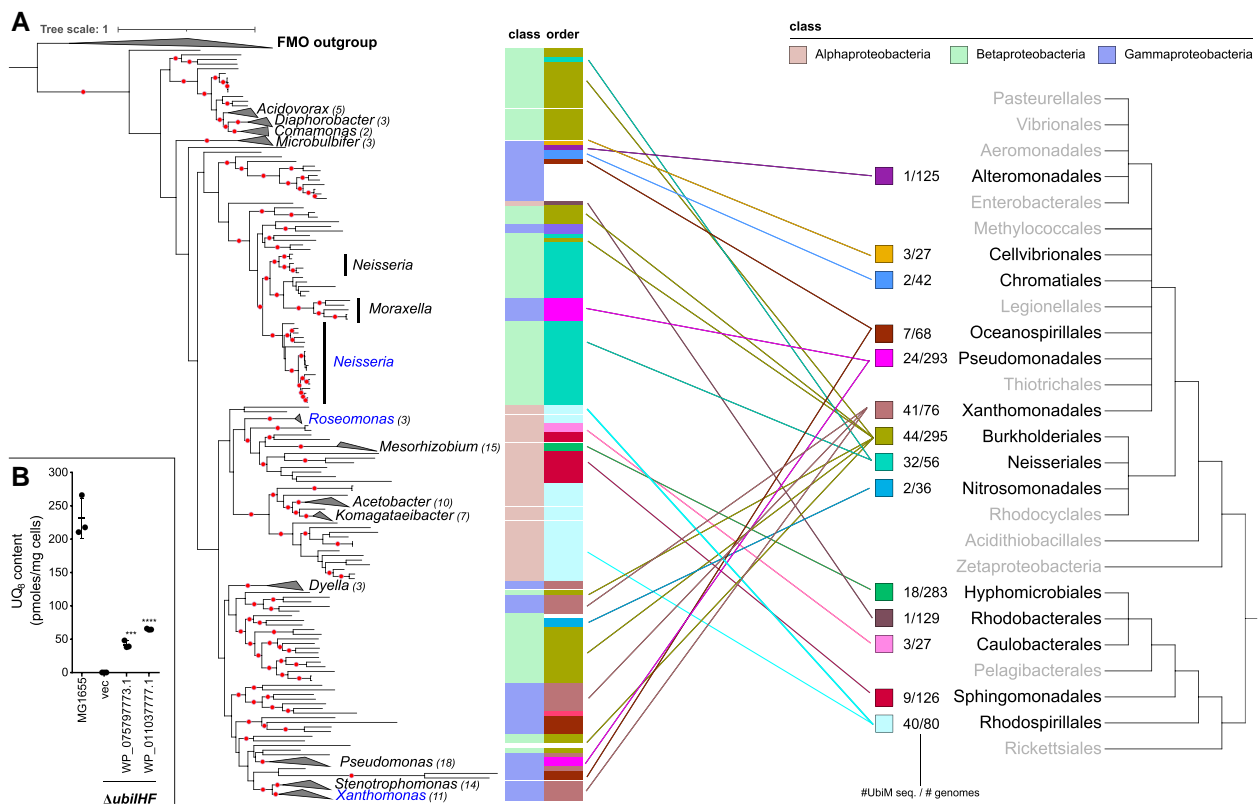


Fig. 7. Phylogeny of UbiM and experimental testing of its activities. a) The phylogenetic tree of all UbiM sequences annotated in the genome data set is presented on the left along with the corresponding taxonomy (class and order levels). The tree was rooted using members of the FMO superfamily as an outgroup (class A flavin monooxygenases [FMOs]) (Mascotti et al. 2016). Well-supported groups of sequences from a same genus were collapsed, and the number of corresponding UbiM sequences was indicated in parenthesis. Names of clades containing experimentally validated UbiM sequences are written in blue (this study and (Pelosi et al. 2016)). A species tree of orders is presented on the right, while the connections of the UbiM sequences to the corresponding orders in the species tree are indicated by colored lines. Orders presenting no UbiM sequence are displayed in gray; otherwise, the number of UbiM sequences and the number of genomes within the order are presented in front of each UbiM-containing order. Branches displaying a UFBoot support above 95% are indicated with a red dot. The tree was obtained using IQ-tree, with LG + F + I + R7 selected as the best model for protein sequence evolution. b) UQ₈ content of WT MG1655 cells or Δ ubiHF cells containing an empty plasmid (vec) or plasmids encoding the indicated UbiM sequences. WP_075797773.1 is from *R. gilardii* U14-5 and WP_011037777.1 from *X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913. ***P < 0.001; ****P < 0.0001 by unpaired Student's t-test comparing with vec.

of an ancestral repertoire of UQ-hydroxylases consisting of a UbiL-like enzyme with C1/C5-hydroxylation activity and of a Coq7 enzyme with C6-hydroxylation activity. In the Alphaproteobacteria, the ancestral repertoire consisted of UbiL and Coq7 with, respectively, C1/C5 and C6 as main activities. A secondarily repertoire evolved in Rhodobacterales and Hyphomicrobiales involving UbiL and the newly characterized UbiN enzyme that acquired C6 activity after duplication of UbiL. This duplication could also explain the fact that UbiN harbors a secondary C5 activity (Fig. 5b), which may derive from its UbiL ancestor. This means that upon UbiL duplication, there was a neofunctionalization toward C6 activity giving rise to UbiN, while Coq7 was lost in an ancestor of Rhodobacterales and Hyphomicrobiales (Fig. 8; the precise order of the events cannot be inferred, as discussed below). Interestingly, this duplication/neofunctionalization of a UQ-FMO and concomitant loss of Coq7 also occurred in the Gammaproteobacteria. Indeed, we propose that UbiF emerged in the ancestor of the Aeromonadales, Alteromonadales, Enterobacterales, Pasteurellales, and

Vibrionales from a Ubil ancestor possessing a C5 activity and evolved a C6-hydroxylation activity. As for UbiN, the observed C5 secondary activity in UbiF (Fig. 6b) can be interpreted as residuals of an ancestral activity. Again, while UbiF evolved a C6 activity, Coq7 was lost. The presence of UbiF in the unrelated Methylococcales might be explained by a LGT (see Discussion). The case of UbiM, its origins, and role in ancestral Pseudomonadota remain a puzzle. Given its deep phylogenetic positioning, it is possible that a more ancient ancestor of Pseudomonadota harbored a single three-C-hydroxylating hydroxylase. Another possibility is that UbiM evolved the capacity to hydroxylate the C6 position in an ancient Pseudomonadota lineage from a UbiL-like protein able to hydroxylate C1 and C5 and then extended to several lineages of Pseudomonadota via LGT. Independently of this, the sparse distribution of UbiM (around 10% of the analyzed genomes) points toward multiple losses early in the diversification of Pseudomonadota, making it uncertain whether UbiM was present in the last common ancestor of contemporary Pseudomonadota.

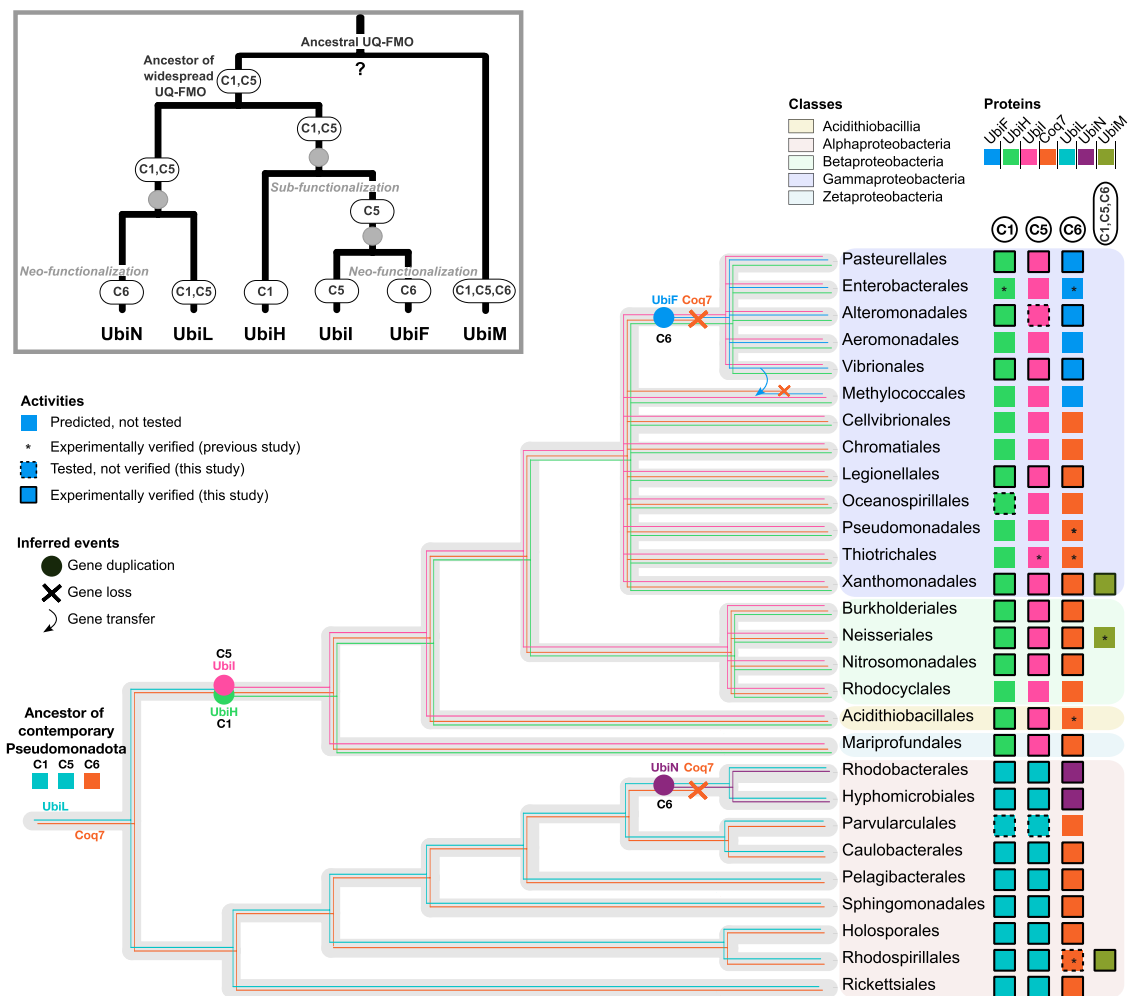


Fig. 8. Overall proposed scenario for the evolution of UQ-hydroxylases. The predicted and experimentally validated repertoire of UQ-hydroxylases is summarized alongside the phylogenetic tree of the Pseudomonadota, with the depiction in each taxonomic order of the proteins involved in each hydroxylation step (colored boxes). The most parsimonious scenario is represented on the form of the gene trees (thin, colored branches) embedded in a candidate species tree (thick, light gray branches). The inferred events of UQ-FMO duplications are represented along the corresponding branches with bubbles and Coq7 losses with crosses. The evolutionary history of UQ-FMO is also summarized in the inset panel, with duplications symbolized by gray dots. The dispersal of UbiM suggests multiple LGTs, while its phylogenetic positioning points at an ancient origin. Based on our combined experimental and phylogenetic analyses, we propose that the last common ancestor of contemporary Pseudomonadota was able to produce UQ via the use of two hydroxylases: one ancestral UbiL-like protein performing the C1- and C5-hydroxylation steps and Coq7 performing the C6-hydroxylation step. This configuration was kept in Alphaproteobacteria, until the loss of Coq7 and a duplication of UbiL that resulted in a neofunctionalization in one of the paralogs, UbiN, that performs mainly C6-hydroxylation and is specific to Hyphomicrobiales and Rhodobacterales. In the ancestor of other Pseudomonadota, there was a duplication of an ancestral UbiL-like protein which resulted in the subfunctionalization of two paralogs: UbiH (C1) and UbiI (C5). This repertoire of hydroxylases was well-conserved, until a duplication of UbiI occurred in the ancestor of a sublineage of Gammaproteobacteria, with the UbiF paralog evolving toward C6 activity and the other conserving the ancestral C5 activity of UbiI. This event was accompanied by the loss of Coq7. A LGT could explain the presence of UbiF in Methylococcales, but the donor lineage is unknown and the arrow is purely illustrative. Finally, whether the first original UQ-FMO was able to perform two (UbiL-like) or three (UbiM-like) hydroxylations remains unresolved. See also the variants of this proposed scenario in [Discussion](#).

Discussion

In this article, an original experimental approach coupled with comparative genomics and phylogenetics was used to study the overall underlying evolutionary history of UQ-hydroxylases. We showed that UQ-FMOs diversified into six subfamilies (UbiF, H, I, L, M, and N) with distinct hydroxylation selectivity via at least three duplication events associated with two cases of neofunctionalization

(UbiF and UbiN) and one case of subfunctionalization (UbiI and UbiH).

UQ-FMO Subfamilies Are Characterized by Distinct Regioselectivities

On the experimental side, *in vitro* assays to test the activity of purified UQ-FMOs are currently unfeasible, mainly because of the extreme hydrophobicity of the UQ

biosynthetic intermediates that are substrates for the C1-, C5-, and C6-hydroxylation reactions. Therefore, to gain insights in the hydroxylation activities of UbiF, UbiH, UbiL, UbiM, and UbiN proteins, we resorted to an *in vivo* heterologous complementation assay, which is based on the expression of UQ-FMO sequences in *E. coli* strains deleted for one or several UQ-FMO genes (Pelosi et al. 2016). It should be noted that in cases where a particular activity was monitored in several mutants, for example, C1-hydroxylation in $\Delta ubiH$ and $\Delta ubiHF$ cells, the results were mostly consistent across strains, reinforcing the validity of our assay (Tables S4 and S5). Several sequences of UbiL and Coq7 from Alphaproteobacteria did not show any activity. A poor expression is unlikely as the codons of all sequences were optimized for *E. coli* expression. A more likely explanation could be a poor interaction of the tested hydroxylases with *E. coli* proteins, several of which form a multiprotein “Ubi complex” that is essential for UQ biosynthesis (Hajj Chehade et al. 2019). Disruption of the Ubi complex or inability to interact with it would translate into a lack of activity in our assay. Even though we had to sample UbiL sequences repeatedly in Caulobacteriales and Sphingomonadales, we eventually obtained one active protein in each group (out of a total of nine and seven sequences tested, respectively). These two proteins showed an activity qualitatively similar to that of the other sequences in the UbiL clade, suggesting that they do not possess functional specificities. Taken together, the results of our experiments increase greatly our understanding of the regioselectivity of UQ-FMOs and demonstrate that distinct activities and selectivities are associated with each subfamily of UQ-FMOs: UbiM possesses a broad C1-, C5-, and C6-hydroxylation activity; UbiH and UbiL possess quite selective C1 and C5 activities, respectively; UbiF and UbiN share a major C6 activity and a minor C5 activity; and UbiL displays C1 and C5 activities, which can be of comparable efficiency in some lineages or with C5 surpassing C1 in others.

Possible Reasons for the Observation of Numerous “Minor Combinations” of UQ-Hydroxylases in Pseudomonadota

We believe that the complex pattern of “minor combinations” presented in Fig. S2 is a mixture of methodological and biological phenomena. Firstly, no annotation pipeline is perfect, and while our HMM protein profiles enabled to capture most of the specificities of each UQ-hydroxylase subfamily (Fig. 2), for some lineages, we could propose a revision of the automatic annotations using phylogenetics. This was the case, for example, for the Neisseriales, in which a UbiF was sometimes annotated in addition to the UbiH, UbiL, and Coq7 expected for Betaproteobacteria. Inspection of the phylogenetic trees of UQ-FMO showed that the proposed UbiF indeed robustly grouped within the UbiH subtree, leading us to reevaluate the set of UQ-hydroxylases as UbiH, UbiL, and Coq7 (Fig. S6). Another example is that of the

Thiotrichales (Gammaproteobacteria), where UbiH was misannotated as UbiL in two genomes. More intriguing was the case of the Oceanospirillales, which displayed a variety of different sets of UQ-hydroxylases (Fig. S2, Table S2) and several of which harbored a set of hydroxylases typical of other orders (e.g. UbiFHI). Similarly to the difficulties with the phylogeny (and taxonomy) of Pseudomonadota discussed below, this may be partly explained by the fact that the Oceanospirillales are polyphyletic, with some representatives being more closely related to other lineages, e.g. the Gammaproteobacteria that have acquired UbiF and lost Coq7 (Liao et al. 2020). However, such a pattern could also result from the lateral transfer of the *ubiF* gene to some Oceanospirillales, as appears to be the case for UbiF in the Methylococcales (Fig. 8). Finally, it is interesting to note that some Hyphomicrobiales possess only UbiL (Fig. S2), which could therefore theoretically perform all three hydroxylation reactions. Further studies, both at the evolutionary and experimental levels, will be needed to investigate the full breadth and complexity of the diversification of UQ-hydroxylases.

Gene Duplications and Neofunctionalization with Respect to C6-Hydroxylation Led to Repeated Losses of Coq7

A striking feature of the evolutionary scenario proposed herein is the parallel evolution of UQ-FMO paralogs toward C6-hydroxylation activity in the Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, accompanied by the loss of Coq7. In addition to phylogenetic analyses and primary hydroxylation activities, we used the observed secondary activities as further support for our evolutionary scenario, especially the secondary C5 activity displayed by the UbiF and UbiN paralogs. This could also be indicative of a certain promiscuity of the C5- and C6-hydroxylation activities across the UQ-FMO family that could favor the appearance of new homologs with C6 as main activity. Interestingly, the co-option of an unrelated family of FMO, with members involved in the hydroxylation of 2,4-dichlorophenol, was recently shown to have provided a new FMO for UQ biosynthesis in Viridiplantae (Latimer et al. 2021; Xu et al. 2021). Incidentally, this proved to be yet another example of the adaptive evolution of C6-hydroxylation activity. How many times this kind of co-option occurred throughout the evolution of the UQ biosynthetic pathway, both in its bacterial and eukaryotic versions, remains to be investigated. Finally, the fact that Coq7 was lost repeatedly in Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria could be a sign that replacing the iron protein with a FMO provides a selective advantage. A possible explanation is that the lineages having lost Coq7 may be highly dependent on iron for their growth and/or for thriving in iron-limited environments. Indeed, iron is a limiting resource for which bacteria compete in several environments, for instance, marine ones (Morel and Price 2003; Moore et al. 2013; Kramer et al. 2020), and various strategies to cope with iron limitation

have been documented, ranging from active iron foraging (e.g. siderophores) to limiting iron dependability. In that case, the loss of Coq7 would fall into the latter category. The relative timing of the Coq7 losses with respect to the cases of UbiL and UbiI duplications could not be inferred from our analyses. However, given the fact that UQ is often the only respiratory quinone of Pseudomonadota, it is most likely that the duplications and neofunctionalizations toward C6 activity preceded the loss of the C6-hydroxylating Coq7 to avoid disruption of UQ biosynthesis.

UbiM Is a Highly Transferable Generalist UQ-Hydroxylase

Contrary to the other UQ-hydroxylases, which are widely distributed and are part of evolutionarily conserved combinations, UbiM has a scattered distribution and was found in association with various sets of UQ-hydroxylases. Biochemical characterization of three UbiM proteins from Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria revealed the capacity of these proteins to hydroxylate the C1, C5, and C6 positions (Fig. 7b, (Pelosi et al. 2016)). The genome of *X. campestris* pv. *campestris* harbors two complete sets of UQ-hydroxylases, as it encodes a UbiM protein together with UbiI, UbiH, and Coq7. Surprisingly, deletion of *ubil* or *ubiH* was sufficient to completely abolish UQ biosynthesis in *X. campestris* pv. *campestris* strain 8004 (Zhou et al. 2019). This suggested that the endogenous UbiM protein was unable to compensate the C1- or C5-hydroxylation defects caused by deletions of *ubil* or *ubiH*, despite having demonstrated robust C1, C5, and C6 activities in our heterologous complementation assay (Fig. 7b). An obvious explanation is that transcriptional regulation of the *ubiM* gene might prevent the expression of the UbiM protein under the conditions used to culture the *X. campestris* *ubil* or *ubiH* mutants. In this case, UbiM may represent an alternative hydroxylation system that might be functional only under specific environmental conditions. Our study of a large and representative genome data set reports UbiM in ~10% of the genomes, whereas it was earlier observed in nearly half of a selected set of 67 Pseudomonadota genomes (Pelosi et al. 2016). While our evolutionary scenario cannot exclude UbiM from being ancestrally found in Pseudomonadota, it is possible that it is a nonessential UQ-hydroxylase in many cases. This would explain why the distribution of UbiM remains sparse while the other UQ-hydroxylases have been widely vertically distributed and conserved. Nevertheless, lateral acquisition of UbiM has been selected for in some cases, indicating that it could be advantageous under some circumstances. Now that we have demonstrated the respective and conserved role of the UQ-hydroxylases, future analyses of the role of UbiM in the context of various UQ-hydroxylase repertoire will be facilitated.

Robustness of Proposed Evolutionary Scenario in the Context of a Hard-to-Solve Species Tree

We present our global scenario in the context of a candidate species tree of Pseudomonadota, which is the subject

of intense debate. Slightly alternative scenarios might be preferred in the future if alternative species trees are proposed. The phylogeny of Alphaproteobacteria has been thoroughly investigated in several recent papers, often with a view to identifying the origins of the mitochondrion (Martijn et al. 2018; Munoz-Gomez et al. 2019; Fan et al. 2020). It has been shown that Alphaproteobacterial phylogeny is difficult to reconstruct due to a combination of rapidly evolving lineages, sequence compositional biases, and sites with heterogeneous evolutionary rates (Munoz-Gomez et al. 2019; Muñoz-Gómez et al. 2022). The question of the monophyly of Hyphomicrobiales and Rhodobacterales is of special interest to our global scenario, as the most parsimonious scenario of one UbiL duplication and one Coq7 loss in Alphaproteobacteria presented in Fig. 8 relies on their shared common ancestry. However, the two lineages were recently proposed to be paraphyletic, with Caulobacterales branching as a sister lineage to Rhodobacterales to the exclusion of Hyphomicrobiales, even if this branching did not get the maximal support (Munoz-Gomez et al. 2019). Genomes of the closely related candidate order Parvibaculales (Genome Taxonomy Database [GTDB], release 214) harbor the Coq7 and UbiL combination of UQ-hydroxylases (Table S1). Their phylogenetic positioning remains to be clarified, as they were observed either as a sister lineage to Hyphomicrobiales or as a more deeply branching lineage (Munoz-Gomez et al. 2019; Hördt et al. 2020; Cevallos and Degli Esposti 2022; Muñoz-Gómez et al. 2022). In the case where Caulobacterales were indeed a sister group of the Rhodobacterales and Parvibaculales a sister group of the Hyphomicrobiales, the scenario for UQ-hydroxylase evolution within Alphaproteobacteria would be more complex than proposed above. It would involve one duplication of UbiL in the common ancestor of the four lineages giving rise to UbiN, two independent losses of Coq7 in the respective ancestors of Rhodobacterales and Hyphomicrobiales, and two independent losses of UbiN in the respective ancestors of Caulobacterales and Parvibaculales.

Several studies have investigated the phylogeny of Gammaproteobacteria using different sets of markers but have tended to focus on the relationships of specific lineages within the class (Spring et al. 2015; Liao et al. 2020). In the end, we chose to include in the candidate species tree (Fig. 8), a split proposed in 2010 in one of the few articles covering the entire breadth of Gammaproteobacteria (Williams et al. 2010). It corresponded to the monophyly of the Aeromonadales, Alteromonadales, Enterobacterales, Pasteurellales, and Vibrionales. Interestingly, this split was consistent with the distribution of UQ-hydroxylases and the existence of a shared ancestor having endured a Ubi-FMO gene duplication and the loss of *coq7*. In addition, the GTDB now considers the Aeromonadales, Alteromonadales, Pasteurellales, and Vibrionales as part of a same order provisionally named “Enterobacterales_A” (Parks et al. 2022).

We argue that species trees obtained using purely phylogenetic approaches could get support from the study of the evolutionary history of traits, including the dynamics of the

genome contents, and the fact that genes being shared specifically between lineages at the exception of others can constitute reliable synapomorphies. In particular, if the gene sets are shared because of a same evolutionary event, such as ancient LGTs or duplications, this can be considered as further pieces of evidence for past common history and descent from a common ancestor (Huang and Gogarten 2006; Abby et al. 2012). Accordingly, recent phylogenetic approaches aiming at reconstructing jointly species trees and gene trees while inferring events of duplications, transfers, and losses have shown promising results to tackle complex evolutionary questions (Szollosi et al. 2013; Williams et al. 2017). We suggest that the shared repertoire in hydroxylases for the crucial UQ biosynthetic pathway could represent relevant patterns to consider when assessing new candidate species trees of Pseudomonadota.

Diversification of Biochemical Pathways via Homologous Enzyme Specialization

To our knowledge, our study of UQ-hydroxylases provides a unique understanding of the evolution of enzymes catalyzing sequential regioselective reactions within a given biosynthetic pathway. The wide conservation of the UQ pathway in Pseudomonadota allowed us to collect a large number of sequences, which was instrumental in establishing the evolutionary scenario. Several pathways leading to the synthesis of specialized molecules are known to involve three regioselective O-methyltransferases to methylate contiguous O atoms on sugar moieties (Patallo et al. 2001; Kim et al. 2010; Simeone et al. 2013). Within each pathway, the methyltransferases are likely to be paralogs, but the narrow distribution of the pathways precludes a phylogenetic reconstruction of the evolutionary history of the enzymes. Similarly, the synthesis of xantholipin was recently shown to rely on XanM1-3, three distinct O-methyltransferases with substrate-dependent regiospecificity that evolved from a single ancestor via an innovation–amplification–divergence model (Kong et al. 2020). Together, these findings suggest that pathways implicating sequential biochemical reactions to modify specific positions of a metabolite evolved specialized regioselective enzymes rather than a single multifunctional enzyme. In this sense, most extant Pseudomonadota species indeed possess three distinct UQ-hydroxylases (Fig. 3) with relatively high regioselectivity, as demonstrated by our experimental results. However, most Alphaproteobacteria possess only two UQ-hydroxylases (Fig. 3) and we detected several genomes with a single UQ-hydroxylase gene (Fig. S2 and Table S2), suggesting that the corresponding proteins are generalist and hydroxylate C1, C5, and C6, as now demonstrated for three UbiM proteins.

Prospects

The objectives of future studies will be to understand why specialized UQ-hydroxylases evolved in some species whereas generalist UQ-hydroxylases evolved in others. They could also aim at revealing the molecular mechanisms and

adaptations that control the regioselectivity of UQ-hydroxylases. This could be done in conjunction with the experimental testing of resurrected ancestral proteins, as a means to test and refine the proposed scenario for the evolution of UQ-hydroxylases with various regioselectivities. On a broader scale, it will be of interest to decipher the evolutionary relationships between the biosynthesis pathways of isoprenoid quinones. Indeed, homologous enzymes are found in the pathways of UQ, menaquinone, and plastoquinone, but a unifying evolutionary scenario remains elusive (Zhi et al. 2014; Degli Esposti 2017; Abby et al. 2020).

Materials and Methods

Genome Data Set

A total of 10,470 complete genomes from the clade of UQ-producing Pseudomonadota (i.e. the former Proteobacteria, excluding Epsilon- and Delta-proteobacteria) were downloaded from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/>), last accessed in October 2020. Priority was given to the “RefSeq” over the “GenBank” assemblies when both were available. The taxonomy of the data set was downloaded from the NCBI (Schoch et al. 2020) in August 2023 and added to the genome annotation Table S1 together with the GTDB classification (release 214) (Parks et al. 2018; Parks et al. 2020). When taxonomy was conflicting between the two databases, priority was given to that of the GTDB that relies on homogeneous genome-based criteria. For instance, Moraxellaceae were kept as part of the Pseudomonadales and Parvibaculales in an order separate from Hyphomicrobiales (see also Discussion). In the end, 2,373 complete genomes were kept for analysis, including 726 Alphaproteobacteria, 414 Betaproteobacteria, 1,224 Gammaproteobacteria, 2 Zetaproteobacteria, 6 Acidithiobacillia, and 1 Hydrogenophilalia (see Table S1).

Annotation of UQ Proteins in Genomes

The genes involved in the UQ biosynthetic pathways were annotated as described previously (Pelosi et al. 2019): HMM protein profiles corresponding to three essential genes of the UQ biosynthesis pathway were used (UbiA, UbiE, and UbiG) as well as profiles for the hydroxylases involved in the O₂-dependent pathway for UQ production: UbiF, UbiH, UbiI, UbiL, and UbiM, but also four specifically designed “decoy” profiles for the diverse set of homologs from the large FMO superfamily (Pelosi et al. 2016; Pelosi et al. 2019) (Text S3). For Coq7, we used the previously reported profile (Pelosi et al. 2019) and designed two new “decoy” profiles for homologs of the “ferritin-like” protein family, in order to improve annotation specificity (see Text S2 and Text S3).

Selected complete genomes were annotated with the abovementioned 17 HMM protein profiles using the `hmmsearch` program from the HMMER suite version 3.2.1 (Eddy 2009, 2011). To this end, a Snakemake workflow and Python scripts were designed, and the pandas

and Biopython libraries were used (Cock et al. 2009; Köster and Rahmann 2012). Best matching profiles (best score) were selected when multiple profiles matched, and the hits were then extracted when having an *i*-value below 0.001 and a profile coverage (portion of the profile aligning with the hit) above 50%. The results of the annotation are displayed for all selected genomes in Table S1, and the HMM protein profiles are available in Data Set S1.

Selection of Representative Sequences

In most of the cases, sequence dereplication was applied to the set of annotated UQ-hydroxylases before running phylogenetic analyses. The CD-Hit program was used with varying parameters: 60% sequence identity clustering was applied for the Cq7 protein family and 50% sequence identity for the UQ-FMO protein family (Li and Godzik 2006). One sequence per cluster was then selected as representative sequence in include in phylogenies, with the priority given to experimentally validated sequences.

Phylogenetic Analyses

Annotated sequences were aligned by protein families using MAFFT (linsi), version 7.511 (Katoh et al. 2002; Katoh and Standley 2013). Sites were filtered from the obtained multiple sequence alignment using BMGE version 2 using the default parameters and the BLOSUM30 matrix (Criscuolo and Gribaldo 2010). Maximum likelihood phylogenetic trees were computed from the filtered multiple sequence alignments using the IQ-Tree software, version 2.2.0 (Hoang et al. 2018; Minh et al. 2020). Both aLRT and UFBoot supports were computed (1,000 replicates for each), and the best model was assessed for each alignment using the default parameters. Upon first phylogenetic tree reconstruction, sets of sequences provoking long branches (typically >1 substitutions per site) were removed and alignments and trees were reconstructed. For each final alignment analyzed, 11 iterations of IQ-Tree were ran, the first run being the one used for the selection of the best model of sequence evolution that was subsequently reused for the 10 additional runs. All obtained phylogenetic trees were manually inspected, and a representative one displaying high supports in its deep nodes was selected for illustration and annotated with iTOL (Letunic and Bork 2021) and Inkscape version 1.3.1 (<https://inkscape.org/>). Species trees on Fig. 3 and Fig. S2 were decorated with UQ-hydroxylase combinations and proportions using the ETE 3 Python library (Huerta-Cepas et al. 2016). All trees and iTOL annotation files are available in Data Set S2. All trees presented in main text figures are available annotated with the corresponding species names in Data Set S3.

FMO Outgroup

Sequences from the class A of the FMO superfamily were selected as the most closely related FMO according to a previous evolutionary study (Mascotti et al. 2016). All sequences from Table S2 of that article were included as outgroup in rooted UQ-FMO phylogenies, except for that

of *Mus musculus* (Uniprot sequence ID “Q8VDP3,” [F-actin]-monoxygenase MICAL1) that presented a much longer sequence than the other FMOs. The list of the sequence identifiers of the included FMO sequences is the following: P00438, P20586, Q93NG3, A6T923, Q0SFK6, Q9HWG9, Q93L51, P38169, Q54530, Q93LY7, Q8KI25, P15245, and Q6SSJ6. Their full denomination (enzyme description and organism) is presented in Data Set S3.

Strain Construction

All bacterial strains used in this study are listed in Table S7. The $\Delta ubiH \Delta ubiF::kan$ double mutant was constructed by P1 transduction using MG1655 $\Delta ubiHc$ as the recipient strain and the JW0659 from the Keio collection (Baba et al. 2006) as the donor strain (<https://barricklab.org/wiki/bin/view/Lab/ProtocolsP1Transduction>). The presence of the *ubiF::kan* mutation was confirmed by colony polymerase chain reaction (PCR) with primers flanking the *ubiF* locus.

Cloning and Plasmid Construction

The plasmids and the primers used in this study are listed in Tables S8 and S9 (Supplementary Material), respectively. pBAD24i was kindly constructed by Dr Laurent Loiseau (IMM, Marseille) by modifying the multiple cloning site (MCS) of pBAD24 (Guzman et al. 1995) from GGAA TTCACCATGGTACCCG into GGAAATCACCATGGAA TTCCCG in order to move the EcoRI site from 5' to 3' of the NcoI site. pBAD33i was constructed from pBAD33 (Guzman et al. 1995) by replacing its MCS with that of pBAD24i using EcoRV and HindIII restriction enzymes. In order to subclone the genes of interest in the MCS of pBAD33i by NcoI and HindIII restriction enzymes, a NcoI site was eliminated from chloramphenicol resistant (*cat*) gene of pBAD33i. To do so, a point mutation was introduced in the *cat* gene on pBAD33i by overlap PCR using two pairs of primer, CAT ss NCO 5/CAT ss NCO 3 and CAT Beag 5/CAT Bpu10I (Table S9).

The hydroxylase genes experimentally tested in this study are listed in Table S5. The genes were synthesized by the “Proteogenix” and “Genecust” companies and cloned into pBAD24i or pBAD33i vector downstream of arabinose-inducible promoter using NcoI (5' end) and HindIII (3' end) restriction enzymes. The nucleotide sequences were optimized for expression in *E. coli* and are available in Data Set S4. The ATG start codon of the hydroxylase genes is comprised in the NcoI site sequence (CCATGG), which imposes a G as the first nucleotide of the second codon. In case the second amino acid did not correspond to a codon starting with a G, an alanine codon (GCG) was added before the second codon of the nucleotide sequence. Alanine was chosen as it shows minimal adverse effects (Bivona et al. 2010), and the sequences with an additional alanine in position 2 are listed in Table S8. The absence or presence of an extra alanine in position 2 of tested sequences is also reported in Table S2.

Growth Conditions for In Vivo Complementation Assays

The *E. coli* mutant strains inactivated for one, two, or three UQ-hydroxylase(s) (Table S7) were transformed by pBAD24i or pBAD33i empty vectors or pBAD carrying the genes of interest and selected on lysogeny broth (LB) plates supplemented with either Ampicillin (100 µg/mL) or chloramphenicol (30 µg/mL). Individual clones were inoculated in 1.5 mL LB medium with the appropriate antibiotic and grown overnight at 37°C in closed Eppendorf tubes. These precultures were used to inoculate, at OD₆₀₀ ~ 0.02, cultures of 5 mL LB medium containing 0.05% (wt/vol) arabinose and the appropriate antibiotic. The aerobic cultures were grown overnight in 30-mL glass tubes at 37°C with 180 rpm shaking. The 5 mL cultures were cooled on ice for at least 30 min before centrifugation at 3,200 × g at 4°C for 10 min. Cell pellets were washed in 1 mL ice-cold phosphate-buffer saline (PBS) and transferred to pre-weighted 1.5-mL Eppendorf tubes. After centrifugation at 12,000 × g at 4°C for 1 min, the supernatant was discarded, the cell wet weight was determined, and pellets were stored at –20°C until lipid extraction, if necessary.

Lipid Extraction and Quinone Analysis

Quinone extraction from cell pellets was performed as previously described (Hajj Chehade et al. 2013). The dried lipid extracts were resuspended in 100 µL ethanol, and a volume corresponding to 1 mg of cell wet weight was analyzed by HPLC ECD-MS with a BetaBasic-18 column at a flow rate of 1 mL/min with a mobile phase composed of 50% methanol, 40% ethanol, and 10% of a mix (90% isopropanol, 10% ammonium acetate [1 M], and 0.1% formic acid). When necessary, MS detection was performed with a MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe temperature, 400°C; cone voltage, 80 V). Single-ion monitoring detected the following compounds: UQ₈ (M + NH₄⁺), m/z 744 to 745, 6 to 10 min, scan time of 0.2 s; UQ₁₀ (M + NH₄⁺), m/z 880 to 881, 10 to 17 min, scan time of 0.2 s; DMQ₈ (M + NH₄⁺), m/z 714 to 715 to 10 min, scan time of 0.4 s; OPP (M + NH₄⁺), 656 to 657, 5 to 9 min, scan time of 0.4 s; and 4-HP₈ (M + NH₄⁺), 670 to 671, 6 to 10 min, scan time of 0.4 s. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time of 0.3 s.

ECD and MS 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 peaks of UQ₈ and the biosynthetic intermediates obtained with ECD were quantified with a standard curve of UQ₁₀ as previously described (Hajj Chehade et al. 2013). The absolute quantification of UQ₈ based on the m/z 744 to 745 signal at 7.8 min was performed with a standard curve of UQ₈ ranging from 6.25 to 50 pmol UQ₈.

Statistical Analyses of Experimental Results

We normalized the experimental data using a log transformation and performed quality checks. Then, for each

gene and each genetic background, we assessed the significance of the encoded activity (DMQ₈ or Q₈) with a t-test (Table S5). We corrected for multiple tests using Bonferroni (Bonferroni 1936) and considered significance at a threshold of 0.05. We thus controlled the overall family-wise error rate. We then computed the fold change for each gene/genetic background and categorized the fold change in four categories: between 0% and 2%, between 2% and 25%, between 25% and 75%, and above 75%. We define 100% as (i) the level of Q₈ in the wild-type strain and (ii) the level of DMQ₈ in the *ΔubiF* strain containing an empty vector. Due to the different genetic backgrounds, a protein can be tested several times for hydroxylation at a specific position (C1, C5, or C6). We aggregated the results to obtain one corrected P-value/fold change per protein and position by considering the highest activity.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Molecular Biology and Evolution* online.

Acknowledgments

We thank Alexandre de Brevern and members of Isabelle André's group for discussion. We appreciate the constructive comments provided by Eduardo Rocha, Jérémy Esque, and Joël Gaffé on an earlier version of this manuscript. We are very grateful to John Willison for improving the language of the manuscript. This project was supported by the Université Grenoble Alpes and the French National Research Agency (ANR, Agence Nationale de la Recherche) in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02, "Grenoble Alpes Data Institute," and IDEX-IRS 2020 call) and the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and by two grants from the ANR: QUINEVOL (grant agreement ANR-21-CE02-0018) and DEEPen (grant agreement ANR-19-CE45-0013).

Conflict of interest. None declared.

Data Availability

The data underlying this article are available in the article and in its online supplementary material. The HMM protein profiles are available as Data Set S1 on Figshare (DOI: 10.6084/m9.figshare.23230421 available at <https://figshare.com/s/cada5807e393cc6888c8>). The multiple sequence alignments and corresponding phylogenetic trees are available as Data Set S2 on Figshare (DOI: 10.6084/m9.figshare.23230562 available at <https://figshare.com/s/fbe913faabb2ba08253b>).

References

Abby SS, Kazemzadeh K, Vragneau C, Pelosi L, Pierrel F. Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone. *Biochim*

- Biophys Acta Bioenerg.* 2020;**1861**(11):148259. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148259>.
- Abby SS, Tannier E, Gouy M, Daubin V. Lateral gene transfer as a support for the tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;**109**(13):4962–4967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116871109>.
- Aussel L, Pierrat F, Loiseau L, Lombard M, Fontecave M, Barras F. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2014;**1837**(7):1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.015>.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006;**2**(1):2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
- Bachmann BO. Applied evolutionary theories for engineering of secondary metabolic pathways. *Curr Opin Chem Biol.* 2016;**35**:133–141. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.021>.
- Baier F, Copp JN, Tokuriki N. Evolution of enzyme superfamilies: comprehensive exploration of sequence–function relationships. *Biochemistry* 2016;**55**(46):6375–6388. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00723>.
- Balabanova L, Averianova L, Marchenok M, Son O, Tekutyeva L. Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: from ecosystems to industrial biotechnology. *Int J Mol Sci.* 2021;**22**(9):4522. <https://doi.org/10.3390/ijms22094522>.
- Bivona L, Zou Z, Stutzman N, Sun PD. Influence of the second amino acid on recombinant protein expression. *Protein Expr Purif.* 2010;**74**(2):248–256. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.06.005>.
- Bonferroni CE. 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Seeber Available from: <https://books.google.fr/books?id=3CY-HQAACAAJ>
- Cevallos MA, Degli Esposti M. New alphaproteobacteria thrive in the depths of the ocean with oxygen gradient. *Microorganisms* 2022;**10**(2):455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020455>.
- Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski B, et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics.* 2009;**25**(11):1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>.
- Crisuolo A, Gribaldo S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol.* 2010;**10**(1):210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>.
- Crits-Christoph A, Diamond S, Butterfield CN, Thomas BC, Banfield JF. Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. *Nature* 2018;**558**(7710):440–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0207-y>.
- de Crécy-Lagard V. Variations in metabolic pathways create challenges for automated metabolic reconstructions: examples from the tetrahydrofolate synthesis pathway. *Comput Struct Biotechnol J.* 2014;**10**(16):41–50. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.05.008>.
- Degli Esposti M. A journey across genomes uncovers the origin of ubiquinone in Cyanobacteria. *Genome Biol Evol.* 2017;**9**(11):3039–3053. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx225>.
- Denise R, Babor J, Gerlt JA, de Crécy-Lagard V. Pyridoxal 5'-phosphate synthesis and salvage in Bacteria and Archaea: predicting pathway variant distributions and holes. *Microbial Genomics* 2023;**9**(2):mgen000926. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000926>.
- Eddy SR. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Inform.* 2009;**23**:205–211. https://doi.org/10.1142/9781848165632_0019.
- Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol.* 2011;**7**(10):e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
- Fan L, Wu D, Goremykin V, Xiao J, Xu Y, Garg S, Zhang C, Martin WF, Zhu R. Phylogenetic analyses with systematic taxon sampling show that mitochondria branch within Alphaproteobacteria. *Nat Ecol Evol.* 2020;**4**(9):1213–1219. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1239-x>.
- Forsberg Z, Bissaro B, Gullesen J, Dalhus B, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monoxygenase functionality. *J Biol Chem.* 2018;**293**(4):1397–1412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817130>.
- Franza T, Gaudu P. Quinones: more than electron shuttles. *Res Microbiol.* 2022;**173**(6-7):103953. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103953>.
- Glasner ME, Truong DP, Morse BC. How enzyme promiscuity and horizontal gene transfer contribute to metabolic innovation. *FEBS J.* 2020;**287**(7):1323–1342. <https://doi.org/10.1111/febs.15185>.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* 1995;**177**(14):4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>.
- Hajj Chehade M, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M, Golinelli-Pimpaneau B, Mellot-Draznieks C, Hamelin O, Aussel L, et al. UbiI, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. *J Biol Chem.* 2013;**288**(27):20085–20092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480368>.
- Hajj Chehade M, Pelosi L, Fyfe CD, Loiseau L, Rascalou B, Brugière S, Kazemzadeh K, Vo CD, Ciccone L, Aussel L, et al. A soluble metabolon synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone. *Cell Chem Biol.* 2019;**26**(4):482–492.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>.
- Hansen CC, Nelson DR, Møller BL, Werck-Reichhart D. Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. *Mol Plant.* 2021;**14**(8):1244–1265. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.06.028>.
- Hoang DT, Chernomor O, Von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol.* 2018;**35**(2):518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>.
- Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold L-M, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of alphaproteobacteria. *Front Microbiol.* 2020;**11**:468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>.
- Huang J, Gogarten JP. Ancient horizontal gene transfer can benefit phylogenetic reconstruction. *Trends Genet.* 2006;**22**(7):361–366. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.05.004>.
- Huerta-Cepas J, Serra F, Bork P. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. *Mol Biol Evol.* 2016;**33**(6):1635–1638. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw046>.
- Jayaraman V, Toledo-Patiño S, Noda-García L, Laurino P. Mechanisms of protein evolution. *Protein Sci.* 2022;**31**(7):e4362. <https://doi.org/10.1002/pro.4362>.
- Jiang H-X, Wang J, Zhou L, Jin Z-J, Cao X-Q, Liu H, Chen H-F, He Y-W. Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2019;**46**(7):1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02179-1>.
- Kalluraya CA, Weitzel AJ, Tsu BV, Daugherty MD. Bacterial origin of a key innovation in the evolution of the vertebrate eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;**120**(16):e2214815120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214815120>.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;**30**(14):3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;**30**(4):772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Kawamukai M. Biosynthesis and applications of prenylquinones. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;**82**(6):963–977. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1433020>.

- Kazemzadeh K, Hajj Chehade M, Hourdoir G, Brunet CD, Caspar Y, Loiseau L, Barras F, Pierrel F, Pelosi L. The biosynthetic pathway of ubiquinone contributes to pathogenicity of *Francisella novicida*. *J Bacteriol.* 2021;**203**(23):e00400-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00400-21>.
- Kim HJ, White-Phillip JA, Ogasawara Y, Shin N, Isiorho EA, Liu H. Biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of SpnH, SpnI, and SpnK. *J Am Chem Soc.* 2010;**132**(9):2901–2903. <https://doi.org/10.1021/ja910223x>.
- Kirschning A. On the evolution of coenzyme biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 2022;**39**(11):2175–2199. <https://doi.org/10.1039/D2NP00037G>.
- Kong L, Wang Q, Yang W, Shen J, Li Y, Zheng X, Wang L, Chu Y, Deng Z, Chooi Y-H, et al. Three recently diverging duplicated methyltransferases exhibit substrate-dependent regioselectivity essential for xantholin biosynthesis. *ACS Chem Biol.* 2020;**15**(8):2107–2115. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00296>.
- Köster J, Rahmann S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics.* 2012;**28**(19):2520–2522. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts480>.
- Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2020;**18**(3):152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.
- Kwon O, Kotsakis A, Meganathan R. Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the ubiF gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;**186**(2):157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09097.x>.
- Latimer S, Keene SA, Stutts LR, Berger A, Bernert AC, Soubeyrand E, Wright J, Clarke CF, Block AK, Colquhoun TA, et al. A dedicated flavin-dependent monooxygenase catalyzes the hydroxylation of demethoxyubiquinone into ubiquinone (coenzyme Q) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2021;**297**(5):101283. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101283>.
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;**49**(W1):W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
- Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2006;**22**(13):1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>.
- Liao H, Lin X, Li Y, Qu M, Tian Y. Reclassification of the taxonomic framework of orders Cellvibrionales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, and Alteromonadales in class Gammaproteobacteria through phylogenomic tree analysis. *mSystems.* 2020;**5**(5):e00543-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00543-20>.
- Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema TJG. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature.* 2018;**557**(7703):101–105. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0059-5>.
- Mascotti ML, Juri Ayub M, Furnham N, Thornton JM, Laskowski RA. Chopping and changing: the evolution of the flavin-dependent monooxygenases. *J Mol Biol.* 2016;**428**(15):3131–3146. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>.
- Michael AJ. Evolution of biosynthetic diversity. *Biochem J.* 2017;**474**(14):2277–2299. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160823>.
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol.* 2020;**37**(5):1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- Moore CM, Mills MM, Arrigo KR, Berman-Frank I, Bopp L, Boyd PW, Galbraith ED, Geider RJ, Guieu C, Jaccard SL, et al. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosci.* 2013;**6**(9):701–710. <https://doi.org/10.1038/ngeo1765>.
- Morel FMM, Price NM. The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science.* 2003;**300**(5621):944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1083545>.
- Muñoz-Gómez SA, Hess S, Burger G, Lang BF, Susko E, Slamovits CH, Roger AJ. An updated phylogeny of the Alphaproteobacteria reveals that the parasitic Rickettsiales and Holosporales have independent origins. *eLife.* 2019;**8**:e42535. <https://doi.org/10.7554/eLife.42535>.
- Muñoz-Gómez SA, Susko E, Williamson K, Eme L, Slamovits CH, Moreira D, López-García P, Roger AJ. Site-and-branch-heterogeneous analyses of an expanded dataset favour mitochondria as sister to known Alphaproteobacteria. *Nat Ecol Evol.* 2022;**6**(3):253–262. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01638-2>.
- Nowicka B, Kruk J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta.* 2010;**1797**(9):1587–1605. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.007>.
- Paoli L, Ruscheweyh H-J, Forneris CC, Hubrich F, Kautsar S, Bhushan A, Lotti A, Clayson Q, Salazar G, Milanese A, et al. Biosynthetic potential of the global ocean microbiome. *Nature.* 2022;**607**(7917):111–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04862-3>.
- Parks DH, Chuvochina M, Chaumeil P, Rinke C, Mussig AJ, Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nat Biotechnol.* 2020;**38**(9):1079–1086.
- Parks DH, Chuvochina M, Rinke C, Mussig AJ, Chaumeil P-A, Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 2022;**50**(D1):D785–D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>.
- Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil P, Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol.* 2018;**36**(10):996–1004.
- Patallo EP, Blanco G, Fischer C, Braña AF, Rohr J, Méndez C, Salas JA. Deoxysugar methylation during biosynthesis of the antitumor polyketide elloramycin by *Streptomyces olivaceus*. *J Biol Chem.* 2001;**276**(22):18765–18774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101225200>.
- Pelosi L, Ducluzeau AL, Loiseau L, Barras F, Schneider D, Junier I, Pierrel F. Evolution of ubiquinone biosynthesis: multiple proteobacterial enzymes with various regioselectivities to catalyze three contiguous aromatic hydroxylation reactions. *mSystems.* 2016;**1**(4):e00091-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00091-16>.
- Pelosi L, Vo CD, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Goussé M, Chenal C, Touati N, et al. Ubiquinone biosynthesis over the entire O₂ range: characterization of a conserved O₂-independent pathway. *MBio.* 2019;**10**(4):e01319-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01319-19>.
- Raman S, Rogers JK, Taylor ND, Church GM. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;**111**(50):17803–17808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409523111>.
- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The origin and diversification of mitochondria. *Curr Biol.* 2017;**27**(21):R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>.
- Salzberg SL. Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. *Genome Biol.* 2019;**20**(1):92. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1715-2>.
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, McVeigh R, O'Neill K, Robbertse B, et al. NCBI taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford).* 2020;**2020**:baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.
- Schoepp-Cothenet B, Lieutaud C, Baymann F, Vermeglio A, Friedrich T, Kramer DM, Nitschke W. Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;**106**(21):8549–8554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813173106>.
- Simeone R, Huet G, Constant P, Malaga W, Lemassu A, Laval F, Daffé M, Guilhot C, Chalut C. Functional characterisation of three O-methyltransferases involved in the biosynthesis of phenolglycolipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2013;**8**(3):e58954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058954>.
- Spring S, Scheuner C, Göker M, Klenk H-P. A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary

- relationships using genome-scale data. *Front Microbiol.* 2015;**6**:281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00281>.
- Stenmark P, Grünler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA. A new member of the family of Di-iron carboxylate proteins. *J Biol Chem.* 2001;**276**(36):33297–33300. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100346200>.
- Szöllősi GJ, Rosikiewicz W, Boussau B, Tannier E, Daubin V. Efficient exploration of the space of reconciled gene trees. *Syst Biol.* 2013;**62**(6):901–912. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt054>.
- Vu VV, Hangasky JA, Detomasi TC, Henry SJW, Ngo ST, Span EA, Marletta MA. Substrate selectivity in starch polysaccharide monooxygenases. *J Biol Chem.* 2019;**294**(32):12157–12166. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009509>.
- Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, Nordberg EK, Snyder EE, Shalloom JM, Dickerman AW. Phylogeny of Gammaproteobacteria. *J Bacteriol.* 2010;**192**(9):2305–2314. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-09>.
- Williams KP, Kelly DP. Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;**63**(Pt_8):2901–2906. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049270-0>.
- Williams TA, Szöllősi GJ, Spang A, Foster PG, Heaps SE, Boussau B, Ettema TJG, Embley TM. Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;**114**(23):E4602–E4611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618463114>.
- Xu J-J, Zhang X-F, Jiang Y, Fan H, Li J-X, Li C-Y, Zhao Q, Yang L, HuY-H, Martin C, et al. A unique flavoenzyme operates in ubiquinone biosynthesis in photosynthesis-related eukaryotes. *Sci Adv.* 2021;**7**(50):eabl3594. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl3594>.
- Zallot R, Harrison K, Kolaczowski B, De Crécy-Lagard V. Functional annotations of paralogs: a blessing and a curse. *Life* 2016;**6**(3):39. <https://doi.org/10.3390/life6030039>.
- Zhi XY, Yao JC, Tang SK, Huang Y, Li HW, Li WJ. The futasine pathway played an important role in menaquinone biosynthesis during early prokaryote evolution. *Genome Biol Evol.* 2014;**6**(1):149–160. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu007>.
- Zhou L, Li M, Wang X-Y, Liu H, Sun S, Chen H, Poplawsky A, He Y-W. Biosynthesis of coenzyme Q in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* via a yeast-like pathway. *Mol Plant Microbe Interact.* 2019;**32**(2):217–226. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0183-R>.
- Zou T, Riso VA, Gavira JA, Sanchez-Ruiz JM, Ozkan SB. Evolution of conformational dynamics determines the conversion of a promiscuous generalist into a specialist enzyme. *Mol Biol Evol.* 2015;**32**(1):132–143. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu281>.

Supplementary material for:

**Diversification of ubiquinone biosynthesis *via* gene duplications,
transfers, losses, and parallel evolution**

Katayoun Kazemzadeh, Ludovic Pelosi, Clothilde Chenal, Sophie-Carole Chobert, Mahmoud Hajj Chehade, Margaux Jullien, Laura Flandrin, William Schmitt, Qiqi He, Emma Bouvet, Manon Jarzynka, Nelle Varoquaux, Ivan Junier, Fabien Pierrel*, Sophie S Abby*

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France

* corresponding authors

Table of content:

- **Supplementary Texts and Methods**

Text S1 – Additional information on phylogenetic analyses of UQ-FMO

Text S2 – Additional information on phylogenetic analyses of Coq7

Text S3 – Building HMM protein profiles

- **Supplementary Figures**

Figure S1 – Rooting the UQ-FMO tree

Figure S2 – Minority combinations of UQ-hydroxylases

Figure S3 – Phylogeny of Coq7

Figure S4 – Phylogeny of UbiLN

Figure S5 – Alignment of experimentally validated sequences

Figure S6 – Phylogeny of UbiFHI

- **Supplementary Tables**

Table S1 – Table of genomes analysed and annotations (attached XLS file)

Table S2 – Table of UQ-hydroxylation combinations (attached XLS file)

Table S3 – List of previously experimentally tested UQ-hydroxylases (this file)

Table S4 – Genetic backgrounds and measurable products (this file)

Table S5 – Table of experimental results (attached XLS file)

Table S6 – Sequence comparison between the UQ-hydroxylases of *X. campestris* strain ATCC 33913 and strain 8004 (this file)

Table S7 – List of bacterial strains (this file)

Table S8 – List of plasmids (attached XLS file)

Table S9 – List of oligonucleotide primers (this file)

- **Supplementary Data**

Dataset S1 – HMM protein profiles used in this study (.zip archive) available at Figshare DOI: 10.6084/m9.figshare.23230421 <https://figshare.com/s/cada5807e393cc6888c8>

Dataset S2 – Archive containing the alignments and phylogenetic trees built in this study (.zip archive) available at Figshare DOI: 10.6084/m9.figshare.23230562
<https://figshare.com/s/fbe913faabb2ba08253b>

Dataset S3 – Phylogenetic trees from main text presented with species names (attached PDF file).

Dataset S4 – Optimized sequences for gene synthesis (attached FASTA file, .txt extension)

Supplementary Texts and Methods

Supplementary text 1. Additional information on phylogenetic analyses of UQ-FMO

As expected from the investigation of very ancient diversification events (probably more than 2 billion years old for some of the nodes in the reconstructed trees) with an individual protein analysis, one of the features of the obtained trees is the lack of support and/or short branches for some of the deep nodes. This was especially visible when adding a FMO outgroup to the UQ-FMO phylogenies (Figure S1).

Several leads were investigated to test the relative branching order of the UQ-FMO in rooted phylogenies. Sequences from the FMO class A group were selected as outgroup sequences as they were deemed to be the most closely related to UQ-FMO (Mascotti et al. 2016). A representative subset of UbiM sequences and the experimentally tested sequences of UQ-FMO were selected to build a rooted UQ-FMO phylogeny (Figure S1A). This tree did show limited branch supports and short branch lengths in its deep nodes, while UbiN was found to group outside of UbiL sequences – contrary to the UQ-FMO trees obtained without the FMO distant outgroup (e.g., Figure 2). Two groups of sequences were sequentially removed from the dataset, conferring a gradually improved tree resolution: UbiN sequences at first (Figure S1B); then a set of compositionally-biased or fast-evolving sequences from the lineages Rickettsiales, Pelagibacterales and Holosporales (Munoz-Gomez et al. 2019) (Figure S1C). The final well-supported rooted UQ-FMO phylogeny showed highly supported monophyletic groups of UQ-FMO and UbiM as the sister-lineage of the remaining UQ-FMO. Overall, this is suggestive of the presence of artifactual branchings in some of the reconstructed trees. However, based on our comprehensive phylogenetic analyses, we propose the early emergence of UbiM as a sister-group to other UQ-FMO and that the combined experimental, phylogenetics, and genome annotation results make a strong case about the position of UbiN nesting within UbiL sequences (and emergence from a duplication of a UbiL). Indeed, when excluding the FMO outgroup sequences from the analyses, the UQ-FMO trees displaying the monophyly of UbiL and UbiN have stronger supports in the deep nodes than the ones showing otherwise, including well-supported monophyletic groups for the different UQ-FMO sub-families (Figure 2, Dataset S2).

Supplementary text 2. Additional information on phylogenetic analyses of Coq7

Coq7 is a short protein (~160 amino acids, when UQ-FMO have around 400), whose sequences across Pseudomonadota seem to hold limited information to reconstruct ancient relationships. The introduction of outgroup sequences from the ferritin-like super-family into phylogenetic analyses was challenging, as depending on the set of sequences introduced, they were only a handful of sites retained after alignment filtering (e.g., 15 sites only when aligning sequences annotated by the “Coq7”, “Coq7-decoy” and “Coq7-decoy-proteo” HMM profiles – see Text S3). This made phylogenetic reconstructions impossible. In Figure S3A is presented a tree with closer homologs within Pseudomonadota annotated with the “Coq7-decoy-proteo” HMM profile. These homologs separate well from extant Coq7, consist in a group of sequences from mixed lineages and are found in genomes harbouring highly variable UQ-hydroxylases repertoire (Figure S3A). Given these elements, and the excellent adequation between experimental characterizations and the proposed evolutionary scenario for UQ-hydroxylases repertoire, this makes them very unlikely to have a role in UQ

biosynthesis. The Coq7 trees are overall not well-resolved yet not in disagreement with the species tree of Pseudomonadota (Figure 4C, Figure S3B). The two clades corresponding to the Alphaproteobacteria and the rest of the monophyletic Pseudomonadota are linked by a very long branch, suggesting they have accumulated a lot of substitutions and diverged a lot. It could be interesting to investigate the reasons for this in further details.

Supplementary text 3. Building HMM protein profiles

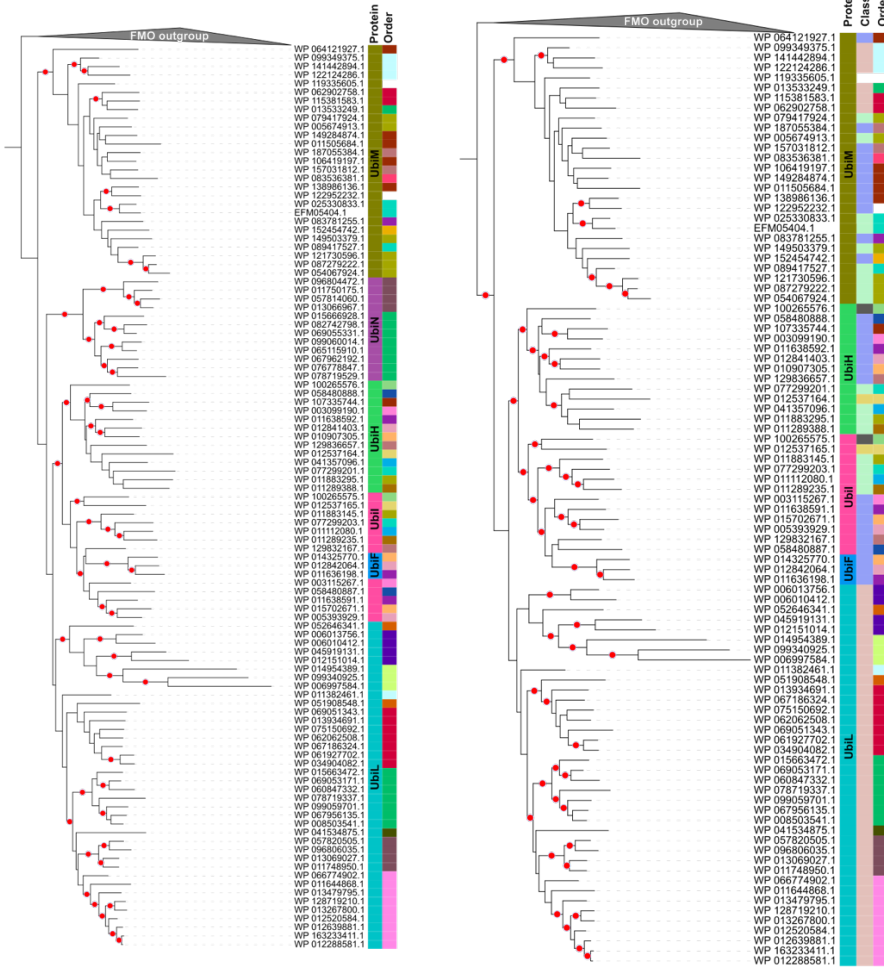
The genes involved in the ubiquinone biosynthetic pathways were annotated as presented in (Pelosi et al. 2019): HMM protein profiles corresponding to three essential genes of the ubiquinone biosynthesis pathway were used (UbiA and MenA, UbiE and UbiG) as well as profiles for the hydroxylases involved in the O₂-dependent pathway for UQ production: UbiF, UbiH, UbiI, UbiL and UbiM, but also four specifically designed “decoy” profiles for the diverse set of homologs from the large FMO super-family (Pelosi et al. 2016; Pelosi et al. 2019).

For Coq7, we used the previously reported profile to search hits with HMMER 3 across a set of genomes representative of the bacterial diversity (Pelosi et al. 2019). We retrieved all sequences filtered (i-evalue < 0.001 and alignment profile coverage > 50%), and built a phylogenetic tree with the sequences with IQ-Tree version 1.6.12, default parameters (Minh et al. 2020). We observed there was a clade made of sequences from diverse bacterial phyla, including non-UQ producers. The rest of the tree corresponded to sequences from genomes of UQ-producers. We made a 1st “decoy” profile for the clade that consisted in “ferritin-like” proteins and not genuine Coq7 (MAFFT version 7, linsi alignment with extremities trimmed according to BMGE BLOSUM30 results, passed to hmmbuild of the HMMER suite) (Criscuolo and Gribaldo 2010; Eddy 2011; Katoh and Standley 2013). We then used the two profiles: the original Coq7 and the new “decoy” profile (“Coq7-decoy”) to search for hits in a dataset enriched in UQ-producers. We found several genomes with >1 hits (2 at most), when a single Coq7 hit was initially expected. We thus performed extra phylogenetic analyses from all hits obtained for Coq7 profile in the UQ-producers dataset. Most of the clades of the tree corresponded to major classes of Pseudomonadota, except for one that was made of a mix of Alpha-, Beta- and Gamma- proteobacteria sequences (see also Text S2 and Figure S3A). Interestingly, this clade also corresponded to sequences found in genomes that often harbored two hits for Coq7 and sequences from genomes not known to have a Coq7 protein (e.g., Hyphomicrobiales as found in (Pelosi et al. 2016)). We then designed an extra profile from this mixed clade as the 2nd “decoy” profile for Coq7 homologs (“Coq7-decoy-proteo”) using the same procedure than above. For Coq7, the newly obtained profiles were added, resulting in three profiles for the proper identification of Coq7 (one for Coq7, two for Coq7 homologs not involved in UQ biosynthesis). In total, 16 HMM protein profiles were used to annotate genomes for the UQ biosynthetic pathway and UQ-hydroxylases (Dataset S1).

Supplementary Figures

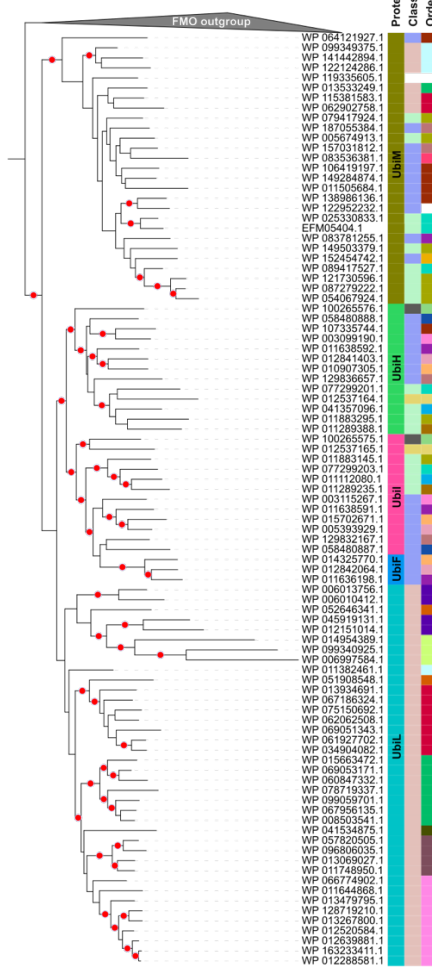
A. Tree with all sequences

Tree scale: 1



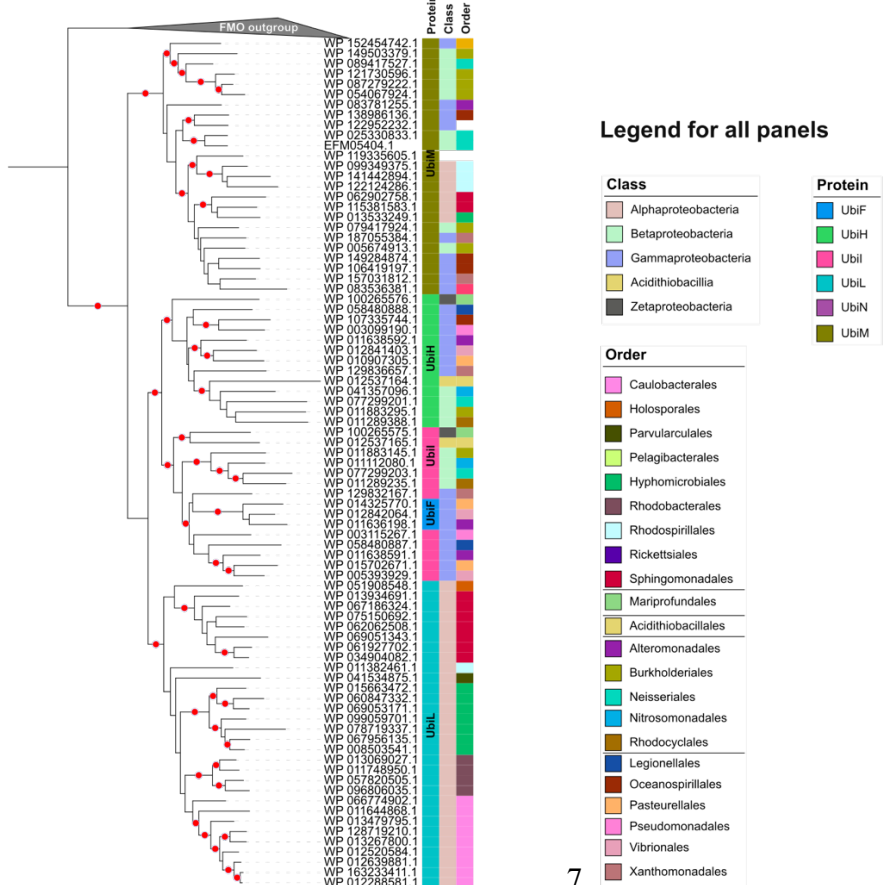
B. Tree without UbiN sequences

Tree scale: 1



C. Tree without UbiN and long-branch provoking UbiL sequences

Tree scale: 1



Legend for all panels

| Class | Protein |
|---------------------|---------|
| Alphaproteobacteria | UbiF |
| Betaproteobacteria | UbiH |
| Gammaproteobacteria | UbiI |
| Acidithiobactia | UbiL |
| Zetaproteobacteria | UbiN |
| | UbiM |

| Order |
|--------------------|
| Caulobacteriales |
| Holospirales |
| Parvularculales |
| Pelagibacteriales |
| Hyphomicrobiales |
| Rhodobacterales |
| Rhodospirillales |
| Rickettsiales |
| Sphingomonadales |
| Mariprofundales |
| Acidithiobactiales |
| Alteromonadales |
| Burkholderiales |
| Neisseriales |
| Nitrosomonadales |
| Rhodocyclales |
| Legionellales |
| Oceanospirillales |
| Pasteurellales |
| Pseudomonadales |
| Vibrionales |
| Xanthomonadales |

Figure S1. Rooted phylogenetic trees of the UQ-FMO. The trees presented were rooted with sequences from the FMO super-family, class A. They include a set of representative UbiM sequences (CD-HIT clustering at the 50% identity level) and all UQ-FMO sequences experimentally tested in this study. These phylogenetic trees are presented in panels A, B and C to show the impact of the inclusion of UbiN and of some long-branch provoking UbiL sequences on the robustness of the rooted phylogeny of UQ-FMO. The monophyly of the UQ-FMO is highly supported, but the split between the UbiLN and UbiFHI subgroups is not recovered when UbiN sequences are part of the analysis (panel **A**). The support of the phylogeny, especially in its deep nodes, increases upon the consecutive removal of UbiN sequences (panel **B**) and of the UbiL sequences from Rickettsiales, Holosporales and Pelagibacterales (panel **C**). Branches displaying a UF-Boot support above 95% are indicated with a red dot. The trees were obtained using IQ-tree with Q.pfam+R7, Q.pfam+R7 and LG+F+R6 selected as the best model of sequence evolution for trees on panels A, B and C respectively. Tree scales are expressed in substitutions per site.

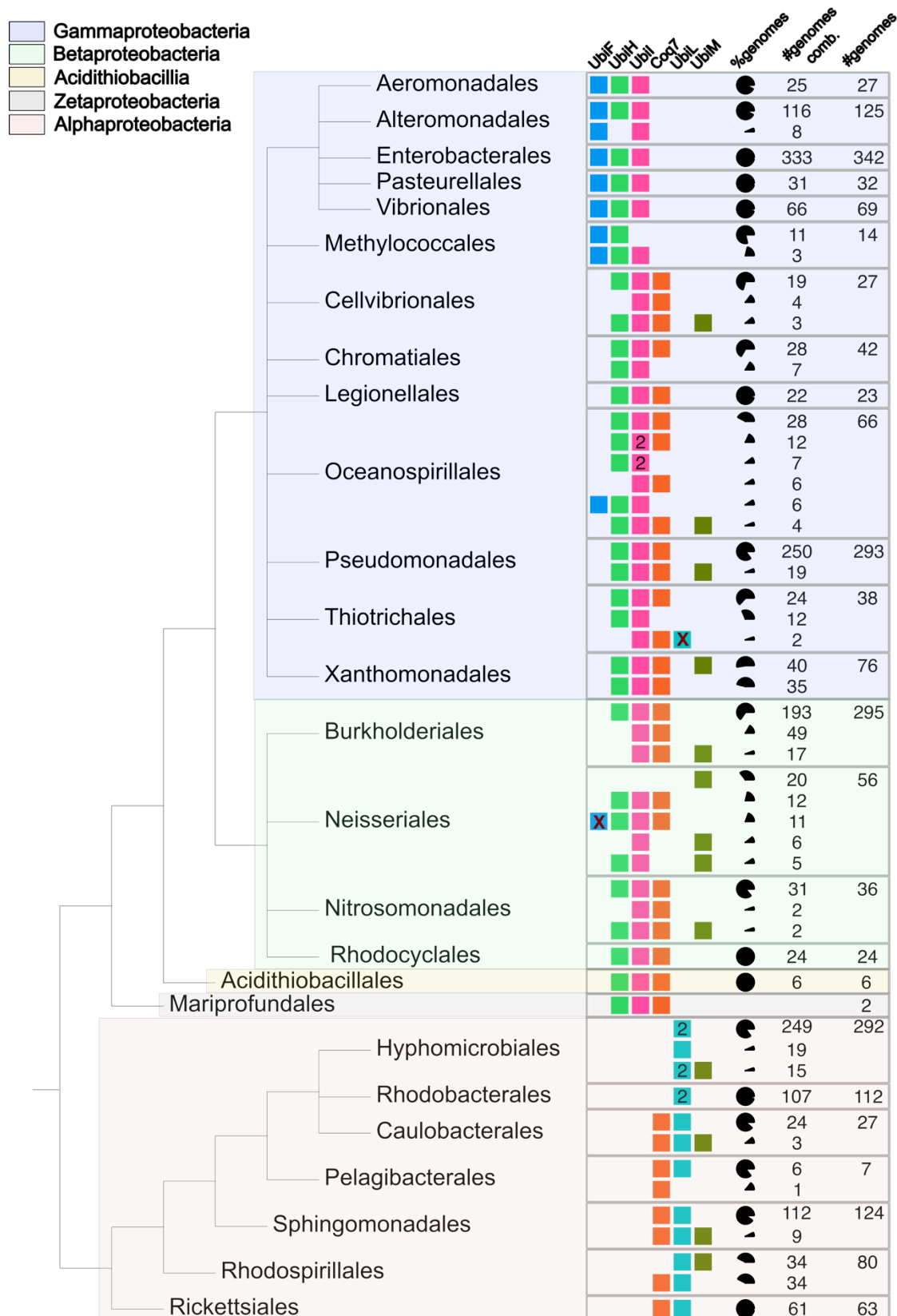


Figure S2. The repertoire of UQ-hydroxylase combinations across Pseudomonadota. The combinations of UQ-hydroxylases are displayed for all the orders represented by more than 5 genomes, except for the Zetaproteobacteria (Mariprofundales, only two genomes). Pie charts indicate the proportion of the genomes within the order displaying the majority combination, and the total number of genomes analysed for each order is indicated in the last column “#genomes”. The species tree is drawn as a

consensus from previous studies (Williams et al. 2010; Williams and Kelly 2013; Roger et al. 2017; Munoz-Gomez et al. 2019). A red cross indicates cases where UQ-hydroxylases sequences were misclassified with the HMM protein profiles, as pointed by their phylogenetic positioning (and agreement with the combinations otherwise observed in the orders, see Discussion).

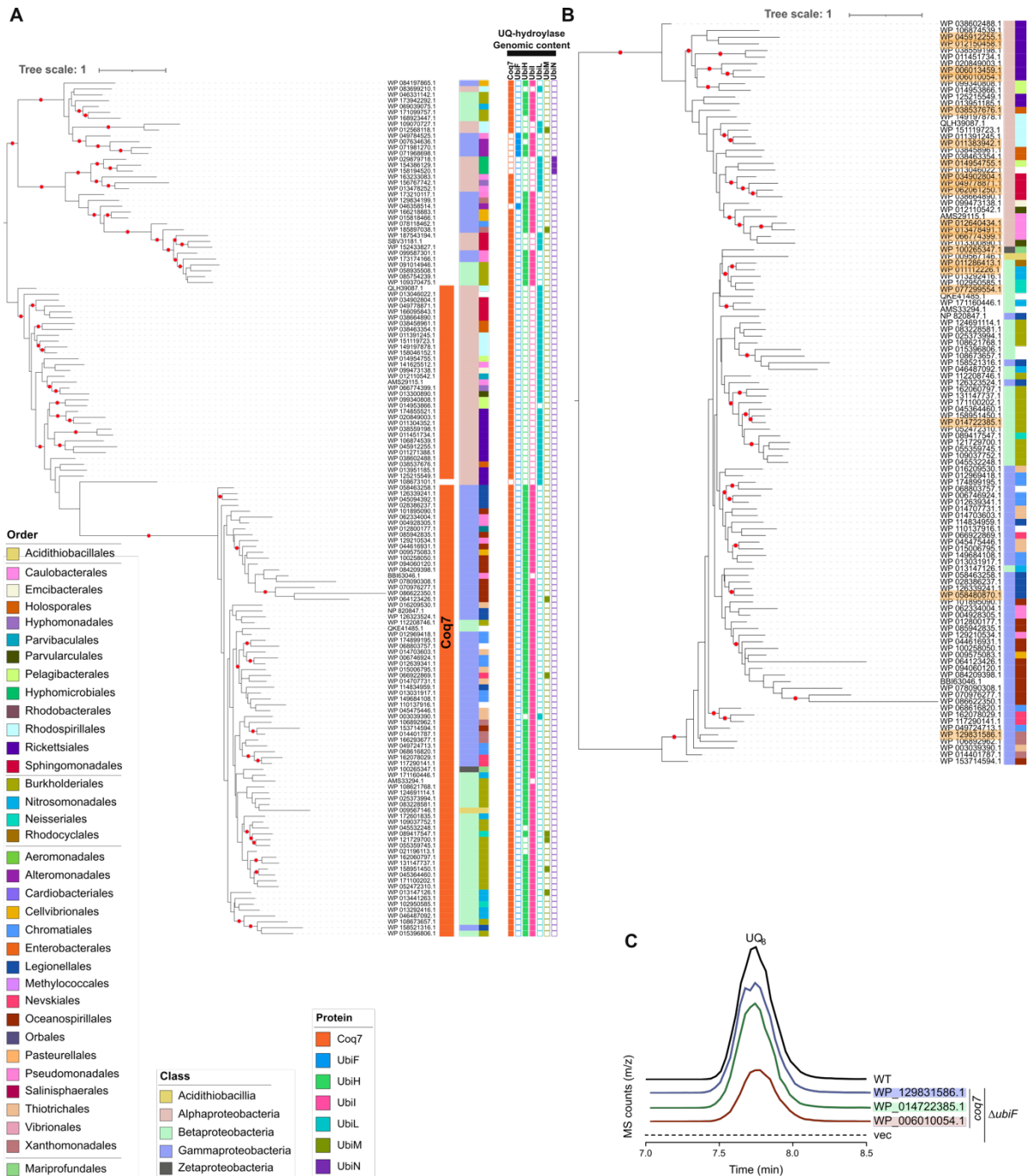


Figure S3. Additional information for Coq7. **(A)** Phylogeny of Coq7 and homologs detected within Pseudomonadota. This tree is based on a subset of representative protein sequences of Coq7 and homologs annotated with the “Coq7-decoy” profile, obtained from CD-HIT clustering at the 60% identity level of all annotated proteins. The taxonomy as well as the UQ-hydroxylase repertoire of the corresponding genomes are shown alongside the tree. It demonstrates the designed HMM protein profiles account for the presence of these homologs and enable to discriminate Coq7 from its homologs (“Coq7” and “Coq7-decoy” profiles, see Text S3). Branches displaying a UF-Boot support above 95% are indicated with a red dot. The tree was obtained using IQ-tree with LG+F+R6 selected as the best model of sequence evolution. Tree scale is expressed in substitutions per site. **(B)** Global phylogeny of Coq7. This tree is based on a subset of representative protein sequences of Coq7 obtained from CD-HIT

clustering at the 60% identity level of all annotated Coq7 proteins. Sequences selected for experimental testing were picked across the diversity of Coq7 and are highlighted in yellow. Branches displaying a UF-Boot support above 95% are indicated with a red dot. The tree was obtained using IQ-tree with LG+F+R6 selected as the best model of sequence evolution. Tree scale is expressed in substitutions per site. **(C)** HPLC-MS profiles for m/z 744-745 (UQ₈, M + NH₄⁺) corresponding to the analyses of Figure 4A.

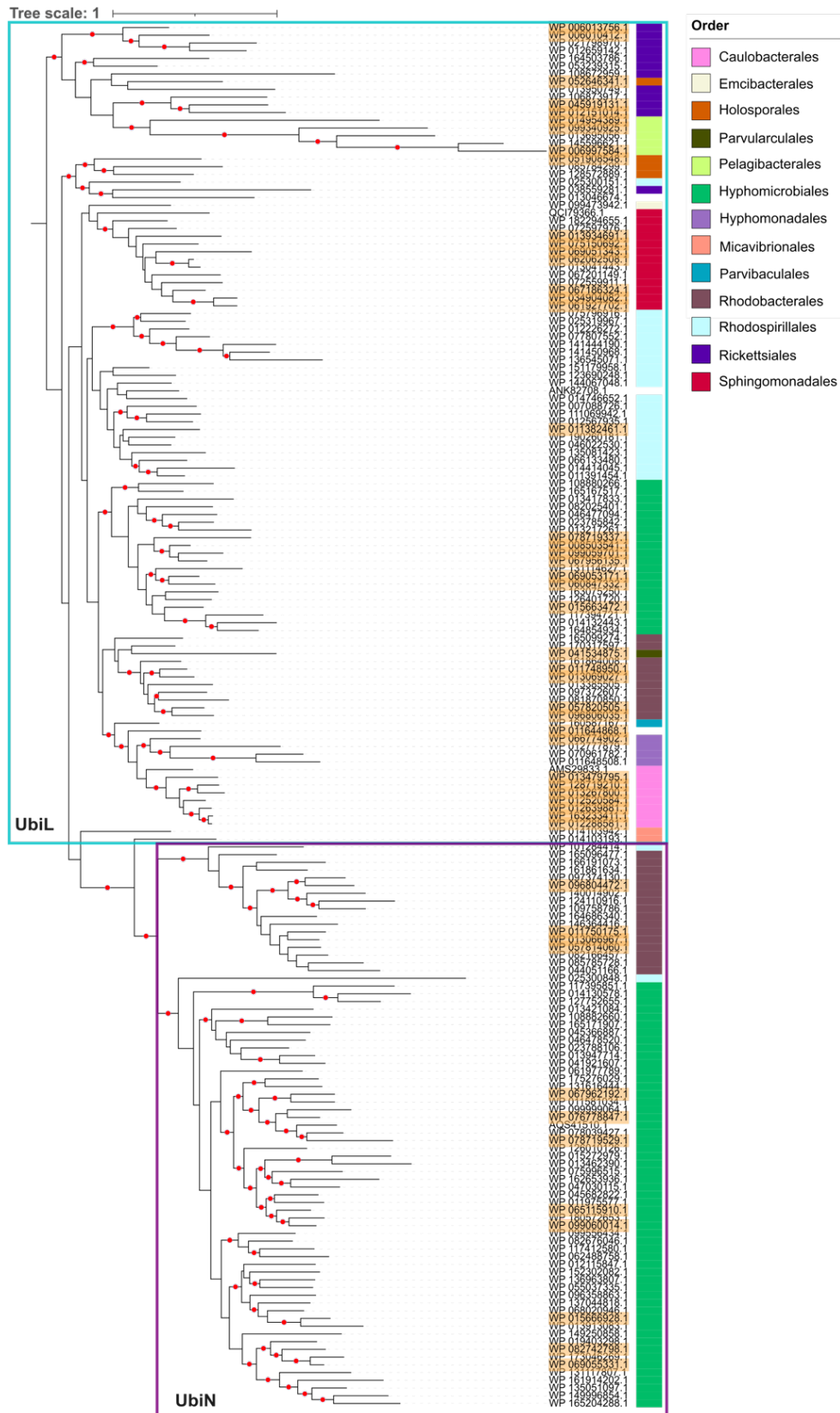


Figure S4. Phylogenetic tree of UbiL and UbiN, the UQ-hydroxylases specific to Alphaproteobacteria. It is consistent with that of the global UQ-FMO tree presented in Figures 3 and 5. The tree was rooted using the Rickettsiales sequences as an outgroup. The tree was obtained using IQ-tree with Q.pfam+I+R7 selected as the best model of sequence evolution. Branches displaying a UF-Boot support above 95% are indicated with a red dot. Tree scale is expressed in substitutions per site.

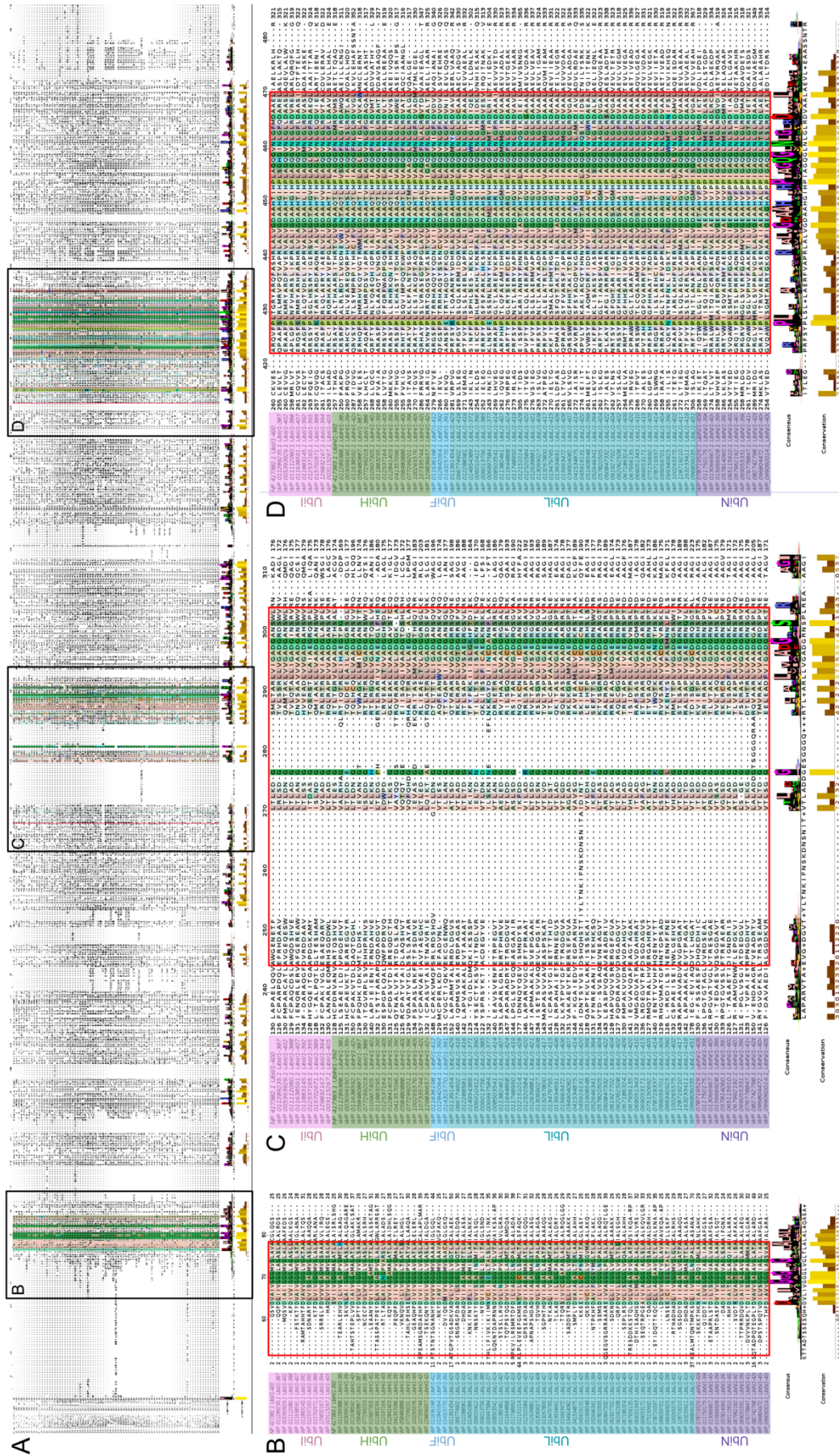


Figure S5. Conserved motifs within UQ-FMOs. **A.** Overview of conservation along the sequences tested experimentally and localization of the regions of interest. Alignments were generated using MAFFT version 7.520, linsi algorithm, (Kato and Standley 2013) and analyzed with Jalview version 2.11.2.6 (Waterhouse et al. 2009). The regions highlighted correspond to the first FAD

fingerprint sequence (**B**), the DG amino acid sequence (**C**), and the second FAD binding motif (**D**). These motifs are shared by FMOs, including UQ-FMOs as already shown on a smaller subset of sequences in (Pelosi et al. 2016).

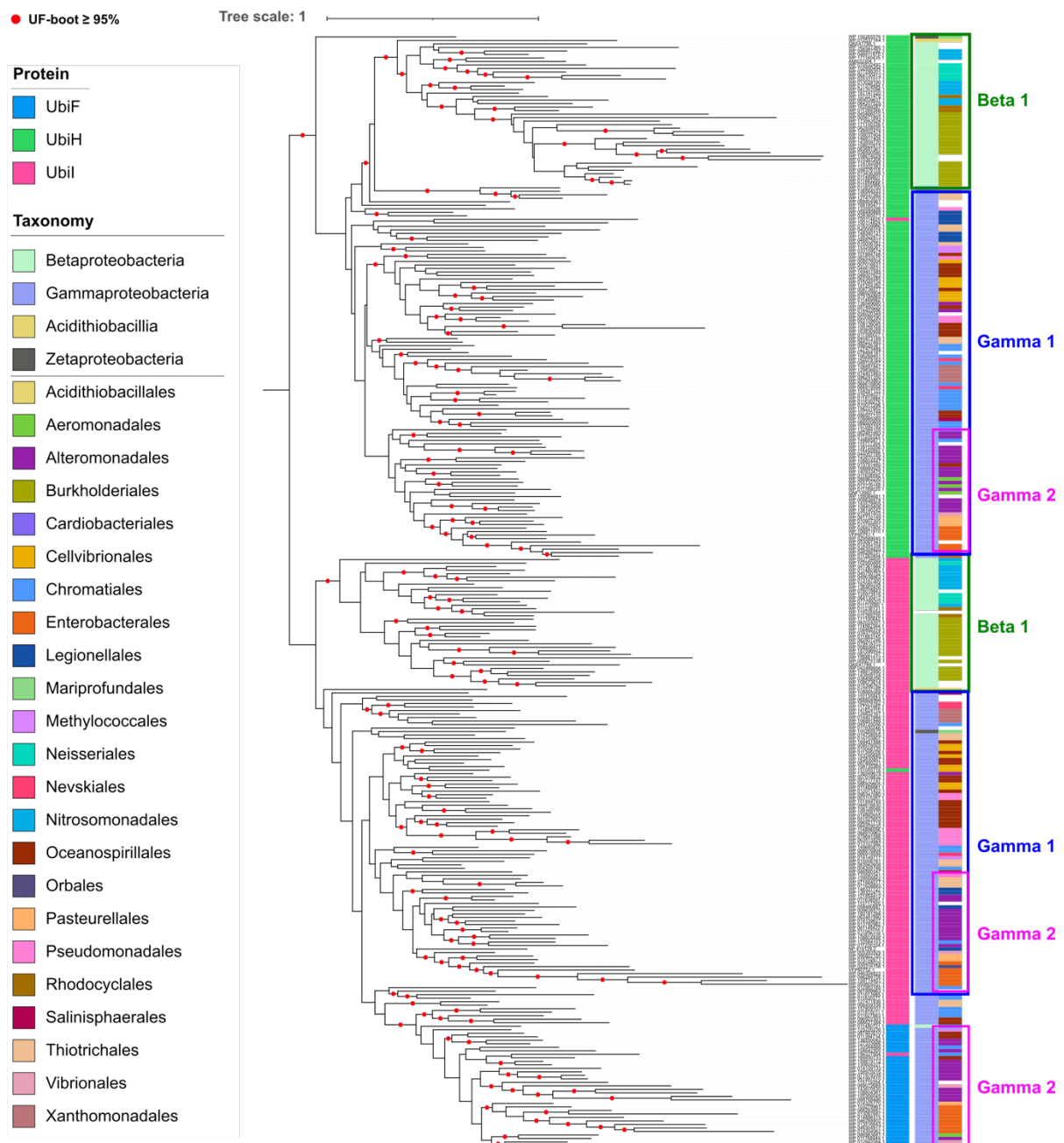


Figure S6. Phylogenetic tree of UbiF, UbiH, and Ubil. Legend is as used for tree in main text, with from left to right, protein names and taxonomy (classes and orders) in the three columns on the right of the tree. The red colored rectangles highlight examples of patterns of taxonomic groups and subtrees repeating over the tree, as a sign for two duplication events. Beta1 and Gamma 1 will repeat as the result of the duplication giving rise to UbiH and Ubil. Gamma 2 is repeated three times as the result of the above-mentioned duplication, plus the one giving rise to UbiF. Tree scale is expressed in substitutions per site.

Supplementary Tables

Table S3. List of previously experimentally tested UQ-Hydroxylases

| UQ-Hydroxylase | Organism | Order | Protein ID | Genome ID | Ref. |
|----------------|---|---------------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| Coq7 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> strain 8004 | Xanthomonadales | WP_011035727.1 | GCA_000012105.1 | (Zhou et al. 2019) |
| UbiH | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 | Enterobacterales | NP_417383.1 | GCA_000005845.2 | (Kwon et al. 2000) |
| UbiI | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 | Enterobacterales | NP_417382.1 | GCA_000005845.2 | (Kwon et al. 2000) |
| UbiF | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 | Enterobacterales | NP_415195.1 | GCA_000005845.2 | (Kwon et al. 2000) |
| Coq7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18 | Pseudomonadales | YP_005973227.1 | GCF_000226155.1 | (Jiang et al. 2019) |
| Coq7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | Pseudomonadales | WP_003085224.1 | GCA_013001005.1 | (Stenmark et al. 2001) |
| Coq7 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270 | Acidithiobacillales | WP_009567146.1 | GCA_000021485.1 | (Stenmark et al. 2001) |
| Coq7 | <i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170 | Rhodospirillales | WP_011391245.1 | GCA_000013085.1 | (Pelosi et al. 2016) |
| UbiL | <i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170 | Rhodospirillales | WP_011391454.1 | GCA_000013085.1 | (Pelosi et al. 2016) |
| UbiM | <i>Neisseria meningitidis</i> FAM18 | Neisseriales | WP_002220268.1 | GCF_000009465.1 | (Pelosi et al. 2016) |
| UbiI | <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> U112 | Thiotrichales | ABK90117.1 | GCF_000014645.1 | (Kazemzadeh et al. 2021) |
| Coq7 | <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> U112 | Thiotrichales | ABK90032.1 | GCF_000014645.1 | (Kazemzadeh et al. 2021) |

Table S4. Table of genetic backgrounds and measurable products.

| | with empty plasmid | with plasmid expressing the hydroxylase to be tested | |
|----------------|------------------------------|--|---------------------------------|
| Strain | Quinone content | Quinone measured | Inferred hydroxylation activity |
| <i>Δubil</i> | ~20% UQ ₈ (vs WT) | UQ ₈ | C5 |
| <i>ΔubiH</i> | OPP | UQ ₈ | C1 |
| <i>ΔubiF</i> | DMQ ₈ | UQ ₈ | C6 |
| <i>ΔubiIF</i> | 4-HP ₈ | DMQ ₈ | C5 |
| | | UQ ₈ | C5+C6 |
| <i>ΔubiHF</i> | OPP | DMQ ₈ | C1 |
| | | UQ ₈ | C1+C6 |
| <i>ΔubiIHF</i> | OPP | DMQ ₈ | C5+C6 |
| | | UQ ₈ | C1+C5+C6 |

See Figure 1 for the position of the molecules in the UQ biosynthetic pathway.

Abbreviations: WT: Wild-Type, UQ₈ : ubiquinone 8, OPP : octaprenylphenol, DMQ₈ : demethoxy-ubiquinone 8, 4-HP₈ : 4-hydroxy-octaprenylphenol

Table S6. Comparison of tested UQ-hydroxylases' sequences between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 (this study) and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004 (Zhou et al. 2019). *X.c.*: *Xanthomonas campestris* ; aa: amino acids.

| Protein name | Sequence ID in <i>X.c.</i> str. 8004 (Zhou et al. 2019) | Sequence ID in <i>X.c.</i> ATCC 33913 (this study) | % Identity (NCBI blast) | Remark |
|---------------------|--|---|--------------------------------|-----------------|
| Coq7 | WP_011035727.1 | WP_011035727.1 | 100% | |
| UbiH | WP_029629035.1 | WP_011036034.1 | 99.25% | 3 aa difference |
| UbiI | WP_011036035.1 | WP_011036035.1 | 100% | |
| UbiM | WP_011269621.1 | WP_011037777.1 | 99.74% | 1 aa difference |

Table S7. List of bacterial strains used in this study

| Strain | Relevant genotype | Construction | Source |
|----------------------------|--------------------------------|--|----------------------------|
| MG1655 | Parental strain | | Laboratory stock |
| $\Delta ubiI$ | $\Delta ubiI::kan$ | MG1655+P1/JW2874, LB Kan ^s | (Hajj Chehade et al. 2013) |
| $\Delta ubiH$ | $\Delta ubiH::kan$ | MG1655+P1/JW2875, LB Kan ^s | (Hajj Chehade et al. 2013) |
| $\Delta ubiF$ | $\Delta ubiF::kan$ | MG1655+P1/JW0659, LB Kan ^s | (Hajj Chehade et al. 2013) |
| $\Delta ubiIc$ | $\Delta ubiI$ | $\Delta ubiI$ cured with pCP20, clone Kan ^s | (Pelosi et al. 2016) |
| $\Delta ubiHc$ | $\Delta ubiH$ | $\Delta ubiH$ cured with pCP20, clone Kan ^s | (Pelosi et al. 2016) |
| $\Delta ubiFc$ | $\Delta ubiF$ | $\Delta ubiF$ cured with pCP20, clone Kan ^s | (Pelosi et al. 2016) |
| $\Delta ubiI\Delta ubiF$ | $\Delta ubiI\Delta ubiF::kan$ | MG1655 $\Delta ubiIc$ +P1/ <i>ubiF</i> , LB Kan ^s | (Hajj Chehade et al. 2013) |
| $\Delta ubiHI$ | $\Delta ubiHI::cat$ | MG1655+P1/ <i>ubiHI</i> , LB Cm ^s | (Pelosi et al. 2016) |
| $\Delta ubiF\Delta ubiHI$ | $\Delta ubiF\Delta ubiHI::cat$ | MG1655 $\Delta ubiF$ +P1/ <i>ubiHI</i> , LB Cm ^s | (Pelosi et al. 2016) |
| $\Delta ubiFc\Delta ubiHc$ | $\Delta ubiF\Delta ubiHI$ | $\Delta ubiHI \Delta ubiF$ cured with pCP20, clone Cm ^s | (Arias-Cartin et al. 2023) |
| $\Delta ubiH\Delta ubiF$ | $\Delta ubiH\Delta ubiF::kan$ | MG1655 $\Delta ubiHc$ +P1/ <i>ubiF</i> , LB Kan ^s | this study |

Table S9. List of oligonucleotide primers used in this study

| | Name | Tm° C | Sequence ^a | purpose |
|-----------|-----------------|----------|--|--|
| | | | | pBAD33i construction |
| Pair 1 | CAT ss NCO 5 | 72,7 | GCGTATAATATTTGCCCAT TGT GAAAACGG | Elimination of NcoI restriction site within <i>cat</i> gene (converting Thr172 codon from ACC into ACA) |
| | CAT ss NCO 3 | 72,7 | CCGTTTTTC ACA ATGGGCAAATATTATACGC | |
| Pair 2 | CAT BeaG 5 | 72,1 | GGCGTTTAAGGGC <u>ACCAATA</u> ACTGC | Addition of BeaGI5 and Bpu10I in 5' and 3' of <i>cat</i> gene respectively for further cloning in pBAD33 plasmid |
| | CAT Bpu10I 3 | 69,3 | GATTTTCAGGAG <u>GCTAAGGA</u> AGCTAAAATGG | |

^a Restriction sites are underlined.

All primers are listed from 5' to 3' extremities.

REFERENCES

- Arias-Cartin R, Kazemzadeh Ferizhendi K, Séchet E, Pelosi L, Loeuillet C, Pierrel F, Barras F, Bouveret E. 2023. Role of the *Escherichia coli* ubiquinone-synthesizing UbiUVT pathway in adaptation to changing respiratory conditions. Ribbe MW, editor. *mBio* 14:e03298-22.
- 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.
- Eddy SR. 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7:e1002195.
- Hajj Chehade M, Loiseau L, Lombard M, Pecqueur L, Ismail A, Smadja M, Golinelli-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.
- Jiang H-X, Wang J, Zhou L, Jin Z-J, Cao X-Q, Liu H, Chen H-F, He Y-W. 2019. Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide Shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46:1025–1038.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*
- Kazemzadeh K, Hajj Chehade M, Hourdoir G, Brunet CD, Caspar Y, Loiseau L, Barras F, Pierrel F, Pelosi L. 2021. The Biosynthetic Pathway of Ubiquinone Contributes to Pathogenicity of *Francisella novicida*. Galperin MY, editor. *J Bacteriol* 203:e00400-21.
- Kwon O, Kotsakis A, Meganathan R. 2000. Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the ubiF gene. *FEMS Microbiology Letters* 186:157–161.
- Mascotti ML, Juri Ayub M, Furnham N, Thornton JM, Laskowski RA. 2016. Chopping and Changing: the Evolution of the Flavin-dependent Monooxygenases. *J Mol Biol* 428:3131–3146.
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. 2020. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol* 37:1530–1534.
- Munoz-Gomez SA, Hess S, Burger G, Lang BF, Susko E, Slamovits CH, Roger AJ. 2019. An updated phylogeny of the Alphaproteobacteria reveals that the parasitic Rickettsiales and Holosporales have independent origins. *Elife* 8.
- 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.
- Pelosi L, Vo CD, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Gousse M, Chenal C, Touati N, et al. 2019. Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway. *MBio* 10.
- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. 2017. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 27:R1177–R1192.
- Stenmark P, Grünler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA. 2001. A New Member of the Family of Di-iron Carboxylate Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276:33297–33300.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191.

Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, Nordberg EK, Snyder EE, Shallom JM, Dickerman AW. 2010. Phylogeny of Gammaproteobacteria. *J. Bacteriol.* 192:2305–2314.

Williams KP, Kelly DP. 2013. Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2901–2906.

Zhou L, Li M, Wang X-Y, Liu H, Sun S, Chen H, Poplawsky A, He Y-W. 2019. Biosynthesis of Coenzyme Q in the Phytopathogen *Xanthomonas campestris* via a Yeast-Like Pathway. *MPMI* 32:217–226.

I.2. Voie de biosynthèse de l'ubiquinone contribue à la pathogénicité de *Francisella novicida*

Francisella tularensis est une bactérie gram négative pathogène responsable d'une maladie appelée tularémie chez un grand nombre de mammifères y compris l'Homme. En raison de son extrême pathogénicité et de sa capacité à infecter son hôte par inhalation, cette bactérie a été classée comme une potentielle arme biologique (Kingry and Petersen, 2014). Il existe trois espèces de *Francisella* : *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*. L'espèce *F. tularensis* est composée de trois sous-espèces *F. tularensis* sous-esp. *tularensis*, *F. tularensis* sous-esp. *holarctica* et enfin *F. tularensis* sous-esp. *mediasiatica*. Les deux sous-esp. *tularensis* et *holarctica* sont les plus virulentes et sont principalement responsables de la tularémie chez l'Homme (Sjostedt, 2007; Ireland *et al.*, 2019). Devant la dangerosité de ces deux sous-esp., nous avons utilisé *F. novicida* dans le cadre de notre projet. Cette dernière est un pathogène opportuniste causant la tularémie uniquement chez des individus immunodéprimés. De plus, le génome de *F. novicida* possède 97% d'identité de séquence avec celui de *F. tularensis* (Kingry and Petersen, 2014). *F. tularensis* et *F. novicida* sont résistantes à l'ampicilline et à d'autres dérivés de pénicilline. Par conséquent, ces antibiotiques ne peuvent pas être utilisés pour traiter la tularémie (Zogaj and Klose, 2011). D'autres antibiotiques, tels que la streptomycine, la gentamycine, la tétracycline et le chloramphénicol sont efficaces pour traiter la tularémie. Cependant, il a été montré un risque de rechute suite à l'utilisation de ces derniers antibiotiques allant de 6 à 21% patients. D'autre part, certains de ces antibiotiques sont très toxiques pour l'Homme, ce qui limite leur utilisation. Enfin, il n'existe pas de vaccin approprié contre la tularémie. Ainsi, il s'avère important de développer dans les années à venir de nouveaux traitements appropriés et/ou des méthodes préventives (Oyston, Sjostedt and Titball, 2004; Ireland *et al.*, 2019)

Toutes les espèces de *Francisella* sont aérobies strictes et l'UQ a été identifié chez ces dernières (Hollis *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 2010). Cependant, la voie de biosynthèse de l'UQ chez ces bactéries n'a jamais été étudiée tout comme sa contribution dans la pathogénicité. Elle pourrait en effet être une cible potentielle thérapeutique dans l'avenir. Dans l'étude qui suit, Nous avons tout d'abord démontré que l'UQ₈ est la seule quinone isoprénoïde de *F. novicida* pour respirer. Ensuite, par homologie de séquences, nous avons identifié les protéines Ubi impliquées dans la voie de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida*. Cette dernière se distingue de celle bien connue d'*E. coli* par la présence d'une protéine Coq7 qui est l'homologue fonctionnelle d'UbiF et de l'absence des protéines UbiX et UbiD impliquées dans l'étape de décarboxylation. Par la suite, la fonction des protéines identifiées chez *F. novicida* a été

biochimiquement validée par complémentation hétérologue dans les mutants d'*E. coli* délétés pour les gènes d'intérêt. Ainsi, mise à part les protéines UbiH_{F.n.} and UbiJ_{F.n.}, les autres protéines identifiées chez *F. novicida* restaurent chez *E. coli* la biosynthèse de l'UQ. Ensuite, nous avons montré que l'inactivation génétique ou chimique de la voie de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida* entraînait un défaut de croissance de cette bactérie en milieu respiratoire. Enfin, les résultats obtenus à l'aide du modèle alternatif animal, *Galleria mellonella*, suggère fortement que la voie de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida* contribue à sa pathogénicité.

Résultats complémentaires

Quelques mois après la publication de cet article, nous nous sommes rendu compte d'un problème avec la souche mutante d'*E. coli* $\Delta ubiJ$ utilisée dans nos expériences. En effet, en comparant la nôtre avec celle de collaborateurs à l'Institut Pasteur (Groupe de Frédéric Barras), nous nous sommes aperçus que la biosynthèse d'UQ₈ dans la souche grenobloise était beaucoup moins bien restaurée en présence d'un plasmide exprimant le gène *ubiJ* endogène que dans la souche pasteurienne qui présente un contenu en UQ₈ similaire à celui de la souche sauvage (Figure ci-dessous). De plus, contrairement aux résultats présentés dans l'article, l'expression du gène *ubiJ_{F.n.}* dans la souche pasteurienne rétablit la biosynthèse de l'UQ₈ (Figure ci-dessous), ce qui valide la fonction de ce gène.

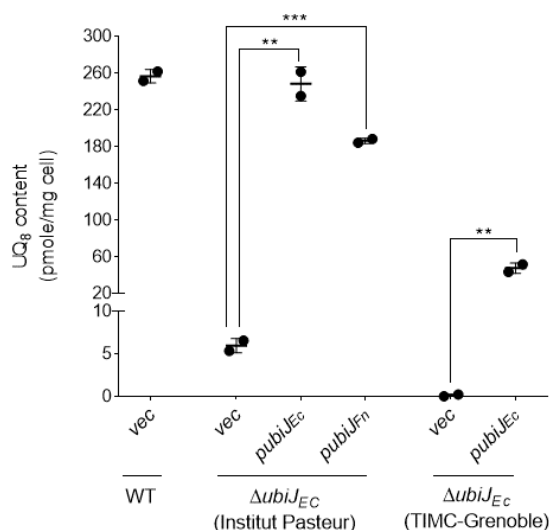




Figure non publiée. Complémentation de la souche mutante d'*E. Coli* $\Delta ubiJ$ par UbiJ de *Francisella novicida*. La souche $\Delta ubiJ$ d'*E. coli* a été transformée avec pTrc99a (vec) ou pTrc99a portant les gènes *ubiJ_{Fn}* ou *ubiJ_{Ec}*. Les souches transformées ont été cultivées dans du milieu LB sur la nuit à 37°C. L'expression des protéines UbiJ a été induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 100 μ M. La souche WT transformée avec le vecteur pTrc99a vide a été utilisée comme contrôle. Les quantifications sont exprimées en picomoles par milligramme de cellules (n = 2). **, P < 0.01 ; ***, P < 0.001 (par t test de Student non apparié).

Mes contributions

Toutes les expériences de ce projet ont été effectuées dans notre laboratoire à Grenoble. Ces dernières ont été réalisées par mon directeur de thèse, Pr. Ludovic Pelosi et moi-même (clonages des gènes, dosages des quinones, courbes de croissances, *etc.*). Je me suis également familiarisée avec le modèle *Galleria mellonella* grâce aux conseils avisés du Dr. Camille Dorothée Brunet (Institut de Biologie et Pathologie à Grenoble) et j'ai personnellement réalisé et supervisé les expériences visant à démontrer l'importance de l'UQ dans la pathogénicité de *F. novicida*.



The Biosynthetic Pathway of Ubiquinone Contributes to Pathogenicity of *Francisella novicida*

Katayoun Kazemzadeh,^a Mahmoud Hajj Chehade,^a Gautier Hourdoir,^a Camille Dorothée Brunet,^a Yvan Caspar,^{b,c} Laurent Loiseau,^d
 Frederic Barras,^{e,f}  Fabien Pierrel,^a  Ludovic Pelosi^a

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

^bLaboratoire de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, Centre National de Référence des Francisella, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble, France

^cUniversité Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, Grenoble, France

^dAix Marseille Université, CNRS, Laboratoire Chimie Bactérienne, Institut Microbiologie de la Méditerranée, Marseille, France

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

^fIMM-UMR 2001 CNRS-Institut Pasteur, Paris, France

ABSTRACT *Francisella tularensis* is the causative agent of tularemia. Because of its extreme infectivity and high mortality rate, this pathogen was classified as a biothreat agent. *Francisella* spp. are strict aerobes, and ubiquinone (UQ) has been previously identified in these bacteria. While the UQ biosynthetic pathways were extensively studied in *Escherichia coli*, allowing the identification of 15 Ubi proteins to date, little is known about *Francisella* spp. In this study, and using *Francisella novicida* as a surrogate organism, we first identified ubiquinone 8 (UQ₈) as the major quinone found in the membranes of this bacterium. Next, we characterized the UQ biosynthetic pathway in *F. novicida* using a combination of bioinformatics, genetics, and biochemical approaches. Our analysis disclosed the presence in *Francisella* of 10 putative Ubi proteins, and we confirmed 8 of them by heterologous complementation in *E. coli*. The UQ biosynthetic pathways from *F. novicida* and *E. coli* share similar patterns. However, differences were highlighted: the decarboxylase remains unidentified in *Francisella* spp., and homologs of the Ubi proteins involved in the O₂-independent UQ pathway are not present. This is in agreement with the strictly aerobic niche of this bacterium. Next, via two approaches, i.e., the use of an inhibitor (3-amino-4-hydroxybenzoic acid) and a transposon mutant, both of which strongly impair the synthesis of UQ, we demonstrated that UQ is essential for the growth of *F. novicida* in respiratory medium and contributes to its pathogenicity in *Galleria mellonella* used as an alternative animal model.

IMPORTANCE *Francisella tularensis* is the causative bacterium of tularemia and is classified as a biothreat agent. Using multidisciplinary approaches, we investigated the ubiquinone (UQ) biosynthetic pathway that operates in *F. novicida* used as a surrogate. We show that UQ₈ is the major quinone identified in the membranes of *Francisella novicida*. We identified a new competitive inhibitor that strongly decreased the biosynthesis of UQ. Our demonstration of the crucial roles of UQ for the respiratory metabolism of *F. novicida* and for the involvement in its pathogenicity in the *Galleria mellonella* model should stimulate the search for selective inhibitors of bacterial UQ biosynthesis.

KEYWORDS ubiquinone biosynthesis, coenzyme Q, quinone, aerobic respiration, *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*

Francisella tularensis is a Gram-negative, strictly aerobic, facultative intracellular pathogen responsible for tularemia. Infection can occur by inhalation, ingestion, transmission from arthropod vectors, or exposure to infected animals (1). After its entry into macrophages, the bacteria are sequestered into phagosomes and prevent further

Citation Kazemzadeh K, Hajj Chehade M, Hourdoir G, Brunet CD, Caspar Y, Loiseau L, Barras F, Pierrel F, Pelosi L. 2021. The biosynthetic pathway of ubiquinone contributes to pathogenicity of *Francisella novicida*. *J Bacteriol* 203:e00400-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00400-21>.

Editor Michael Y. Galperin, NCBI, NLM, National Institutes of Health

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Ludovic Pelosi, ludovic.pelosi@univ-grenoble-alpes.fr.

Received 31 July 2021

Accepted 16 September 2021

Accepted manuscript posted online 20 September 2021

Published 5 November 2021

endosomal maturation. *Francisella* cells then disrupt the phagosome and are released into the cytosol, in which they rapidly proliferate (2). Eventually, the infected cells undergo apoptosis or pyroptosis, and the progeny bacteria are released to initiate new rounds of infection (2). Currently, there is no suitable vaccine against tularemia, and due to its extreme infectivity and high virulence, the species *F. tularensis* has been classified as a biothreat agent (3). The genus *Francisella* includes three species: *F. tularensis*, *F. novicida*, and *F. philomiragia* (4). Moreover, *F. tularensis* is further divided into *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A strains) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B strains), which are the most virulent strains responsible for human disease, whereas *F. philomiragia* and *F. novicida* are avirulent in healthy humans (4). *F. novicida* type strain U112 is commonly used as a surrogate for *Francisella tularensis* in virulence studies using animal models (5).

The development of genome-scale genetic methods allowed the identification of hundreds of genes participating to various extents in *Francisella* virulence (6). However, the specific contribution of only a limited number of these genes was demonstrated at the molecular level. Although an important proportion of the identified genes are related to metabolic functions, the relationship between metabolism and the life cycle of *Francisella* is still poorly understood. However, global analysis of genes essential for the growth in culture of *F. novicida* U112 (7) and, more recently, that of *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (8) highlighted the involvement of several ubiquitous pathways found in proteobacteria. Among the most significant are the folate pathway, the heme synthesis pathway, the methylerythritol phosphate pathway involved in isoprenoid synthesis, the chorismate pathway, and the ubiquinone (UQ) synthesis pathway, on which this work is focused.

Isoprenoid quinones are conserved in most respiratory and photosynthetic organisms and function primarily as electron and proton carriers in the electron transfer chains. Quinones are composed of a polar redox-active head group linked to a lipid side chain, which varies in both length and the degree of saturation (9). Proteobacteria contain two main types of quinone, i.e., benzoquinones and naphthoquinones, represented by UQ (or coenzyme Q) and menaquinone (MK)/demethylmenaquinone (DMK), respectively (9). UQ is the major electron carrier used for the reduction of dioxygen by various cytochrome oxidases, whereas MK and DMK function predominantly in anaerobic respiratory chains (9). However, as demonstrated recently in *Pseudomonas aeruginosa*, UQ can also be produced and used as a main respiratory quinone under anaerobic conditions (10). Besides its role in bioenergetics, UQ was also reported to be involved in gene regulation, oxidative stress, virulence, and resistance to antibiotics (11, 12). More recently, new functions for UQ in bacteria were discovered, such as its requirement for *Escherichia coli* to grow on medium containing long-chain fatty acids as a carbon source (13). UQ biosynthesis under aerobic conditions has been widely studied in *E. coli* (14). The classical UQ biosynthetic pathway requires 12 proteins (UbiA to UbiK and UbiX). UbiC catalyzes the first committed step in the biosynthesis of UQ, the conversion of chorismate to the 4-hydroxybenzoate (4HB) precursor. Next, UbiA, UbiD to UbiI, and UbiX catalyze the prenylation, decarboxylation, hydroxylations, and methylations of the phenyl ring of 4HB to synthesize UQ. In addition, UbiB and UbiK are accessory proteins, while UbiJ is involved in the assembly and/or the stability of the aerobic Ubi complex, which was recently characterized in *E. coli* (15). The latter is also able to synthesize UQ under anoxic conditions, and we identified three proteins, UbiU, UbiV, and UbiT, that are required for UQ biosynthesis only under anoxic conditions (16).

Here, we show that ubiquinone 8 (UQ₈) is the major quinone of *F. novicida* U112. We identified candidate Ubi proteins in *F. novicida* U112 and validated their functions by heterologous complementation in *E. coli* mutant strains. Our results show that UQ biosynthesis in *Francisella* spp. is mostly similar to that of *E. coli*, with the notable absence of UbiX and UbiD for the decarboxylation step. Genetic and chemical inactivation of UQ biosynthesis thanks to a transposon (Tn) mutant and a new inhibitor (3-amino-4-hydroxybenzoic acid), respectively, demonstrated that UQ₈ is crucial for the growth of *F. novicida* in

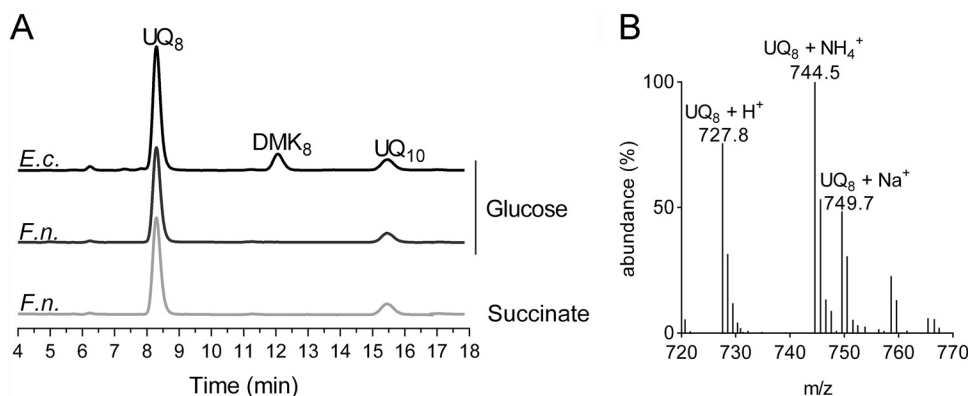


FIG 1 UQ₈ is the major quinone used by *F. novicida*. (A) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg of *E. coli* MG1655 (*E.c.*) and *F. novicida* (*F.n.*) cells grown aerobically in Chamberlain medium with 0.4% (wt/vol) glucose or succinate as the sole carbon source. The chromatograms are representative of results from three independent experiments. The peaks corresponding to UQ₈, DMK₈, and the UQ₁₀ standard are indicated. (B) Mass spectrum of the quinone eluting at 8.30 min from extracts of *F. novicida* grown in Chamberlain medium. H⁺, NH₄⁺, and Na⁺ adducts of UQ₈ are indicated.

respiratory medium and that UQ deficiency impairs the pathogenicity of *F. novicida* against *Galleria mellonella*. Altogether, our results shed light on the role of UQ in the life cycle of *Francisella* and show that UQ contributes to its pathogenicity.

RESULTS

UQ₈ is the major quinone of *F. novicida*. The quinone content of *F. novicida* grown under ambient air at 37°C in Chamberlain medium supplemented with either glucose (fermentative medium) or succinate (respiratory medium) as the only carbon source was determined and compared with that of *E. coli* MG1655 grown in the same fermentative medium. In the electrochromatograms of lipid extracts from *F. novicida*, a single peak was observed at around 8.3 min, the same retention time as that of UQ₈ in *E. coli* extracts (Fig. 1A). Note that in these analyses, UQ₁₀ was used as an internal standard, which was added to the samples. Mass spectrometry (MS) analysis of the major peak in *F. novicida* extracts showed a predominant ammonium adduct (M⁺ NH₄⁺) at *m/z* 744.5, together with minor adducts, such as Na⁺ (*m/z* 749.7) and H⁺ (*m/z* 727.8) (Fig. 1B). These masses identify UQ₈ (monoisotopic mass, 726.5) as the major quinone produced by *F. novicida*. Interestingly, the carbon source in the culture medium did not greatly affect the UQ₈ content (Fig. 1A). The *F. novicida* extracts did not contain any naphthoquinones, unlike *E. coli*, which showed predominantly demethylmenaquinone (DMK₈) eluting at around 12 min. The absence of detectable levels of naphthoquinones in *F. novicida* lipid extracts (Fig. 1A) is in agreement with the absence of menaquinone biosynthesis (Men or futasoline)-encoding genes in its genome. Together, our results establish that *E. coli* and *F. novicida* share UQ₈ as a main quinone under aerobic conditions.

Identification of Ubi proteins in *Francisella* spp. To identify candidate Ubi proteins in *F. novicida*, UbiX and UbiA to UbiK from *E. coli* MG1655 were screened for homologs in the protein sequence data set, available at MicroScope (www.genoscope.cns.fr/agc/microscope), using BLASTP software. As listed in Table S1 in the supplemental material, this analysis identified eight homologous proteins in *F. novicida*, i.e., UbiA to UbiC, UbiE, UbiG to UbiI, and UbiK, called UbiA_{F_n} to UbiC_{F_n}, UbiE_{F_n}, UbiG_{F_n} to UbiI_{F_n}, and UbiK_{F_n}, respectively, here. Genes *ubiA_{F_n}* and *ubiC_{F_n}* on the one hand and genes *ubiI_{F_n}* and *ubiH_{F_n}* on the other hand present organizations similar to those of the *ubiC-ubiA* and *ubiH-ubiI* operons from *E. coli*, respectively (12). As reported previously for *Pseudomonas aeruginosa* (17) and *Xanthomonas campestris* (18), *F. novicida* possesses a Coq7 hydroxylase, which is a functional homolog of the UbiF protein found in *E. coli* and other species (19). The detection of a homolog for *E. coli* UbiJ required less restrictive BLAST parameters.

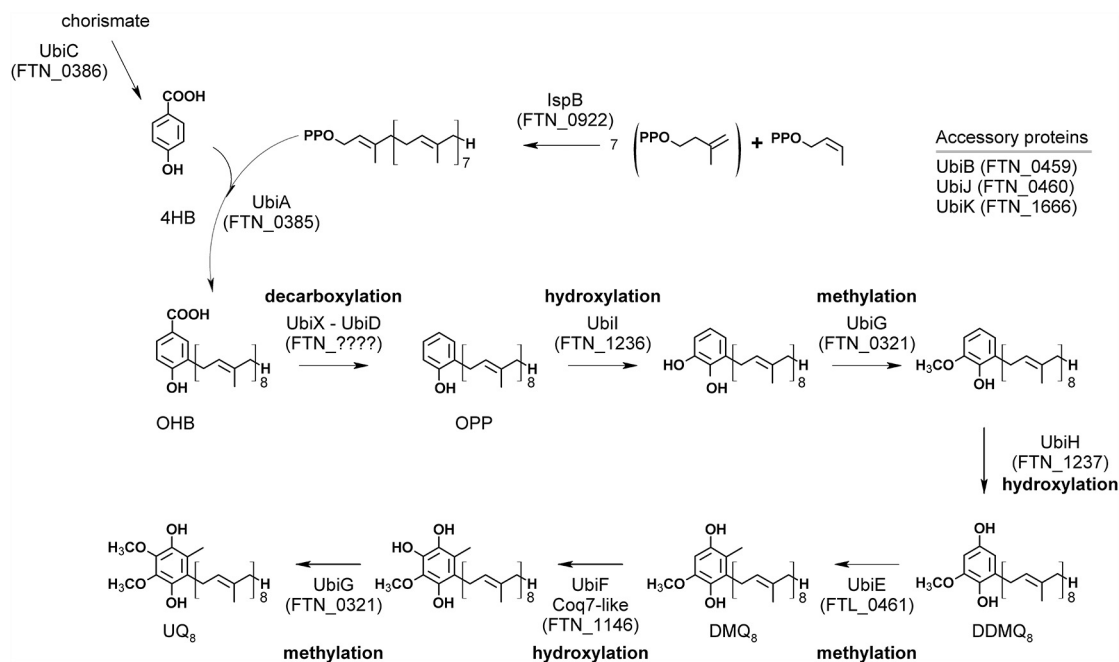


FIG 2 Proposed UQ₈ biosynthetic pathway in *F. novicida* deduced from the one characterized in *E. coli*. The corresponding protein identifiers in *F. novicida* are indicated in parentheses. There are no identified counterparts of UbiD and UbiX in the *F. novicida* proteome. UbiF is identified only in *E. coli*, and its functional homolog in *F. novicida* is a Coq7 hydroxylase. Abbreviations: 4HB, 4-hydroxybenzoic acid; OHP, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid; OPP, octaprenylphenol; DMQ₈, C₆-demethoxy-ubiquinone 8; DDMQ₈, C₁-demethyl-C₆-demethoxy-ubiquinone 8; UQ₈, ubiquinone 8.

We noticed that the gene coding for the putative UbiJ candidate FTN_0460, called *ubiJ_{Fn}* here, lies between *ubiE_{Fn}* and *ubiB_{Fn}*, an organization similar to that of the *ubiE-ubiJ-ubiB* operon from *E. coli* (20). *UbiJ_{Fn}* has 21% amino acid identity with UbiJ from *E. coli*, and both proteins contain a sterol carrier protein 2 domain in their N-terminal regions (<http://pfam.xfam.org/>) (21). The same Ubi proteins were identified in the highly virulent strain *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (Table S1).

Homologs of UbiD and UbiX were not yet identified, and the counterparts of these two proteins in *Francisella* spp. remain to be determined. Work is in progress in our laboratory. Under anaerobic conditions, *E. coli* still synthesizes UQ, and we recently identified three genes, which we called *ubiT*, *ubiU*, and *ubiV*, as being essential for this process (16). Homologs of *ubiT*, *ubiU*, and *ubiV*, which participate in the O₂-independent UQ biosynthetic pathway, were not identified in the screened *Francisella* genomes (Table S1), in agreement with the strictly aerobic metabolism of *Francisella* spp. Overall, these data show that the O₂-dependent UQ biosynthetic pathways in *F. novicida*, *F. tularensis*, and *E. coli* are related, with the major difference being the absence of UbiX-UbiD for the decarboxylation step (Fig. 2).

Functional characterization of Ubi_{Fn} proteins in *E. coli*. To test whether the candidate Ubi proteins identified in *F. novicida* were indeed involved in UQ biosynthesis, we assessed their capacity to functionally complement *E. coli* strains in which the UQ protein-encoding genes were inactivated ($\Delta ubiA$, $\Delta ubiB$, $\Delta ubiC$, $\Delta ubiE$, $\Delta ubiF$, $\Delta ubiG$, $\Delta ubiH$, $\Delta ubiI$, and $\Delta ubiK$) (Table S2). We assessed the quinone content and the capacity to grow on solid minimal medium containing fermentable (glucose) or respiratory (succinate) carbon sources. *E. coli* $\Delta ubiA$, $\Delta ubiB$, $\Delta ubiG$, $\Delta ubiH$, and $\Delta ubiI$ transformed with an empty vector are unable to synthesize UQ₈ (Fig. 3A) and are thus unable to grow on respiratory medium (Fig. 3C). In contrast, their growth on fermentative medium is not affected (Fig. 3C). Except for the $\Delta ubiA$ mutant strain, in which the prenylation reaction of 4HB is impaired, most mutants accumulate an early intermediate corresponding to octaprenylphenol (OPP) (Fig. 2 and Fig. 3A). *E. coli* $\Delta ubiE$ and

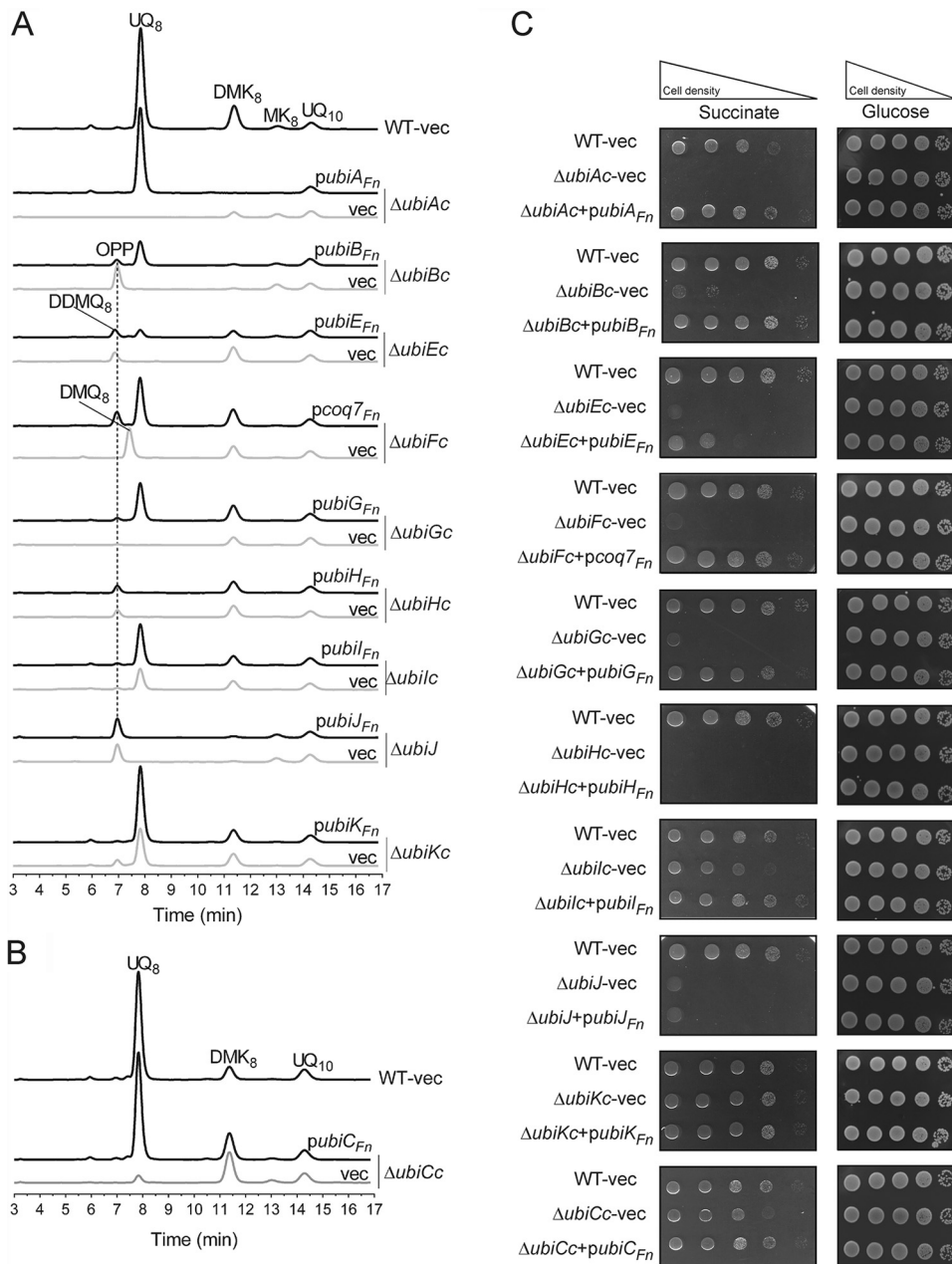


FIG 3 Complementation analysis of *E. coli* UQ₈ biosynthesis mutants with the putative Ubi proteins from *F. novicida*. (A and B) The Δ *ubi* *E. coli* mutant strains transformed with pTrc99a (vector [vec]) or pTrc99a encompassing the *ubi_{Fn}* genes were grown overnight at 37°C in LB medium (A) or M9 minimal medium (B) with 0.4% (wt/vol) glucose as the sole carbon source. The expression of the Ubi_{Fn} proteins was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 100 μ M. *E. coli* wild-type (WT) strain MG1655 transformed with the pTrc99a empty vector was used as a control. HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg of cells was performed. The chromatograms are representative of results from three independent experiments. The peaks corresponding to OPP, DDMQ₈, DMQ₈, UQ₈, MK₈, DMK₈, and the UQ₁₀ standard are indicated. (C) Serial dilutions were spotted onto plates containing M9 minimal medium with 0.4% (wt/vol) glucose or succinate as the sole carbon source and IPTG (100 μ M final concentration). The plates were incubated overnight at 37°C.

Δ *ubiFc* cells accumulate C₂-demethyl-C₆-demethoxy-UQ₈ (DDMQ₈) and C₆-demethoxy-UQ₈ (DMQ₈), which are the substrates of UbiE and UbiF, respectively (Fig. 2 and Fig. 3A). We found that UbiA_{Fn}, UbiB_{Fn}, UbiE_{Fn}, Coq7_{Fn}, and UbiG_{Fn} restored the growth of *E. coli* Δ *ubiAc*, Δ *ubiBc*, Δ *ubiEc*, Δ *ubiFc*, and Δ *ubiGc* cells on respiratory medium (Fig. 3C) and allowed UQ₈ biosynthesis in lysogeny broth (LB) medium to 96, 26, 7, 49, and 38%

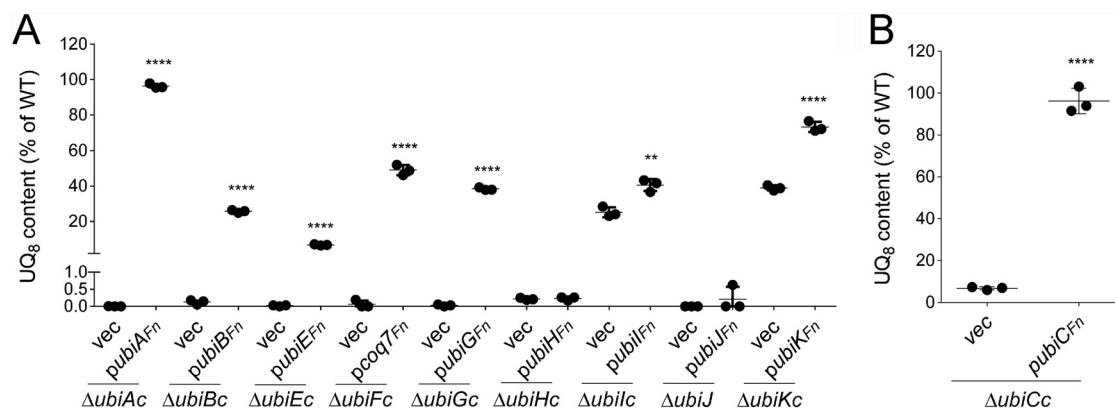


FIG 4 Quantification of cellular UQ₈ contents of Δubi *E. coli* mutant strains expressing the Ubi_{F_{nr}} proteins. The Δubi *E. coli* mutant strains transformed with pTrc99a (vec) or pTrc99a encompassing the ubi_{F_{nr}} genes were grown overnight at 37°C in LB medium (A) or M9 minimal medium (B) with 0.4% (wt/vol) glucose as the sole carbon source. Expression of the Ubi_{F_{nr}} proteins is described in the legend of Fig. 3. Quantifications are expressed as percentages of the control value, which corresponds to the UQ₈ content of the wild-type strain ($n = 3$). ****, $P < 0.0001$; **, $P < 0.005$ (by unpaired Student's *t* test).

of the level of UQ₈ present in wild-type (WT) cells, respectively (Fig. 3A and Fig. 4A). Concomitantly, the OPP content decreased, and Coq7_{F_{nr}} abolished the accumulation of DMQ₈ in $\Delta ubiFc$ cells (Fig. 3A). As we previously reported, *E. coli* $\Delta ubilc$ and $\Delta ubiKc$ cells displayed a strong decrease in UQ₈ (22, 23), but the residual UQ₈ content was sufficient to support growth on succinate (Fig. 3A and C). Similar results were obtained with $\Delta ubiCc$ cells grown in minimal M9 medium (Fig. 3B and C), which had to be used instead of LB since the latter contains 4HB that restores normal UQ₈ content in $\Delta ubiCc$ cells (data not shown). In all three strains, the expression of the corresponding Ubi proteins, UbiC_{F_{nr}}, UbiI_{F_{nr}}, and UbiK_{F_{nr}}, increased the UQ₈ content significantly (Fig. 4A and B). Since the increase obtained in $\Delta ubilc$ cells was moderate (from 25 to 40%), we further confirmed the ability of UbiI_{F_{nr}} to catalyze C₅-hydroxylation by using an *E. coli* $\Delta ubilc$ $\Delta ubiF$ strain. This deletion mutant lacks C₅- and C₆-hydroxylation activities and consequently accumulates 3-octaprenyl-4-hydroxyphenol (4HP₈) (22). We found that UbiI_{F_{nr}} was able to restore DMQ₈ biosynthesis in *E. coli* $\Delta ubilc$ $\Delta ubiF$ cells (Fig. S1), i.e., to catalyze C₅-hydroxylation, concomitantly with a strong decrease in 4HP₈. Taken together, all these results confirm unambiguously that UbiA_{F_{nr}}, UbiB_{F_{nr}}, UbiC_{F_{nr}}, Coq7_{F_{nr}}, UbiE_{F_{nr}}, UbiG_{F_{nr}}, UbiI_{F_{nr}}, and UbiK_{F_{nr}} are the functional counterparts of the *E. coli* Ubi proteins, and we propose that they compose the biosynthetic pathway of UQ₈ in *F. novicida*. Only two proteins, UbiJ_{F_{nr}} and UbiH_{F_{nr}}, did not complement *E. coli* $\Delta ubiJ$ and $\Delta ubiHc$ (Fig. 3A and C and Fig. 4A). The low percentage of identity between UbiJ and UbiH from *E. coli* and their homologs in *F. novicida* (21 and 27%, respectively) could explain these results (Table S1).

UQ₈ biosynthesis is essential for the growth of *F. novicida* in respiratory medium. To evaluate the physiological importance of UQ for *F. novicida*, we screened *ubi* genes in the *F. novicida* transposon (Tn) mutant library available at the Manoil Laboratory (7). Only the Tn mutant of *ubiC_{F_{nr}}* (called Tn-*ubiC_{F_{nr}}* here) was available in the library, and we compared this mutant strain to its isogenic control strain U112 (Table S2). Recall that UbiC catalyzes the first committed step in the biosynthesis of UQ, i.e., the conversion of chorismate to 4HB (Fig. 2). First, we showed that the growth of Tn-*ubiC_{F_{nr}}* cells under ambient air in respiratory Chamberlain medium was severely impaired compared to the WT (Fig. 5A). In contrast, the growth of *F. novicida* in fermentative medium was less affected (Fig. 5B). In parallel, the UQ₈ content was strongly lowered in Tn-*ubiC_{F_{nr}}* cells from 166 to 7 pmol/mg cells in fermentative medium and from 134 to 11 pmol/mg cells in respiratory medium (Fig. 5C). As expected, the addition of 4HB to the culture rescued the growth of Tn-*ubiC_{F_{nr}}* cells in respiratory medium and increased the UQ₈ content to WT levels (Fig. 5A and C). Taken together, these

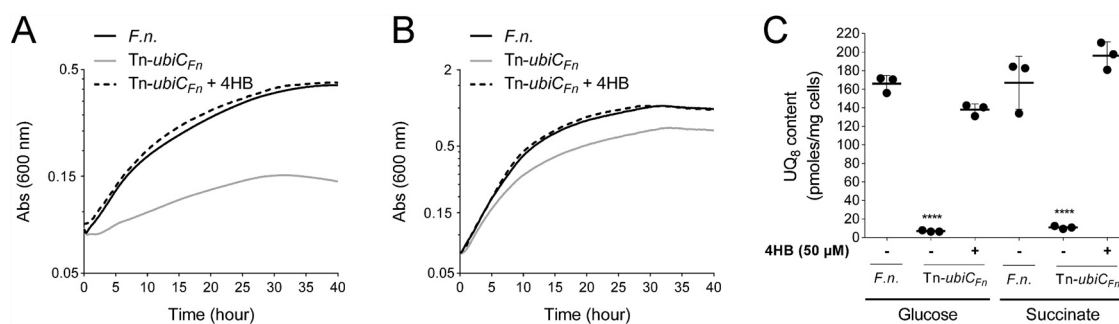


FIG 5 UQ₈ is essential for the growth of *F. novicida* in respiratory medium. (A and B) *F. novicida* (*F.n.*) and a transposon mutant of *ubiC_{Fn}* (*Tn-ubiC_{Fn}*) were grown aerobically in Chamberlain medium with 0.4% (wt/vol) succinate (A) or glucose (B) as the sole carbon source. Growth (average from sextuplicate growth curves) was monitored as the change in the absorbance at 600 nm in a Tecan plate reader. (C) Cellular UQ₈ contents were quantified for *F. novicida* and the *Tn-ubiC_{Fn}* mutant according to methods described in Materials and Methods. 4HB was added to rescue the growth and UQ₈ biosynthesis of the *Tn-ubiC_{Fn}* mutant. Quantifications are expressed as picomoles per milligram of cells ($n = 3$). ****, $P < 0.0001$ (by unpaired Student's *t* test).

results show the overall requirement of UQ₈ for the growth of *F. novicida*, especially in respiratory medium.

3A4HB inhibits UQ₈ biosynthesis and impairs the growth of *F. novicida* in respiratory medium. Besides genetic inactivation of the UQ pathway, we were interested in the possibility of decreasing UQ levels by chemical inhibition. Since we had found UQ to be particularly important for the growth of *F. novicida* in respiratory medium (Fig. 5A), we screened for compounds that could inhibit growth in such medium. We tested several compounds: 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3A4HB), 4-amino-benzoic acid (pABA), 4-amino-2-methoxy-benzoic acid (pA2MBA), and 4-amino-3-methoxy-benzoic acid (pA3MBA). All these molecules are analogs of 4HB, the native precursor of UQ (Fig. S2A). We observed that bacterial growth was slightly affected in respiratory medium in the presence of pABA and pA2MBA, while pA3MBA inhibited growth in both fermentative and respiratory media (Fig. S2B and C). Interestingly, 3A4HB strongly impaired bacterial growth in respiratory medium, while inhibition was milder in fermentative medium (Fig. S2B and C). Based on these results, we followed up on this compound.

We then examined how and to what extent 3A4HB could affect UQ₈ biosynthesis in *F. novicida*. Bacteria were cultured under ambient air in fermentative Chamberlain medium supplemented with 3A4HB (from 10 μ M to 1 mM, final concentration). The endogenous UQ₈ content was measured in bacterial cells and compared to control conditions in which only dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. Figure 6A shows that the UQ₈ content decreased with increasing concentrations of 3A4HB in the medium, with 0.5 mM yielding an \sim 90% decrease in the UQ₈ content. Concomitantly, we confirmed that the growth of *F. novicida* in the presence of 1 mM 3A4HB was strongly impaired in respiratory medium (Fig. 6B) but less so in fermentative medium (Fig. 6C). Control experiments showed that the addition of 4HB to the growth medium counteracted the negative effect of 3A4HB, in terms of both UQ₈ biosynthesis and bacterial growth (Fig. 6A to C).

Treatment with 3A4HB caused the accumulation of a redox compound that eluted at 6.5 min (compound X in Fig. 6A). MS analysis of this peak showed a predominant proton adduct ($M^+ H^+$) at m/z 682.6, together with a minor sodium adduct ($M^+ Na^+$) at m/z 704.6 (Fig. 6D). Both species are compatible with a monoisotopic mass of 681.7 $g \cdot mol^{-1}$, which could correspond to that of 2-octaprenyl-3-methyl-6-amino-1,4-benzoquinone (Fig. 6E). According to the sequence of reactions proposed in Fig. 2, the formation of compound X would result from the prenylation of 3A4HB, decarboxylation and hydroxylation at C-1, and then methylation at C-3. Thus, 3-octaprenyl-2-methyl-5-amino-1,4-benzoquinone seems to be the "dead-end" product of the UQ₈ pathway in *F. novicida* cells treated with 3A4HB. Collectively, these results demonstrate unequivocally that 3A4HB acts as a competitive inhibitor of UQ₈ biosynthesis and affects particularly the respiratory metabolism of *F. novicida*.

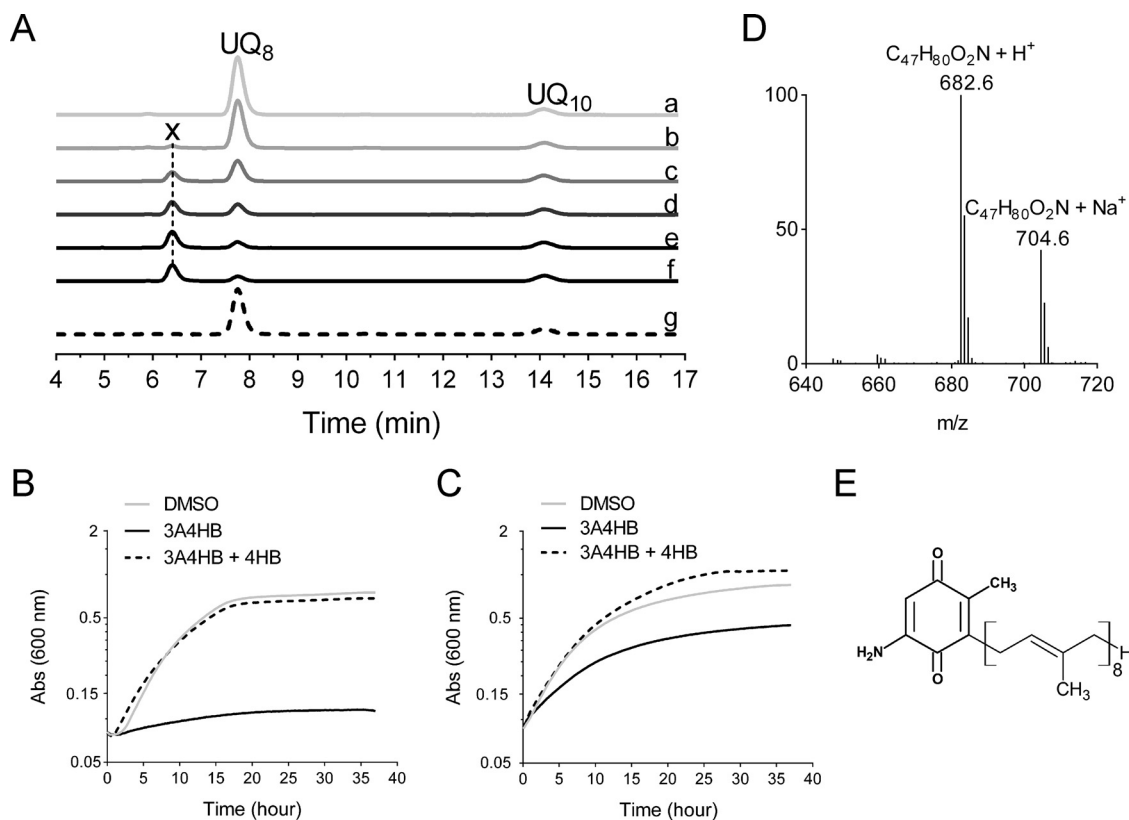


FIG 6 Effect of 3A4HB on UQ₈ biosynthesis and growth of *F. novicida*. (A) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg of *F. novicida* cells grown aerobically in Chamberlain medium with 0.4% (wt/vol) glucose as the sole carbon source and in the presence of different concentrations of 3A4HB solubilized in DMSO (a, DMSO; b, 0.01 mM; c, 0.1 mM; d, 0.25 mM; e, 0.5 mM; f, 1 mM; g, 1 mM 3A4HB plus 1 mM 4HB). The chromatograms are representative of results from three independent experiments. The peaks corresponding to UQ₈ and the UQ₁₀ standard are indicated. Compound X eluting at 6.5 min is marked. (B and C) Growth curves for *F. novicida* cultured under aerobic conditions in Chamberlain medium with 0.4% (wt/vol) succinate (B) or glucose (C) as the sole carbon source and in the presence of either DMSO (control), 1 mM 3A4HB, or 1 mM 3A4HB plus 100 μM 4HB. The growth under each condition (average from sextuplicate growth curves) was monitored as the change in the absorbance at 600 nm in a Tecan plate reader. (D) Mass spectrum of compound X eluting from extracts of *F. novicida* grown in the Chamberlain medium with 1 mM 3A4HB. H⁺ and Na⁺ adducts corresponding to this molecule are indicated. (E) Proposed structure of compound X in its oxidized form.

UQ₈ is involved in the pathogenesis of *F. novicida* in the later steps of infection.

We evaluated the importance of UQ in the pathogenicity of *F. novicida* by studying the Tn-ubiC_{F_n} mutant. To assess the overall virulence of the Tn-ubiC_{F_n} strain in a whole organism, we used the wax moth (*G. mellonella*) infection model, which was previously used in studies of human-pathogenic and closely related opportunistic and nonpathogenic *Francisella* spp. such as *F. novicida* (24–27). We monitored the survival of larvae infected with the Tn-ubiC_{F_n} strain or with the isogenic strain U112 as a control. When the larvae are turning gray/black and no movement of the larval legs can be observed, they are considered dead (Fig. 7A). The Tn-ubiC_{F_n} strain was found to be statistically much less virulent than the wild type but was nevertheless still capable of killing *Galleria* larvae (Fig. 7B). This result suggests that UQ₈ is involved in the virulence potential of *F. novicida* in *G. mellonella*. To better understand the role of UQ₈ in different stages of infection in *G. mellonella*, the pathogenicity of the isogenic control strain pretreated with 1 mM 3A4HB was studied in order to mimic acute UQ₈ deficiency. Recall that this treatment causes an ~90% decrease in the UQ₈ content (Fig. 6A), but the inhibition should be alleviated over the infection cycle in larvae where 3A4HB is not present. Pretreatment with 3A4HB has no effect on the capacity of *F. novicida* to kill *Galleria* larvae (Fig. 7C), suggesting that UQ₈ does not contribute to the virulence of *Francisella novicida* in the early steps of infection but more likely contributes in later

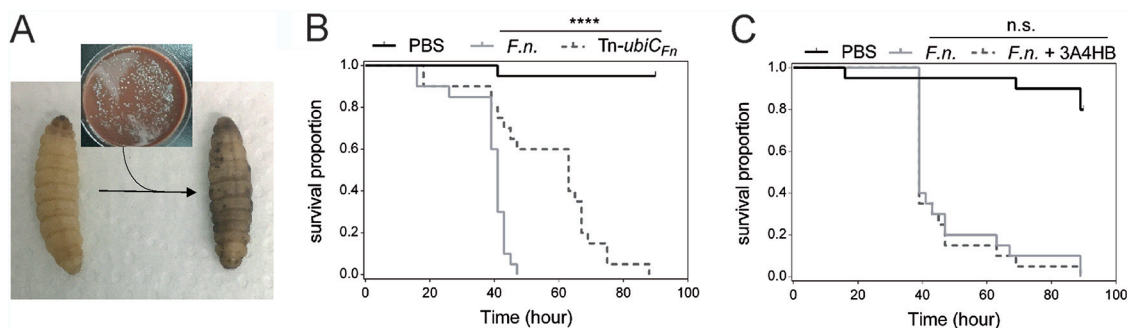


FIG 7 UQ₈ contributes to later steps of infection of *G. mellonella* by *F. novicida*. (A) The larvae turn gray/black when infected. (B) Survival curve of *G. mellonella* infected with either *F. novicida* (*F.n.*) or the transposon mutant of *ubiC_{Fn}* (*Tn-ubiC_{Fn}*). ****, $P < 0.0001$ (by a log rank [Mantel-Cox] test). (C) Survival curve of *G. mellonella* infected with *F. novicida* pretreated or not with 3A4HB (1 mM final concentration). Each group of *G. mellonella* larvae ($n = 20$) was injected with $\sim 10^6$ CFU/larva, and PBS injection was used as a control. n.s. (not significant), $P = 0.6670$ (by a log rank [Mantel-Cox] test).

ones. This result is in contrast to that obtained with the *Tn-ubiC_{Fn}* strain, which represents a chronic deficiency of UQ₈.

DISCUSSION

The chemical analysis performed in this paper established that UQ₈ is the major isoprenoid quinone synthesized by *F. novicida*. In two representative *Francisella* genomes, we identified homologs for 9 of the 12 genes that are currently known to contribute to UQ biosynthesis in *E. coli* under aerobic conditions. We confirmed the function of seven of the nine homologs by heterologous complementation of *E. coli* Δubi mutants. From these results, we show again that *E. coli* is a good model to study the function of most exogenous *ubi* genes (19). We could not confirm the function of UbiH_{Fn} and UbiJ_{Fn}, but the fact that *ubiH_{Fn}* and *ubiJ_{Fn}* show the same genetic organization as that in *E. coli* (a *ubil-ubiH* operon and a *ubiE-ubiJ-ubiB* operon) strongly supports the implication of these genes in the UQ biosynthetic pathway. Interestingly, both proteins are part of the Ubi complex in *E. coli* (15). We hypothesize that the low identity of UbiH_{Fn} and UbiJ_{Fn} with their *E. coli* homologs ($\sim 25\%$) might impair their assembly within the *E. coli* Ubi complex and thus compromise our *in vivo* complementation assays. Another possibility relates to the proposed implication in UQ biosynthesis of a noncoding RNA partially overlapping the open reading frame (ORF) of UbiJ from *E. coli* (28). We note that the expression of UbiJ from *X. campestris* was also unable to complement an *E. coli* $\Delta ubiJ$ strain (18). *Francisella* spp. share with *P. aeruginosa* and *X. campestris* a yeast Coq7 protein homolog, which catalyzes C₆-hydroxylation as for UbiF from *E. coli* (17, 18, 29). As we demonstrated previously, the Coq7 proteins are found in all three subclasses, alpha-, beta-, and gammaproteobacteria. In contrast, homologs of UbiF proteins are limited to the gammaproteobacteria (19). Our analysis also disclosed the presence in *Francisella* spp. of Ubil- and UbiH-homologous proteins, which catalyze C₅- and C₁-hydroxylation in *E. coli*, respectively (22, 30). Consequently, we propose that both *E. coli* and *Francisella* spp. share a UQ biosynthetic pathway involving three hydroxylases, i.e., Ubil, UbiH, and UbiF in *E. coli* and Ubil, UbiH, and Coq7 in *Francisella* spp. Several studies highlighted that the enzymes involved in multiple steps of the UQ biosynthetic pathway vary between bacterial species (14), like for the hydroxylation steps (19) or for the production of 4HB from chorismate by UbiC or XanB2 proteins (31). The decarboxylation step involves UbiD and UbiX in *E. coli* (32), but we could not identify homologs in *Francisella* genomes. A candidate gene, *ubiZ*, was proposed based on its colocalization with *ubiE* and *ubiB* in the genomes of *Acinetobacter* spp. and *Psychrobacter* sp. strain PRwf-1, which are also devoid of homologs of UbiD and UbiX (33). However, *ubiZ* was not confirmed functionally, and this gene is not conserved in *Francisella* genomes. We demonstrated that Ubil proteins from *F. novicida* and *E. coli* shared the same

function, i.e., the catalysis of the first hydroxylation of the OPP, which is the product of the decarboxylation step in *E. coli* (Fig. 2). Consequently, we propose that the decarboxylation step occurring in *F. novicida* also precedes the first hydroxylation of the OPP. Collectively, these data suggest the existence of another decarboxylation system operating in UQ biosynthesis in *Francisella* spp. and potentially other bacteria lacking *ubiX* and *ubiD* (34).

To assess the essentiality of the UQ biosynthetic pathway in the respiratory metabolism of *F. novicida*, two different approaches were carried out. First, we showed that a transposon mutation of the *ubiC_{Fn}* gene, which decreases 4HB synthesis, impaired the growth of *F. novicida* mainly in respiratory medium. Interestingly, among all the *ubi* genes identified in *Francisella* genomes, only *ubiC* was mutated in large-scale studies (7, 8). This supports that the other *ubi* genes are essential for the viability of *Francisella* spp. and strengthens the idea that UQ is key for the development of these bacteria. We noted that the mutation of the *ubiC* gene affects *F. novicida* more severely than *E. coli* for growth in respiratory medium despite both mutants producing comparable amounts of UQ (~7 to 8% compared to the WT) (Fig. 4B and Fig. 5C). As *E. coli* synthesizes naphthoquinones but *F. novicida* does not, we propose that the milder phenotype of the *E. coli ubiC* mutant results from naphthoquinones participating in aerobic respiration, as previously suggested (35). Second, we tested the effect of structural analogs of 4HB, and we showed that 3A4HB impaired the growth of *F. novicida* mainly in respiratory medium, in agreement with a strong decrease in UQ₈ biosynthesis. We demonstrated that 3A4HB competes with endogenous 4HB and progresses through several steps of the UQ biosynthetic pathway to form the redox compound X that we propose to be 3-octaprenyl-2-methyl-5-amino-1,4-benzoquinone. As both the Tn-*ubiC_{Fn}* strain and the control strain U112 treated with 1 mM 3A4HB yielded an ~90% decrease in the UQ₈ content and presented a strong impairment of growth in respiratory medium (Fig. 5 and 6), we propose that compound X would not be used as a quinone in the respiratory chain of *F. novicida*.

We noted that homologs of *ubiT*, *ubiU*, and *ubiV*, which belong to the O₂-independent UQ biosynthetic pathway characterized in *E. coli* and *P. aeruginosa* (10, 16), were not identified in the screened genomes of *Francisella* spp. This result is in agreement with the strictly aerobic metabolism of these bacteria. Indeed, the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the UQ-dependent electron transfer chain, leading to efficient oxidative phosphorylation, take place in *Francisella* spp. (36). A possible link between stress defense and the TCA cycle was previously suggested for *Francisella* pathogenesis (37). Unfortunately, the contribution of UQ and the electron transfer chain to virulence has not been well documented to date in *Francisella* spp. Using *G. mellonella* as an infection model at the scale of an entire organism, we demonstrated through the study of the Tn-*ubiC_{Fn}* mutant and the isogenic control strain pretreated with 3A4HB that UQ₈ contributes to the virulence of *F. novicida* and more likely in the later steps of infection, during which the bacteria undergo extensive replication (38). Such a notion supports the view that, as for other facultative intracellular bacteria, *Francisella* spp. are able to use several substrates in order to grow in various environments, such as macrophages. Glycerol via gluconeogenesis and amino acids were identified as the main sources of carbon during the intracellular replication of *Francisella* spp. in host cells (36, 39). However, glycerol requires UQ to be efficiently metabolized via the ubiquitous enzyme GlpD (40), and amino acid degradation is closely linked to the TCA cycle, which produces reducing equivalents in *Francisella* spp. (36). Besides its requirement for bioenergetics, UQ might also contribute to the antioxidant capacity of *Francisella* since it was shown to be a potent lipid-soluble antioxidant in *E. coli* (41). During its intracellular life, *Francisella* is exposed to oxidative stress. Indeed, as a defense mechanism for the clearance of phagocytosed microorganisms, both macrophages and neutrophils produce reactive oxygen species, which in turn trigger bacterial killing by causing damage to macromolecules (42, 43). We propose that the reduced content of UQ in the Tn-*ubiC_{Fn}* mutant could therefore affect *F. novicida*'s oxidative defense. This hypothesis is in good agreement with recent data showing that reduced expression of *UbiC_{Fn}* decreases the resistance of *F.*

novicida to oxidative stress (44). In a similar way, we showed previously that UbiE, UbiJ, and UbiB proteins were needed for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* intracellular proliferation in macrophages (21). Collectively, all these data assign a role for Ubi proteins in bacterial intracellular proliferation and, more generally, highlight the importance of UQ production for bacterial virulence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. All bacterial strains used in this study are listed in Table S2 in the supplemental material. *F. novicida* U112 was obtained from the Centre National de Référence des *Francisella*, CHU Grenoble-Alpes, France. The transposon mutant Tn-*ubiC_{Fn}* of the *F. novicida* U112 strain was obtained from the Manoil Laboratory, Department of Genome Science, University of Washington (7). Both strains were grown on Polyvitex-enriched chocolate agar (PVX-CHA) plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubated at 37°C for 48 to 72 h. Liquid cultures were carried out at 37°C with rotary shaking at 200 rpm in Chamberlain medium (45) supplemented with either glucose or succinate (0.4% [wt/vol] final concentration) as the only carbon source. For growth studies, cultures grown overnight were used to inoculate a 96-well plate to obtain a starting optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of around 0.1 and further incubated with shaking at 37°C. Changes in the OD₆₀₀ were monitored every 10 min for 40 h using the Infinite 200 Pro microplate reader (Tecan, Lyon, France). When required, the medium was supplemented with 4HB in DMSO at a 50 to 100 μM final concentration; pABA, pA2MBA, and pA3MBA in DMSO at a 1 mM final concentration; or 3A4HB at a 10 μM to 1 mM final concentration. For CFU counting, bacteria were suspended in phosphate-buffered saline (PBS), and cell suspensions were serially diluted in PBS. For each sample, 100 μl of at least four different dilutions was plated onto PVX-CHA plates and incubated for 72 h at 37°C, and CFU were counted using a Scan 100 instrument (Interscience).

The *E. coli* Δ *ubiA* and Δ *ubiJ* mutants were constructed as described previously (46). Briefly, the *ubiA::cat* and *ubiJ::cat* mutations were generated by one-step inactivation of the *ubiA* and *ubiJ* genes. A DNA fragment containing the *cat* gene flanked with the 5' and 3' regions of the *ubiA* and *ubiJ* genes was PCR amplified using pKD3 as a template and oligonucleotides 5'-wannerubiA/3'-wannerubiA and 5'-wannerubiJ/3'-wannerubiJ, respectively (Table S3). The Δ *ubiB* mutant was generated as follows. The *cat* gene was inserted into the *ubiB* gene between the two sites of NruI at bp 842 and 1004. Next, *ubiB::cat* was PCR amplified using oligonucleotide pair 5'-xbalubiB/3'-xbalubiB (Table S3). Strain BW25113, carrying the pKD46 plasmid, was transformed by electroporation with the amplified fragments, and Cat⁺ colonies were selected. The replacement of chromosomal *ubi* by the *cat* gene was verified by PCR amplification in the Cat⁺ clones. *E. coli* K-12 strains JW5713 and JW2226 from the Keio Collection (47) were used as donors in transduction experiments to construct the Δ *ubiC::kan* and Δ *ubiG::kan* mutants of *E. coli* MG1655 strains. The Δ *ubiA*, Δ *ubiB*, Δ *ubiC*, Δ *ubiE*, Δ *ubiG*, and Δ *ubiK* strains were cured with pCP20 to yield the Δ *ubiAc*, Δ *ubiBc*, Δ *ubiCc*, Δ *ubiEc*, Δ *ubiGc*, and Δ *ubiKc* strains, respectively (Table S2). *E. coli* strains (K-12, MG1655, or Top10) were grown on lysogeny broth (LB) rich medium or in M9 minimal medium (supplemented with glucose or succinate at a 0.4% [wt/vol] final concentration) at 37°C. Ampicillin (100 μg/ml), kanamycin (50 μg/ml), chloramphenicol (35 μg/ml), and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (100 μM) were added when needed.

Cloning, plasmid construction, and complementation assays. The plasmids and the primers used in this study are listed in Tables S2 and S3 in the supplemental material, respectively. All the plasmids produced in this work were verified by DNA sequencing (GATC Biotech, Constance, Germany). The *FTN_0385* (*ubiA_{Fn}*), *FTN_0459* (*ubiB_{Fn}*), *FTN_0386* (*ubiC_{Fn}*), *FTN_0461* (*ubiE_{Fn}*), *FTN_1146* (*coq7_{Fn}*), *FTN_0321* (*ubiG_{Fn}*), *FTN_1237* (*ubiH_{Fn}*), *FTN_1236* (*ubiI_{Fn}*), *FTN_0460* (*ubiJ_{Fn}*), and *FTN_1666* (*ubiK_{Fn}*) inserts were obtained by PCR amplification using the *F. novicida* U112 genome as the template and the oligonucleotides described in Table S3. Inserts were EcoRI-BamHI or EcoRI-HindIII digested and inserted into EcoRI-BamHI- or EcoRI-HindIII-digested pTrc99a plasmids, respectively, yielding the *pubiA_{Fn}*, *pubiB_{Fn}*, *pubiC_{Fn}*, *pubiE_{Fn}*, *pcoq7_{Fn}*, *pubiG_{Fn}*, *pubiH_{Fn}*, *pubiI_{Fn}*, *pubiJ_{Fn}*, and *pubiK_{Fn}* plasmids (Table S3). The plasmids were transformed into *E. coli* MG1655 strains with mutation of the *ubiA*, *ubiB*, *ubiC*, *ubiE*, *ubiF*, *ubiG*, *ubiH*, *ubiI*, *ubiJ*, and *ubiK* genes (single and double mutations) (Table S2), and complementation of the UQ₈ biosynthetic defect was assessed by both measuring the quinone content and plating serial dilutions onto solid M9 minimal medium supplemented with glucose or succinate (0.4% [wt/vol] final concentration) as the only carbon source, with growth overnight at 37°C. Expression of the Ubi proteins was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 100 μM.

Lipid extractions and quinone analysis. Cultures (5 ml under ambient air) were cooled down on ice 30 min before centrifugation at 3,200 × *g* at 4°C for 10 min. Cell pellets were washed in 1 ml ice-cold PBS and transferred to preweighed 1.5-ml Eppendorf tubes. After centrifugation at 12,000 × *g* at 4°C for 1 min, the supernatant was discarded, the cell wet weight was determined (~5 to 30 mg), and pellets were stored at -20°C. Quinone extraction from cell pellets was performed as previously described (22). Lipid extracts corresponding to 1 mg of cells (wet weight) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC)-electrochemical detection (ECD) MS with a BetaBasic-18 column at a flow rate of 1 ml/min with mobile phases composed of 50% methanol, 40% ethanol, and a mix of 90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). When necessary, MS detection was performed on an MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe temperature, 400°C; cone voltage, 80 V). Single-ion monitoring detected the following compounds: UQ₈ (M⁺ NH₄⁺), *m/z* 744 to 745, 6 to 10 min, with a scan time of 0.2 s; UQ₁₀ (M⁺ NH₄⁺), *m/z*

880 to 881, 10 to 17 min, with a scan time of 0.2 s; DMQ₈ (M⁺ NH₄⁺), *m/z* 714 to 715, 10 min, with a scan time of 0.4 s; DDMQ₈ (M⁺ NH₄⁺), *m/z* 700 to 701, 5 to 8 min, with a scan time of 0.4 s; OPP (M⁺ NH₄⁺), *m/z* 656.0 to 657, 5 to 9 min, with a scan time of 0.4 s; and compound X (M⁺ H⁺), *m/z* 682 to 683, 5 to 10 min, with a scan time of 0.4 s. MS spectra were recorded between *m/z* 600 and 900 with a scan time of 0.3 s. ECD and MS peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis of the recovery of the UQ₁₀ internal standard and then normalized to cell wet weight. The peaks of UQ₈ obtained by electrochemical detection or MS detection were quantified with a standard curve of UQ₁₀ as previously described (22).

Infections of *G. mellonella* larvae. Larvae of the wax moth *G. mellonella* were purchased from Lombri'carraz SARL, Mery, France. Healthy and uniformly white larvae measuring around 3 cm were selected for infection. The bacteria were grown overnight to an OD₆₀₀ of ~3. Culture medium was removed by centrifugation, and bacteria were diluted in PBS to 10⁸ CFU/ml. Insulin cartridges were sterilized before filling with bacterial solutions. Larvae were injected with 10 μl of bacterial suspensions (10⁶ CFU per larva as recommended previously [24]) using an insulin pen or with 10 μl of PBS only. The precise number of bacteria transferred in injections was determined by spotting serial dilutions onto chocolate agar plates and counting CFU after growth at 37°C for 48 h. Infected larvae were placed into petri dishes and maintained at 37°C. The survival of larvae was monitored for 6 days by counting the number of dead larvae each day. A cohort of 20 larvae was used under each condition, and the experiment was performed twice. As a control, an untreated cohort of larvae was also monitored.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), project O2-taboo ANR-19-CE44-0014, project Emergence (TIMC-UGA), the Université Grenoble Alpes (UGA), and the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

We thank Patricia Renesto for constructive discussions and technical assistance and Laurent Aussel for critically reading the paper.

F.B., F.P., and L.P. conceived the project and its design. K.K., M.H.C., and G.H. conducted experiments and performed data analysis. K.K., C.D.B., and Y.C. performed experiments on *G. mellonella*. L.L. contributed new reagents (strains). All authors edited the manuscript. L.P. wrote the manuscript. L.P. supervised the project.

REFERENCES

- Sjostedt A. 2011. Special topic on *Francisella tularensis* and tularemia. *Front Microbiol* 2:86. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00086>.
- Wallet P, Lagrange B, Henry T. 2016. *Francisella* inflammasomes: integrated responses to a cytosolic stealth bacterium. *Curr Top Microbiol Immunol* 397:229–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41171-2_12.
- Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW. 2004. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2:967–978. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1045>.
- Sjostedt A. 2007. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 1105:1–29. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.009>.
- Kingry LC, Petersen JM. 2014. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol* 4:35. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00035>.
- Jones BD, Faron M, Rasmussen JA, Fletcher JR. 2014. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front Cell Infect Microbiol* 4:32. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00032>.
- Gallagher LA, Ramage E, Jacobs MA, Kaul R, Brittnacher M, Manoil C. 2007. A comprehensive transposon mutant library of *Francisella novicida*, a bio-weapon surrogate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1009–1014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606713104>.
- Ireland PM, Bullifent HL, Senior NJ, Southern SJ, Yang ZR, Ireland RE, Nelson M, Atkins HS, Titball RW, Scott AE. 2019. Global analysis of genes essential for *Francisella tularensis* Schu S4 growth *in vitro* and for fitness during competitive infection of Fischer 344 rats. *J Bacteriol* 201:e00630-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00630-18>.
- 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>.
- Vo CD, Michaud J, Elsen S, Faivre B, Bouveret E, Barras F, Fontecave M, Pierrel F, Lombard M, Pelosi L. 2020. The O₂-independent pathway of ubiquinone biosynthesis is essential for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 295:9021–9032. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013748>.
- Soballe B, Poole RK. 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology (Reading)* 145(Part 8):1817–1830. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-8-1817>.
- 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>.
- Agrawal S, Jaswal K, Shiver AL, Balecha H, Patra T, Chaba R. 2017. A genome-wide screen in *Escherichia coli* reveals that ubiquinone is a key antioxidant for metabolism of long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 292:20086–20099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806240>.
- Abby SS, Kazemzadeh K, Vragneau C, Pelosi L, Pierrel F. 2020. Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta* 1861:148259. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148259>.
- Hajj Chehade M, Pelosi L, Fyfe CD, Loiseau L, Rascalou B, Brugiere S, Kazemzadeh K, Vo CD, Ciccone L, Aussel L, Coute Y, Fontecave M, Barras F, Lombard M, Pierrel F. 2019. A soluble metabolon synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone. *Cell Chem Biol* 26:482–492.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>.
- Pelosi L, Vo CD, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Gousse M, Chenal C, Touati N, Binet U, 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>.
- Stenmark P, Grunler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA. 2001. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. *Coq7*

- (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 276:33297–33300. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100346200>.
18. Zhou L, Li M, Wang XY, Liu H, Sun S, Chen H, Poplawsky A, He YW. 2019. Biosynthesis of coenzyme Q in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* via a yeast-like pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 32:217–226. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0183-R>.
 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. Poon WW, Davis DE, Ha HT, Jonassen T, Rather PN, Clarke CF. 2000. Identification of *Escherichia coli* *ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J Bacteriol* 182:5139–5146. <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5139-5146.2000>.
 21. 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>.
 22. 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>.
 23. Loiseau L, Fyfe C, Aussel L, Hajj Chehade M, Hernandez SB, Faivre B, Hamdane D, Mellot-Draznieks C, Rascalou B, Pelosi L, Velours C, Cornu D, Lombard M, Casadesu 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>.
 24. Thelaus J, Lundmark E, Lindgren P, Sjodin A, Forsman M. 2018. *Galleria mellonella* reveals niche differences between highly pathogenic and closely related strains of *Francisella* spp. *Front Cell Infect Microbiol* 8:188. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00188>.
 25. Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E. 2007. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* 9:729–734. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.016>.
 26. Propst CN, Pylypko SL, Blower RJ, Ahmad S, Mansoor M, van Hoek ML. 2016. *Francisella philomiragia* infection and lethality in mammalian tissue culture cell models, *Galleria mellonella*, and BALB/c mice. *Front Microbiol* 7:696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00696>.
 27. Brodmann M, Schnider S, Basler M. 2021. Type VI secretion system and its effectors PdpC, PdpD and OpiA contribute to *Francisella* virulence in *Galleria mellonella* larvae. *Infect Immun* 89:e00579-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00579-20>.
 28. Tang Q, Feng M, Xia H, Zhao Y, Hou B, Ye J, Wu H, Zhang H. 2019. Differential quantitative proteomics reveals the functional difference of two *yigP* locus products, UbiJ and EsrE. *J Basic Microbiol* 59:1125–1133. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900350>.
 29. Jiang HX, Wang J, Zhou L, Jin ZJ, Cao XQ, Liu H, Chen HF, He YW. 2019. Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02179-1>.
 30. Nakahigashi K, Miyamoto K, Nishimura K, Inokuchi H. 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* 174:7352–7359. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7352-7359.1992>.
 31. Zhou L, Wang JY, Wu J, Wang J, Poplawsky A, Lin S, Zhu B, Chang C, Zhou T, Zhang LH, He YW. 2013. The diffusible factor synthase XanB2 is a bifunctional chorismatase that links the shikimate pathway to ubiquinone and xanthomonadins biosynthetic pathways. *Mol Microbiol* 87:80–93. <https://doi.org/10.1111/mmi.12084>.
 32. Marshall SA, Payne KAP, Leys D. 2017. The UbiX-UbiD system: the biosynthesis and use of prenylated flavin (prFMN). *Arch Biochem Biophys* 632:209–221. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.014>.
 33. 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>.
 34. Degli Esposti M. 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>.
 35. 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>.
 36. Ziveri J, Barel M, Charbit A. 2017. Importance of metabolic adaptations in *Francisella* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 7:96. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00096>.
 37. Dieppedale J, Gesbert G, Ramond E, Chhuon C, Dubail I, Dupuis M, Guerrero IC, Charbit A. 2013. Possible links between stress defense and the tricarboxylic acid (TCA) cycle in *Francisella* pathogenesis. *Mol Cell Proteomics* 12:2278–2292. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024794>.
 38. Chong A, Celli J. 2010. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front Microbiol* 1:138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00138>.
 39. Brissac T, Ziveri J, Ramond E, Tros F, Kock S, Dupuis M, Brillet M, Barel M, Peyriga L, Cahoreau E, Charbit A. 2015. Gluconeogenesis, an essential metabolic pathway for pathogenic *Francisella*. *Mol Microbiol* 98:518–534. <https://doi.org/10.1111/mmi.13139>.
 40. Austin D, Larson TJ. 1991. Nucleotide sequence of the *glpD* gene encoding aerobic *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 173:101–107. <https://doi.org/10.1128/jb.173.1.101-107.1991>.
 41. Soballe B, Poole RK. 2000. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)* 146(Part 4):787–796. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-787>.
 42. Kinkead LC, Allen LA. 2016. Multifaceted effects of *Francisella tularensis* on human neutrophil function and lifespan. *Immunol Rev* 273:266–281. <https://doi.org/10.1111/imr.12445>.
 43. Steiner DJ, Furuya Y, Jordan MB, Metzger DW. 2017. Protective role for macrophages in respiratory *Francisella tularensis* infection. *Infect Immun* 85:e00064-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00064-17>.
 44. Felix J, Siebert C, Ducassou JN, Nigou J, Garcia PS, Fraudeau A, Huard K, Mas C, Brochier-Armanet C, Coute Y, Gutsche I, Renesto P. 2021. Structural and functional analysis of the *Francisella* lysine decarboxylase as a key actor in oxidative stress resistance. *Sci Rep* 11:972. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79611-5>.
 45. Chamberlain RE. 1965. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl Microbiol* 13:232–235. <https://doi.org/10.1128/am.13.2.232-235.1965>.
 46. 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>.
 47. 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>.

Supplementary data for :

The Biosynthetic Pathway of Ubiquinone Contributes to Pathogenicity of *Francisella novicida*

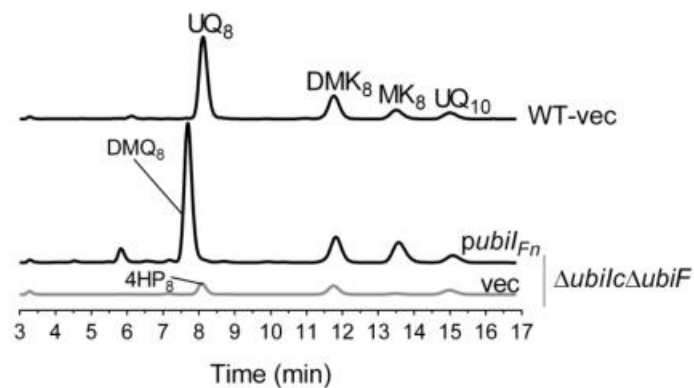


Figure S1. Complementation analysis of *E. coli* $\Delta ubilC\Delta ubiF$ mutant with *UbiIFn*. The *E. coli* $\Delta ubilC\Delta ubiF$ mutant strain transformed with pTrc99a (vec) or pTrc99a encompassing the *ubiIFn* gene were grown over night at 37°C in LB medium. Expression of the *UbiIFn* protein was induced by addition of IPTG to a final concentration of 100 μ M. The *E. coli* wild-type strain MG1655 (WT) transformed with the pTrc99a empty vector was used as a control. HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg amounts of cells. The chromatograms are representative of three independent experiments. The peaks corresponding to 4HP₈, 3-octaprenyl-4-hydroxyphenol; DMQ₈, C6-demethoxy-ubiquinone; UQ₈, ubiquinone 8; MK₈, menaquinone 8; DMK₈, demethylmenaquinone 8 and UQ₁₀, ubiquinone 10 as a standard, are indicated.

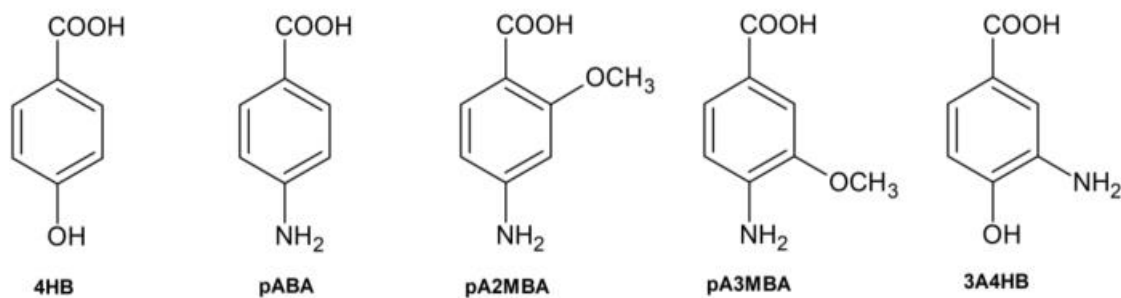
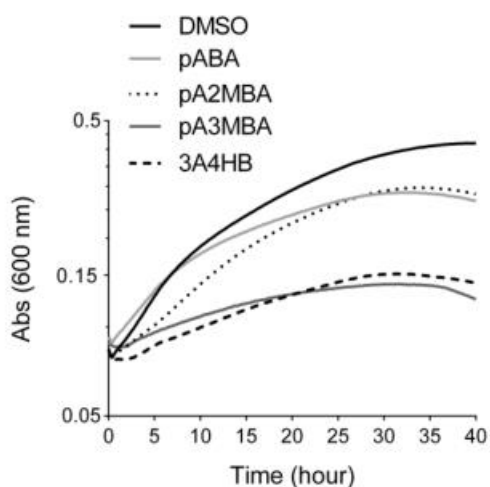
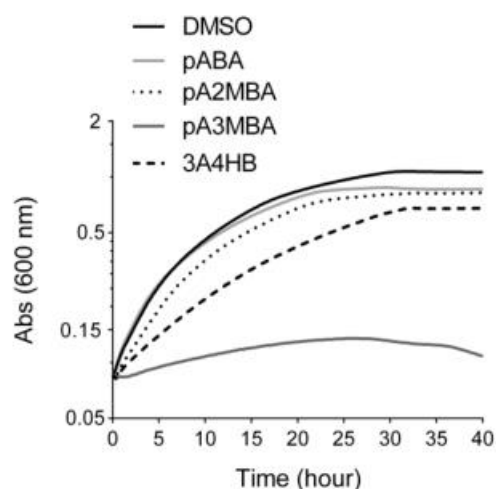
A**B****C**

Figure S2. Effect of derivative compounds of 4HB on *F. novicida* growth. (A) Chemical structures of the compounds tested. Growth curves for *F. novicida* cultivated under aerobic conditions in Chamberlain medium with 0.4% (w/v) succinate (B) or glucose (C) as the sole carbon source and in the presence of 1 mM of the various 4HB analogues solubilized in DMSO (average of six triplicate growth curves). DMSO was used as a control. The growth for each condition was followed as the change in the absorbance at 600 nm in a Tecan plate reader. More details of growth experiments are found in Materials and methods section. pABA, 4-aminobenzoic acid; pA2MBA, 4-amino-2-methoxybenzoic acid; pA3MBA, 4-amino-3-methoxybenzoic acid and 3A4HB, 3-amino-4-hydroxybenzoic acid.

Table S1: Bioinformatics analysis of the proteins required for UQ biosynthesis in *E. coli* MG1655, in *F. novicida* U112 and in *F. tularensis* ssp *tularensis* Schu S4. (1) Deduced from (1). (2) From <https://ecocyc.org/>. (3) From (2).

| Protein | <i>E. coli</i> MG1655 | | <i>F. novicida</i> U112 | | <i>F. tularensis</i> ssp <i>tularensis</i> Schu S4 | | Functions in <i>E. coli</i> (2) or specific to <i>F. novicida</i> |
|---------|-----------------------|--|-------------------------|------------|--|------------|---|
| | Size (aa) | Need in UQ biosynthesis (1) +O ₂ -O ₂ | Protein ID | Size (aa) | % of identity | Protein ID | |
| IspB | 323 | Yes | FTN_0922 | 326 | 48 | FTT_1044c | 48 |
| UbiA | 290 | Yes | FTN_0385 | 285 | 42 | FTT_0856c | 41 |
| UbiB | 546 | Yes | FTN_0459 | 553 | 47 | FTT_1298 | 48 |
| UbiC | 165 | Yes | FTN_0386 | 169 | 28 | FTT_0857c | 27 |
| UbiD | 497 | Yes | | No homolog | | | 3-octaprenyl 4-HB decarboxylase |
| UbiE | 251 | Yes | FTN_0461 | 251 | 70 | FTT_1296 | 70 |
| UbiF | 391 | Yes | | No homolog | | | 2-octaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methylase |
| Coq7 | No homolog | | | No homolog | | | 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase |
| UbiG | 240 | Yes | FTN_0321 | 232 | 48 | FTT_1590c | 48 |
| UbiH | 392 | Yes | FTN_1237 | 404 | 27 | FTT_1218c | 27 |
| UbiI | 400 | Yes | FTN_1236 | 412 | 37 | FTT_1217c | 38 |
| UbiJ | 201 | Yes | FTN_0460 | 196 | 21 | FTT_1297 | 21 |
| UbiK | 96 | Yes | FTN_1666 | 65 | 44 | FTT_0045 | 44 |
| UbiT | 174 | No | | | | | Essential to UQ biosynthesis-SCP2 domain |
| UbiU | 331 | No | | | | | Essential to UQ biosynthesis |
| UbiV | 292 | No | | | | | Essential to UQ biosynthesis |
| UbiX | 189 | Yes | | | | | Flavin prenyltransferase - UbiD partner protein |

1. Pelosi L, Vo CD, Abby SS, Loiseau L, Rascalou B, Hajj Chehade M, Faivre B, Gousse 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.

2. Stenmark P, Grunler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA. 2001. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 276:33297-33300.

Table S2: Bacterial strains and plasmids used in this work.

| Strains or plasmids | Relevant genotypes and properties | References or sources |
|-----------------------------|---|-----------------------|
| Strains | | |
| <i>F. novicida</i> U112 | Wild-type strain | CNR, Grenoble, France |
| <i>F. novicida</i> U112 | Wild-type strain from Manoil laboratory | (1) |
| <i>Tn-ubiC_{Fn}</i> | <i>tfn1_pw060323p01q122 (FTN_0386)</i> Tn position in the ORF: 290(507); kan selection | |
| <i>E. coli</i> | | |
| Top10 | Chemically competent cells | Invitrogen |
| MG1655 | Parental strain | Laboratory collection |
| $\Delta ubiA$ | $\Delta ubiA::cat$ | This work |
| $\Delta ubiB$ | $\Delta ubiB::cat$ | This work |
| $\Delta ubiC$ | $\Delta ubiC::kan$; MG1655+P1/JW5713, LB kan selection | This work |
| $\Delta ubiE$ | $\Delta ubiE::kan$; MG1655+P1/JW5581, LB kan selection | (2) |
| $\Delta ubiF$ | $\Delta ubiF::kan$; MG1655+P1/JW0659, LB kan selection | (2) |
| $\Delta ubiG$ | $\Delta ubiG::kan$; MG1655+P1/JW2226, LB kan selection | This work |
| $\Delta ubiH$ | $\Delta ubiH::kan$; MG1655+P1/JW2875, LB kan selection | (2) |
| $\Delta ubiI$ | $\Delta ubiI::kan$; MG1655+P1/JW2874, LB kan selection | (2) |
| $\Delta ubiJ$ | $\Delta ubiJ::cat$ | This work |
| $\Delta ubiK$ | $\Delta ubiK::kan$; MG1655+P1/JW5505 LB kan selection | (3) |
| $\Delta ubiAc$ | $\Delta ubiA$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiBc$ | $\Delta ubiB$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiCc$ | $\Delta ubiC$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiEc$ | $\Delta ubiE$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiFc$ | $\Delta ubiF$ cured with pCP20, clone Kans | (4) |
| $\Delta ubiGc$ | $\Delta ubiG$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiHc$ | $\Delta ubiH$ cured with pCP20, clone Kans | (4) |
| $\Delta ubiIc$ | $\Delta ubiI$ cured with pCP20, clone Kans | (4) |
| $\Delta ubiKc$ | $\Delta ubiK$ cured with pCP20, clone Kans | This work |
| $\Delta ubiIc\Delta ubiF$ | $\Delta ubiIc+P1/ubiF$, LB kan selection | (5) |
| Plasmids | | |
| pTrc99a | vector for inducible gene expression (Amp ^R) | (6) |
| <i>pubiA_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiA_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiB_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiB_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiC_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiC_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiE_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiE_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiG_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiG_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiH_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiH_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiI_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiI_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiJ_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiJ_{Fn}</i> | This work |
| <i>pubiK_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>ubiK_{Fn}</i> | This work |
| <i>pcoq7_{Fn}</i> | pTrc99a carrying <i>coq7_{Fn}</i> | This work |
| 1. | Gallagher LA, Ramage E, Jacobs MA, Kaul R, Brittnacher M, Manoil C. 2007. A comprehensive transposon mutant library of <i>Francisella novicida</i> , a bioweapon surrogate. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 104:1009-1014. | |
| 2. | Hajj Chegade 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. <i>ubiI</i> , a new gene in <i>Escherichia coli</i> coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. <i>J Biol Chem</i> 288:20085-20092. | |

3. Loiseau L, Fyfe C, Aussel L, Hajj Chegade M, Hernandez SB, Faivre B, Hamdane D, Mellot-Draznieks C, Rascalou B, Pelosi L, Velours C, Cornu D, Lombard M, Casadesus 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.
4. 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.
5. Aussel L, Loiseau L, Hajj Chegade 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.
6. Amann E, Ochs B, Abel KJ. 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301-315.

Table S3: Primers used in this work. Restriction sites are underlined.

| Name | Sequence (5'→3') | Purpose |
|--|--|-------------------------------------|
| Fw-ubiA _{Fn} Rc-ubiA _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGAATAAAACAACAACATAAAAGCATATTTTC TTTT <u>GGATCCTC</u> CATAAAAAATTCCTTGATTATATATTGTATC | Cloning <i>ubiA_{Fn}</i> |
| Fw-ubiB _{Fn} Rc-ubiB _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGATTA AAAAATTTCTAAGGCTTATCTAC TTTT <u>GGATCCTT</u> ATTTCTCCTTTTTAAACTATAGTAAATC | Cloning <i>ubiB_{Fn}</i> |
| Fw-ubiC _{Fn} Rc-ubiC _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGAATGTTATTAACAAAGAAAATCTAAC TTTT <u>GGATCCTC</u> AGTATTGCTCGGGTAAACTAG | Cloning <i>ubiC_{Fn}</i> |
| Fw-ubiE _{Fn} Rc-ubiE _{Fn} | TTTTGGATCCATGTCTAAAGAAAATAAAACAACAGATTTTG TTTT <u>AAGCTTTT</u> TAATATTATATCCAATATGTAATGCTAC | Cloning <i>ubiE_{Fn}</i> |
| Fw-ubiG _{Fn} Rc-ubiG _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGATTAATATAGATAACAATGAAGTTG TTTT <u>GGATCCTT</u> ATACCTTTCTAAAAGCTATAATATAATTAAC | Cloning <i>ubiG_{Fn}</i> |
| Fw-ubiH _{Fn} Rc-ubiH _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGAATGCTAAATATGATGTGGCAATTG TTTT <u>GGATCCCT</u> AAACGCTCATCCTCGACCAC | Cloning <i>ubiH_{Fn}</i> |
| Fw-ubiI _{Fn} Rc-ubiI _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGAGCGTTAGAAATATTCAAAAAGATGCTG TTTT <u>GGATCCTT</u> ATAAAGCTTGCTTCAACTATACTTTTAAC | Cloning <i>ubiI_{Fn}</i> |
| Fw-ubiJ _{Fn} Rc-ubiJ _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGCTAAAAC TAGTAAACACAGCC TTTT <u>GGATCCTT</u> AAATCATTGTTTAAGCCTTCTAATAATTTTAG | Cloning <i>ubiJ_{Fn}</i> |
| Fw-ubiK _{Fn} Rc-ubiK _{Fn} | TTTT <u>GGATCC</u> CATGAAGGAAATTCTAGGACCG TTTT <u>AAGCTTTT</u> ATTTTTTCTCAGCTAAAAGCTTATC | Cloning <i>ubiK_{Fn}</i> |
| Fw-coq7 _{Fn} Rc-coq7 _{Fn} | TTTT <u>GAATTC</u> CATGAGAAAGTTATCATTTTTAGATAGG TTTT <u>GGATCCTC</u> AAAATCTATATGCAAGAGTAGTC | Cloning <i>coq7_{Fn}</i> |
| 5'-wannerubiA 3'-wannerubiA | TTTTTACCGGCGTCACCGTTGTACTAAGAGGAAAAAATCATATG AATATCCTCCTTA CAGAAGAAAGCCGGATGATCATCCGGCTTTTTTACATCAGTGTAG GCTGGAGCTGCTTC | Inactivation of <i>ubiA</i> |
| 5'-wannerubiJ 3'-wannerubiJ | CGCTGCATCGTGGTTATAAGTTCTGACAGGAGACCGGAACATAT GAATATCCTCCTTA CGTACTTCACCTGGCGTCATTTAGCCTCCAGTTTTTCCAGCCGTTT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | Inactivation of <i>ubiJ</i> |
| 5'-xbaIubiB 3'-xbaIubiB | TCGACTCTAGAGATGACGCCAGGTGAAGTACGGCGC CTTCCGTCTAGATCAGCGTGTGTTTGCGCCAACCGACAAACCAGG | Inactivation of <i>ubiB</i> |

II. Voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ

II.1. Rôle de la voie UbiUVT- dépendante de biosynthèse de l'ubiquinone dans l'adaptation aux conditions respiratoires changeantes chez *Escherichia coli*

Escherichia coli possède trois quinones isoprénoïdes : l'ubiquinone (UQ₈), la déméthylménaquinone (DMK₈) et la ménaquinone (MK₈). L'UQ₈ qui présente un potentiel rédox élevé (+113 mV) est principalement utilisé pour le transfert d'électrons et de protons dans la chaîne respiratoire en conditions aérobies. A l'inverse, la DMK (+36 mV) et la MK (-74 mV) qui présentent des potentiels rédox plus bas sont surtout employées en conditions anaérobies, c'est-à-dire avec des accepteurs d'électrons autres que le dioxygène (O₂) (Nitzschke and Bettenbrock, 2018). En accord avec ce constat, *E. coli* synthétise l'UQ₈ en aérobiose via une voie multi-étape O₂-dépendante. En effet, les étapes d'hydroxylations du noyau aromatique de la future molécule d'UQ sont catalysées par des monooxygénases à flavines (FMOs) utilisant l'O₂ comme donneur de groupement alcool. Dans une publication de 1978, Alexander et Young ont remarqué qu'*E. coli* était également capable de synthétiser l'UQ₈ en anaérobiose (Alexander and I. G. Young, 1978). L'existence d'une voie de biosynthèse O₂-indépendante de l'UQ₈ soulève un certain nombre de questions. Premièrement, cette voie est-elle différente de celle bien caractérisée O₂-dépendante ? Deuxièmement, quelle est la fonction physiologique de l'UQ₈ synthétisée en anaérobiose chez *E. coli* sachant que la MK et la DMK sont les quinones de choix utilisées dans la respiration anaérobie de cette bactérie ?

Avant de débiter ma thèse, l'équipe a caractérisé la voie de biosynthèse de l'UQ₈ en anaérobiose (Pelosi *et al.*, 2019). Cette dernière se distingue principalement de la voie O₂-dépendante au niveau des étapes d'hydroxylation. En effet, les trois FMOs (UbiI, UbiH et UbiF) qui catalysent les trois réactions d'hydroxylation de cette voie sont dispensables en anaérobiose tout comme deux protéines accessoires (UbiJ et UbiK). Par contre, les autres protéines (UbiA à UbiE, UbiE, UbiG et UbiX) sont communes aux deux voies (Pelosi *et al.*, 2019). Lors de cette étude, notre équipe a identifié trois nouvelles protéines, UbiT, UbiU et UbiV, qui sont essentielles à la biosynthèse d'UQ₈ uniquement en anaérobiose. La protéine UbiT qui partage avec UbiJ un domaine de liaison aux lipides (SCP2) a été proposé comme l'homologue fonctionnel d'UbiJ mais en anaérobiose. Cette étude a également démontré que les protéines UbiU et UbiV appartenant à la famille des peptidase U32 forme un hétérodimère et chacun des monomères contient un centre [4Fe-4S] (Pelosi *et al.*, 2019). De manière intéressante, il a été démontré chez *E. coli* que deux autres peptidase U32, RlhA et TrhP, sont impliquées respectivement dans l'hydroxylation de la cytidine 2501 sur l'ARN ribosomique

23S (Kimura *et al.*, 2017) et sur l'uracile 34 de certains ARNt (Lauhon, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). Toutefois, à l'issue de cette première étude, plusieurs questions restaient sans réponse. Par exemple, quelles sont les fonctions d'UbiT et de l'hétérodimère UbiU-V ? La régulation des gènes codant pour ces trois protéines est-elle en adéquation avec une fonction en milieu anaérobie ?

L'article ci-après a permis de donner des éléments de réponse aux questions soulevées. Ainsi, grâce à des expériences *in vivo*, nous avons pu montrer que l'hétérodimère UbiU-V est capable d'hydroxyler les trois atomes de carbone des intermédiaires de l'UQ₈ indépendamment de l'O₂ ce qui ouvre la voie à de futures études visant à caractériser un nouveau type de chimie. De plus, nos expériences de compétition entre une souche *E. coli* wild-type et une souche Δ ubiUV ont révélé que la présence UbiU-V permet un avantage significatif à *E. coli* pour coloniser l'intestin de souris, une de ses niches écologiques. De plus, des analyses génétiques et physiologiques ont montré que l'expression d'UbiU-V est régulée par FNR, un régulateur transcriptionnel qui permet la transition d'un métabolisme aérobie vers celui anaérobie. Nous avons également démontré qu'une double régulation anaérobie/aérobie permet à UbiT d'assurer un passage rapide d'une voie de biosynthèse de l'UQ₈ à une autre. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'UbiTUV participent à la stratégie métabolique utilisée par *E. coli* pour s'adapter aux conditions respiratoires dans des environnements complexes et versatiles tel que l'intestin.

Mes contributions

Ce projet a fait l'objet d'une ANR collaborative « O₂-taboo » avec nos partenaires du Collège de France et de l'Institut Pasteur à Paris. De plus, cette ANR a financé ma thèse. Toutes les souches utilisées dans ces expériences ont été construites par nos collaborateurs à l'Institut Pasteur (Dr. Rodrigo Arias-Cartin, Dr. Emmanuelle Bouveret et Emmanuel Séchet). Ces derniers ont également effectué les analyses phénotypiques des différentes souches d'*E. coli* étudiées. Pour ma part, j'ai réalisé tous les dosages des quinones et les premières expérimentations animales avec l'aide du Dr. Corinne Loeuillet (Institute for Advanced Biosciences à Grenoble). J'ai ensuite suivi la formation « expérimentation animale » de l'UGA et j'ai obtenu les niveaux I et II (concepteur et praticien). Ces derniers m'ont permis de concevoir et de réaliser en autonomie toutes les expérimentations animales présentées dans cet article.

Role of the *Escherichia coli* ubiquinone-synthesizing UbiUVT pathway in adaptation to changing respiratory conditions

Rodrigo Arias-Cartin,¹ Katayoun Kazemzadeh Ferizhendi,² Emmanuel Séchet,¹ Ludovic Pelosi,² Corinne Loeuillet,³ Fabien Pierrel,² Frédéric Barras,¹ Emmanuelle Bouveret¹

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 22.

ABSTRACT Isoprenoid quinones are essential for cellular physiology. They act as electron and proton shuttles in respiratory chains and various biological processes. *Escherichia coli* and many α -, β -, and γ -proteobacteria possess two types of isoprenoid quinones: ubiquinone (UQ) is mainly used under aerobiosis, while demethylmenaquinones (DMK) are mostly used under anaerobiosis. Yet, we recently established the existence of an anaerobic O₂-independent UQ biosynthesis pathway controlled by *ubiT*, *ubiU*, and *ubiV* genes. Here, we characterize the regulation of *ubiTUV* genes in *E. coli*. We show that the three genes are transcribed as two divergent operons that are both under the control of the O₂-sensing Fnr transcriptional regulator. Phenotypic analyses using a *menA* mutant devoid of DMK revealed that UbiUV-dependent UQ synthesis is essential for nitrate respiration and uracil biosynthesis under anaerobiosis, while it contributes, though modestly, to bacterial multiplication in the mouse gut. Moreover, we showed by genetic study and ¹⁸O₂ labeling that UbiUV contributes to the hydroxylation of ubiquinone precursors through a unique O₂-independent process. Last, we report the crucial role of *ubiT* in allowing *E. coli* to shift efficiently from anaerobic to aerobic conditions. Overall, this study uncovers a new facet of the strategy used by *E. coli* to adjust its metabolism on changing O₂ levels and respiratory conditions. This work links respiratory mechanisms to phenotypic adaptation, a major driver in the capacity of *E. coli* to multiply in gut microbiota and of facultative anaerobic pathogens to multiply in their host.

IMPORTANCE Enterobacteria multiplication in the gastrointestinal tract is linked to microaerobic respiration and associated with various inflammatory bowel diseases. Our study focuses on the biosynthesis of ubiquinone, a key player in respiratory chains, under anaerobiosis. The importance of this study stems from the fact that UQ usage was for long considered to be restricted to aerobic conditions. Here we investigated the molecular mechanism allowing UQ synthesis in the absence of O₂ and searched for the anaerobic processes that UQ is fueling in such conditions. We found that UQ biosynthesis involves anaerobic hydroxylases, that is, enzymes able to insert an O atom in the absence of O₂. We also found that anaerobically synthesized UQ can be used for respiration on nitrate and the synthesis of pyrimidine. Our findings are likely to be applicable to most facultative anaerobes, which count many pathogens (*Salmonella*, *Shigella*, and *Vibrio*) and will help in unraveling microbiota dynamics.

KEYWORDS quinone, *E. coli*, Fnr, respiration, UbiTUV

Isoprenoid quinones are widely distributed in the three domains of life and globally act as electron and proton carriers (1). They serve in many processes of bacterial physiology and electron transport chains like photosynthesis, for example, plastoquinone and phyloquinone, and respiration, for example, UQ and menaquinone (MK)

Editor Markus W. Ribbe, University of California, Irvine, California, USA

Address correspondence to Frédéric Barras, fbarras@pasteur.fr, or Emmanuelle Bouveret, emmanuelle.bouveret@pasteur.fr.

Rodrigo Arias-Cartin, Katayoun Kazemzadeh Ferizhendi, and Emmanuel Séchet contributed equally to this article. Author order was determined alphabetically.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 22.

This study is dedicated to the memory of our friend and colleague Professor Josep Casadesús.

Received 25 November 2022

Accepted 12 April 2023

Published 7 June 2023

Copyright © 2023 Arias-Cartin 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/).

(2). Isoprenoid quinones are composed of a quinone ring and a polyisoprenoid side chain whose length varies between organisms (for instance, UQ₈ in *E. coli* and UQ₉ in *Pseudomonas aeruginosa*). Many proteobacteria, such as *E. coli*, produce two main types of quinones: benzoquinones, represented by UQ, and naphthoquinones, such as MK and demethylmenaquinone (DMK). In respiratory chains, quinones transfer electrons from primary dehydrogenases to terminal reductases. For decades, *E. coli* aerobic and anaerobic respiratory chains were thought to rely on UQ and MK/DMK, respectively. Yet, we have recently discovered a new pathway for UQ biosynthesis under anaerobiosis, opening the way to a more complex and redundant model for bacterial respiratory metabolism (3).

Aerobic UQ biosynthesis pathway includes nine steps (4) (Fig. S1). It begins with the conversion of chorismate to 4-hydroxybenzoate (4HB) by the chorismate lyase UbiC. Then, the phenyl ring of the 4HB precursor undergoes condensation with a 40-carbon-long isoprenoid chain in a reaction catalyzed by the UbiA enzyme. Subsequently, a series of modifications on the 4HB ring by two methylases (UbiE and UbiG), a two-component decarboxylase (UbiD, UbiX), and three hydroxylases (UbiI, UbiH, and UbiF) generate the final UQ₈ product. The flavin adenine dinucleotide monooxygenases UbiI, UbiH, and UbiF use molecular O₂ for their hydroxylation reaction (5–7). An atypical kinase-like protein called UbiB is also involved in UQ₈ synthesis, but its exact role remains elusive (8). In addition, two non-enzymatic factors are required, UbiJ and UbiK, which may allow UbiEFGH enzymes to assemble in a cytoplasmic 1 MDa complex, referred to as the Ubi metabolon (9). Also, UbiJ and UbiK bind lipids, which may help the hydrophobic UQ biosynthesis to proceed inside a hydrophilic environment.

Anaerobic UQ biosynthesis is formed by a subset of the enzymes of the aerobic pathway, namely UbiA, UbiB, UbiC, UbiD, UbiE, UbiG, and UbiX, that function with UbiT, UbiU, and UbiV proteins solely required under anaerobiosis (3) (Fig. S1). Like its homolog counterpart UbiJ, UbiT contains an SCP2 lipid-binding domain. Strikingly, UbiU and UbiV do not exhibit any sequence similarity or functional relatedness with the hydroxylases UbiI, UbiH, or UbiF. UbiU and UbiV each contain an iron-sulfur ([4Fe-4S]) cluster coordinated by four conserved cysteine residues embedded in the so-called protease U32 domain, and they form a soluble UbiUV complex (3). Interestingly, two other members of the U32 protein family, RlhA and TrhP, are involved in hydroxylation reactions. They introduce specific nucleotide modifications, respectively, in the 23S rRNA or in some tRNAs (10–12).

In this work, we aimed at identifying the conditions under which UbiUVT proteins are produced and the genetic regulatory mechanisms involved, and the physiological role of UbiUVT. We concluded that (i) thanks to Fnr control, UbiUV ensures the production of UQ under a range of O₂ levels, from anaerobiosis to microaerobiosis, (ii) a dual anaerobic/aerobic regulation allows UbiT to secure a rapid shift from anaerobic UbiUV-dependent UQ synthesis to an aerobic UbiIHF-dependent UQ synthesis, and (iii) UbiUV-synthesized UQ can be used for nitrate respiration and anaerobic pyrimidine biosynthesis. We also showed that UbiUV acts as O₂-independent hydroxylases paving the way for future studies toward the characterization of a new type of chemistry.

MATERIALS AND METHODS

Strain constructions

Most knockout strains were obtained by generalized Φ P1 transduction using donor strains from the Keio collection (13). For introducing the sequential peptide affinity (SPA) tag on the chromosome or for the generation of specific knockouts, PCR recombination with the lambdaRed system was used, using the oligonucleotides indicated in Table 1 (14, 15). When necessary, the antibiotic resistance marker was removed using FLP recombinase expression from plasmid pCP20 as described previously (16). Cassette removal and plasmid loss were verified by antibiotic sensitivity and confirmed by PCR

amplification. Point mutations were introduced on the chromosome using the pKO3 vector (17).

For mouse intestine colonization experiments, we used MP7 and MP13 strains, which derive from the commensal *E. coli* MP1 strain (22). MP7 and MP13 express, respectively, mCherry or green fluorescent protein (GFP) under the control of a tetracycline-inducible promoter. $\Delta menA$ and $\Delta ubiUV$ deletions were introduced in MP13 using generalized Φ P1 transduction.

Plasmid constructions

pUA66 and pUA-*ubiUV*p plasmids were obtained from the library of *E. coli* promoters fused to the GFP coding sequence (23). The *ubiT* transcriptional fusions were constructed using primers indicated in Table 3 and cloned in XhoI/BamHI sites of pUA66. Expression plasmids for *ubiUV* and *fnr* were constructed using primers indicated in Table 3 and cloned in EcoRI/SalI sites of the pBAD24 vector (24). Expression plasmids for *ubiIHF* and *ubiM_Neisseria* genes were constructed using primers indicated in Table 3 and cloned in EcoRI/XhoI sites of pTet vector. A region of 1,275 base pairs encompassing *ubiU* and *ubiT* promoters was cloned in pKO3 vector (17). Mutations were introduced in the pKO3-*ubiTU* vector, in the pBAD-*ubiUV*, and in the transcriptional fusions by PCR mutagenesis on a plasmid, using the oligonucleotides indicated (Table 2 and 3).

Media and growth conditions

Strains were grown in LB Miller (10 g/L of tryptone, 10 g/L of NaCl, and 5 g/L of yeast extract) or M9 medium (6 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L NaCl, 1 g NH_4Cl , 2 mM MgSO_4 , 1 mg/mL thiamine) supplemented with 0.2% glucose, 0.2% glycerol, or 50 mM succinate as the carbon source. For anaerobic cultures, media were degassed and incubated in anaerobic environment for at least 24 hours prior to use, if necessary supplemented with 25 mM KNO_3 as electron acceptor and uracil 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or casamino acids at 0.05%.

For microaerobic experiments, media and plates were pre-equilibrated and cells were cultured in a Whitley H35 hypoxic station with 95% N_2 , 5% CO_2 , and the desired O_2 concentration. Humidity and temperature were set up at 85% and 37°C, respectively. For anaerobic-aerobic shift experiments, all anaerobic steps were performed in a JACO-MEX Campus anaerobic chamber under N_2 atmosphere at 1 ppm O_2 maximum. Cells were first incubated anaerobically in LB agar plates supplemented with 0.2% glucose overnight at 37°C. The next day, cells were cultured anaerobically in 3-mL LB supplemented with 25 mM NO_3^- for 24 hours at 37°C. Still under anaerobiosis, cells were collected by centrifugation, supernatant was discarded, and pellets were washed twice using 1 mL of M9 medium without carbon source and normalized at 0.1 OD units in M9 medium supplemented with 50 mM sodium succinate. At this point, cultures were moved out to atmospheric air, and growth was followed by triplicate at 37°C on 200 μL of culture in a 96-well plate using a TECAN infinite M200 plate reader. At 40 hours of culture, cells were diluted 1/20 in a new M9 50 mM sodium succinate medium and readings were resumed until 60 hours.

Aerobic and anaerobic cultures for quinone analysis

For aerobic cultures, 5 mL of LB medium, supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 0.05% arabinose when necessary to induce the expression from the pBAD vectors, was inoculated with 100 μL of overnight culture in glass tubes (15 cm long and 2 cm in diameter) and incubated at 37°C, 180 rpm overnight.

Anaerobic cultures were performed in Hungate tubes as previously described (3). Briefly, LB medium was supplemented with 100 mM KNO_3 as the final electron acceptor, 100 mg/L L-cysteine (adjusted to pH 6 with NaOH) to reduce residual molecular oxygen, and 2.5 mg/L reasazurin. This medium was distributed in Hungate tubes and deoxygenated by high-purity argon bubbling for 40 minutes. The Hungate tubes were sealed

TABLE 1 Strains used in this study

| Strain | Genotype | Construction | Reference |
|---------|-------------------------------|--|------------|
| FBE051 | MG1655 | | Lab strain |
| FBE229 | <i>ΔubiUV::kan</i> | PCR LL792/LL715 on pKD4, recombined in BW25113, followed by Φ P1 transduction in MG1655 | This work |
| FBE230 | <i>ΔubiUV::cat</i> | PCR LL792/LL715 on pKD3, recombined in BW25113, followed by Φ P1 transduction in MG1655 | This work |
| FBE254 | <i>ΔubiT::kan</i> | | (3) |
| FBE255 | <i>ΔubiT::cat</i> | | (3) |
| FBE354 | <i>Δfnr::aadA</i> | | (18) |
| FBE430 | <i>ΔmenA::kan</i> | Φ P1 transduction from Keio <i>ΔmenA</i> to MG1655 | This work |
| FBE501 | <i>ΔmenA</i> | Kanamycin cassette removed from FBE430 with pCP20 | This work |
| FBE526 | <i>ΔmenA ΔubiT::kan</i> | Φ P1 transduction from FBE254 to FBE501 | This work |
| FBE527 | <i>ΔmenA ΔubiUV::kan</i> | Φ P1 transduction from FBE229 to FBE501 | This work |
| FBE947 | <i>ΔubiH::Kan ΔubiUV::cat</i> | Φ P1 transduction from FBE230 to FBE253 | This work |
| FBE1013 | <i>ΔmenA ΔubiH::kan</i> | Φ P1 transduction from FBE253 to FBE501 | This work |
| FBE1032 | <i>ΔpyrD::kan</i> | Φ P1 transduction from Keio <i>ΔpyrD</i> to MG1655 | This work |
| FBE253 | <i>ΔubiH::kan</i> | | (19) |
| FBE510 | <i>ΔubiD::cat</i> | | (3) |
| FBE512 | <i>ΔubiF::kan</i> | | (6) |
| FBE515 | <i>ΔubiK::kan</i> | | (20) |
| FBE518 | <i>ΔubiA::cat</i> | | (3) |
| FBE690 | <i>Δubil</i> | Φ P1 transduction from Keio <i>Δubil</i> to MG1655 then kanamycin cassette removed with pCP20 | This work |
| FBE713 | <i>ΔubilK</i> | Φ P1 transduction from FBE515 to FBE690 | This work |
| FBE576 | <i>ΔubilFΔubiHF::cat</i> | | (19) |
| FBE650 | <i>ΔubilHF</i> | FBE576 strain cured with pCP20 plasmid | This work |
| FBE514 | <i>ΔubiJ::cat</i> | | (21) |
| FBE794 | <i>ΔubiJΔubiH</i> | Φ P1 transduction from FBE514 to FBE253 | This work |
| FBE264 | <i>ΔubiJΔubiF</i> | Φ P1 transduction from FBE514 to FBE512 | This work |
| FBE795 | <i>ΔubiTΔubiH</i> | Φ P1 transduction from FBE255 to FBE253 | This work |
| FBE265 | <i>ΔubiTΔubiF</i> | Φ P1 transduction from FBE255 to FBE512 | This work |
| FBE792 | <i>ΔubiHΔubiA</i> | Φ P1 transduction from FBE518 to FBE253 | This work |
| FBE793 | <i>ΔubiHΔubiD</i> | Φ P1 transduction from FBE510 to FBE253 | This work |
| FBE656 | <i>ubiU-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction DY330ubiU-SPA in MG1655 | This work |
| FBE789 | <i>ubiV-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction DY330ubiV-SPA in MG1655 | This work |
| FBE655 | <i>ubiT-SPA-kan</i> | Recombination PCR LL710/LL711 on pJL148 in BW25113 then Φ P1 transduction in MG1655 | This work |
| FBE695 | <i>Δfnr ubiU-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction from FBE656 to FBE354 | This work |
| FBE696 | <i>Δfnr ubiV-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction from FBE789 to FBE354 | This work |
| FBE694 | <i>Δfnr ubiT-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction from FBE655 to FBE354 | This work |
| FBE882 | <i>ubiT-SPA mutF1</i> | Recombination pKO3- <i>ubiT</i> mutF1 (pVP222) in FBE655 | This work |
| FBE883 | <i>ubiT-SPA mutΔF2</i> | Recombination pKO3- <i>ubiT</i> mutΔF2 (pVP223) in FBE655 | This work |
| FBE884 | <i>ubiV-SPA mutF1</i> | Recombination pKO3- <i>ubiV</i> mutF1 (pVP222) in FBE789 | This work |
| FBE885 | <i>ubiV-SPA mutΔF2</i> | Recombination pKO3- <i>ubiV</i> mutΔF2 (pVP223) in FBE789 | This work |
| FBE855 | <i>yhbS-SPA-kan</i> | Recombination PCR ebp292/293 on pJL148 in BW25113 then Φ P1 transduction in MG1655 | This work |
| FBE856 | <i>Δfnr yhbS-SPA-kan</i> | Φ P1 transduction from FBE856 to FBE354 | This work |
| FBE857 | <i>ΔyhbS</i> | Φ P1 transduction from Keio <i>ΔyhbS</i> to MG1655 | This work |
| FBE858 | <i>ΔyhbSΔmenA</i> | Φ P1 transduction from Keio <i>ΔyhbS</i> to FBE354 | This work |
| FBE484 | MP7 | Lambda att : tetR tetA-mCherry | (22) |
| FBE485 | MP13 | Lambda att : tetR tetA-gfpmut3.1 | (22) |
| FBE550 | <i>MP13ΔubiUV</i> | Φ P1 transduction from FBE229 to FBE485 | This work |
| FBE888 | <i>MP13ΔmenA</i> | Φ P1 transduction from FBE430 to FBE485 | This work |

TABLE 2 Plasmids used in this study

| Plasmid | Name | Description/construction | Source |
|---------|------------------------------|---|-----------|
| pCP20 | pCP20 | Ap, Cm, FLP recombinase expression | (16) |
| pEB227 | pBAD24 | AmpR—ColE1 ori—PBAD promoter | (24) |
| pEB267 | pKD46 | AmpR—ts ori—lambda Red genes | (15) |
| pEB268 | pKD3 | AmpR—FRT-cat-FRT | (15) |
| pEB269 | pKD4 | AmpR—FRT-kanaR-FRT | (15) |
| pEB794 | pJL148 | AmpR—SPA-FRT-kanaR-FRT | (14) |
| pES154 | pBAD- <i>ubiUV</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp134/136</i> (EcoRI/XhoI) in pBAD24 (EcoRI/SalI) | This work |
| pES185 | pBAD- <i>ubiU</i> (C176A)V | Mutagenesis PCR <i>ebp178/179</i> on pES154 | This work |
| pES184 | pBAD- <i>ubiUV</i> -SPA | PCR <i>ebp134/ebp968</i> on strain FBE696 (EcoRI/XhoI) in pBAD24 (EcoRI/SalI) | This work |
| pVP040 | pBAD- <i>fnr</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp31/32</i> (MfeI/XhoI) in pBAD24 (EcoRI/SalI) | This work |
| pEB1242 | pASK-IBA37plus | AmpR—ColE1 ori—TetR promoter—6His | IBA |
| pEB1823 | pTet | PCR mutagenesis <i>ebm1567/1568</i> on pEB1242 to remove 6His tag | This work |
| pES060 | pTet- <i>ubil</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp64/65</i> (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pES059 | pTet- <i>ubiH</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp61/62</i> (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pES143 | pTet- <i>ubiF</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp37/38</i> (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pES151 | pTet- <i>ubiM</i> _Neisseria | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp139/140</i> (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pEB898 | pUA66 | KanR—pSC101 ori—GFPmut2 | (23) |
| | pUA- <i>ubiUVp</i> | | (23) |
| pVP220 | pUA- <i>ubiUVp</i> mutF1 | Mutagenesis PCR <i>Ebp287/288</i> on pUA- <i>ubiU</i> | This work |
| | pUA- <i>ubiTp1p2</i> | | (23) |
| pVP169 | pUA- <i>ubiTp1</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp191/192</i> (XhoI/BamHI) in pUA66 (XhoI/BamHI) | This work |
| pVP170 | pUA- <i>ubiTp2</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp193/194</i> (XhoI/BamHI) in pUA66 (XhoI/BamHI) | This work |
| pVP187 | pUA- <i>ubiTp1p2</i> ΔF2 | Mutagenesis PCR <i>Ebp237/238</i> on pUA- <i>ubiT</i> | This work |
| pVP221 | pUA- <i>ubiTp1p2</i> mutF2 | Mutagenesis PCR <i>Ebp289/290</i> on pUA- <i>ubiT</i> | This work |
| pEB232 | pKO3 | camR, pSC101 ori, <i>sacB</i> | (17) |
| pVP219 | pKO3- <i>ubiTU</i> | PCR on MG1655 genomic DNA <i>ebp276/291</i> (XhoI/BamHI) in pKO3 (Sall/BamHI) | This work |
| pVP222 | pKO3- <i>ubiTU</i> mutF1 | Mutagenesis PCR <i>ebp287/288</i> on pVP219 | This work |
| pVP223 | pKO3- <i>ubiTU</i> mutΔF2 | Mutagenesis PCR <i>ebp237/238</i> on pVP219 | This work |

and autoclaved. The resazurin was initially purple, it turned to pink after deoxygenation and become colorless after autoclave. The preculture was performed overnight at 37°C in Eppendorf tubes filled to the top with LB medium containing 100 mM KNO₃. The Hungate tubes were then inoculated through the septum with disposable syringes and needles with 100 μL of precultures and incubated at 37°C without agitation. The resazurin remained colorless during culture indicating anaerobic conditions.

For anaerobic to aerobic shift assay, MG1655 WT, *ΔubiUV*, and *ΔubiT* strains were grown anaerobically in Hungate tubes for ~4 hours. Then, 26 μL of chloramphenicol (200 μg/mL) was injected through the septum with a Hamilton syringe. After 20 minutes, the Hungate tubes were unsealed and 2 mL of cultures was taken for lipid extraction and quinone analysis. The rest of cultures was transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks and placed at 37°C and 180 rpm for 2 hours. Two-milliliter aliquots of cultures were taken at 30 minutes and 120 minutes after the transition to ambient air for lipid extraction and quinone analysis.

SDS-PAGE and western blotting

Total cell extracts were prepared by resuspending cell pellets in Laemli buffer 1× at a concentration of 0.3 optical density at 600 nm (OD_{600 nm}) units in 10 μL, and then heating for 10 minutes at 95°C. After the separation of 8 μL of total cell extracts on SDS-PAGE, electrotransfer onto nitrocellulose membranes was performed using Trans-Blot turbo transfer system from Bio-Rad. After blocking in phosphate-buffered saline (PBS) 1× + milk 5%, SPA-tagged proteins were detected with monoclonal anti-Flag M2 antibody purchased from Sigma. YbgF protein was used as an internal control and

TABLE 3 Primers used in this study

| Primers | Sequence | Use |
|---------|---|------------------------|
| ebm968 | ttgctcgagAAGCAGCTCCAGCCTACACG | <i>ubiV</i> -SPA RV |
| ebm1567 | GAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATGAATTCGAGCTCGGTACCCG | pEB1823 |
| ebm1568 | CGGGTACCGAGCTCGAATTCATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATATTTC | pEB1823 |
| Ebp31 | GAGCAATTGatATCCCGAAAAGCGAATTATAC | <i>fnr</i> FW Mfel |
| Ebp32 | acgctcgagtcaGGCAACGTTACGCGTATG | <i>fnr</i> RV Xhol |
| Ebp37 | actgaattcatgACAAATCAACCAACGAAATG | <i>ubiF</i> FW EcoRI |
| Ebp38 | acgctcgagctaCAACCCTAACGCATATTCAGC | <i>ubiF</i> RV Xhol |
| Ebp61 | actgaattcATGAGCGTAATCATCGTCGGTG | <i>ubiH</i> FW EcoRI |
| Ebp62 | acgctcgagTtAACGCGCCACCCAACC | <i>ubiH</i> RV Xhol |
| Ebp64 | actgaattcATGCAAAGTGTGATGTAGCCATTG | <i>ubiI</i> FW EcoRI |
| Ebp65 | acgctcgagTTAACGCAGCCATTAGGCAAATC | <i>ubiI</i> RV Xhol |
| Ebp134 | actgaattcatgGAGCTGCTCTGCCCTG | <i>ubiU</i> FW EcoRI |
| Ebp136 | actgaattcATGAAATATTCCTTAGGGCCAGTG | <i>ubiV</i> RV Xhol |
| Ebp139 | actgaattcATGGGTTTTGATATAATCGCCTATC | <i>ubiM</i> FW EcoRI |
| Ebp140 | acgctcgagTCAACCGGTCAGTTGTTGGTAATC | <i>ubiM</i> RV Xhol |
| Ebp178 | TTATGTCGGAAGGTCGTgcTATCTGTCGTCGTATC | <i>ubiU</i> (C179A) FW |
| Ebp179 | GATACGACGACAGATAGgcACGACCTCCGACATAA | <i>ubiU</i> (C179A) RV |
| Ebp191 | acgctcgagTTAAGCGCCGGGAGATTTC | <i>ubiTp1</i> FW |
| Ebp192 | cgggatccTGCTGTACCACCAATACAAC | <i>ubiTp1</i> RV |
| Ebp193 | cgggatccTTTTAGCGCAATGGCGTCAG | <i>ubiTp2</i> RV |
| Ebp194 | acgctcgagAGCAGCAATTCATATGGAATTGTTG | <i>ubiTp2</i> FW |
| Ebp237 | ttggtgtagcagcaatttcatatggaattgctatgtttttctgat | mutΔFnr2 FW |
| Ebp238 | atcagaaaaataacatagcaattccatagaaattgctgtaccaccaa | mutΔFnr2 RV |
| Ebp275 | actgaattcaTGTTGGATAAACTGCGTTCCC | <i>ubiT</i> FW |
| Ebp276 | acgctcgagTTAGCATGGTTCACCTACCGATG | <i>ubiT</i> RV Xhol |
| Ebp285 | acgctcgagTTAAAAGCGATTGAAATGCTCG | <i>yhbS</i> RV |
| Ebp287 | CAACTTAACTGCCTTAatcatCAAATTGTCGCAGCAAG | mutFnr1 FW |
| Ebp288 | CTTGCTGCGACAATTTgatgaTTAAGGCAGTTAAAGTTG | mutFnr1 RV |
| Ebp289 | CAGCAATTCATATGGAATTGcatgaTTATACCGCTATGTTATTTTC | mutFnr2 FW |
| Ebp290 | GAAAAATAACATAGCGGTATAatcatgCAATTCATATGAAATTGCTG | mutFnr2 RV |
| Ebp291 | cgggatccTACGACGACAGATAGCAACGAC | <i>ubiU</i> RV BamHI |
| Ebp292 | GCGGTTACCGCCTGGTTGAGTATCACGAGCATTTCAATCGCTTTCCATGGAAAAGAGAAG | <i>yhbS</i> -tag FW |
| Ebp293 | GCGCAGGGTTTGACAGACTGTTAAGCAGTCTGCAAACCCCGGAGACATGAATATCCTCCTTAG | <i>yhbS</i> -tagRV |
| LL710 | AAAACCGCGCCTGAAACCAACAGACATCGTAGGTGAACCATGCTCCATGGAAAAGAGAAG | <i>ubiT</i> -tag FW |
| LL711 | GCAGGGCATCAATACCCGGCGCATCAATGGGAATTTCTACTCGAACATATGAATATCCTCCTTAG | <i>ubiT</i> -tagRV |
| LL715 | aaagagtagttaaagttgtaacaaagtgagctatttacCATATGAATATCCTCCTTA | RV <i>ubiV</i> Wanner |
| LL792 | catttttgcgtttgatagcgaaccttcaggaaaattGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | FW <i>ubiU</i> Wanner |

revealed with polyclonal anti-YbgF antibodies. Fluorescent secondary antibodies were, respectively, IRDye 800 anti-mouse and IRDye 680 anti-rabbit purchased from Li-Cor. Scanning and quantification were performed on a Li-Cor Odyssey-Fc imaging system, reading at 700 nm (for YbgF detection) or 800 nm (for Flag detection).

Transcriptional fusions with GFP

We used several clones from the *E. coli* transcriptional fusions library (23) and we constructed the required additional transcriptional fusions (see above for plasmid construction and Table 2). Δ*fnr* *E. coli* strain was co-transformed with plasmids carrying the *gfp* transcriptional fusions and compatible pBAD24 or pBAD-*fnr* plasmids. Selection plates were incubated at 37°C for 16 hours. Six hundred microliters of LB medium supplemented with kanamycin and ampicillin, and with 0.02% arabinose for pBAD-driven expression, were incubated (four biological replicates for each assay) and grown for 16 hours at 37°C in 96-well polypropylene plates of 2.2-mL wells in anaerobiosis. Cells

were pelleted and resuspended in PBS supplemented with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloramphenicol and incubated at 4°C for 1 hour before fluorescent intensity measurement was performed in a TECAN infinite M200 plate reader. One hundred fifty microliters of each well was transferred into a black Greiner 96-well plate for reading OD_{600 nm} and fluorescence (excitation: 485 nm; emission: 530 nm). The expression levels were calculated by dividing the intensity of fluorescence by OD_{600 nm}, after subtracting the values of a blank sample. These results are given in arbitrary units because the intensity of fluorescence is acquired with an automatic optimal gain and hence varies from one experiment to the other.

Lipid extraction and quinone analysis

Cultures of 2, 5, or 10 mL were cooled on ice for at least 30 minutes before centrifugation at 3,200 $\times g$ at 4°C for 10 minutes. Cell pellets were washed in 1-mL ice-cold PBS and transferred to pre-weighted 1.5-mL Eppendorf tubes. After centrifugation at 12,000 $\times g$ at 4°C for 1 minute, the supernatant was discarded, the cell wet weight was determined, and pellets were stored at -20°C until lipid extraction, if necessary. Quinone extraction from cell pellets was performed as previously described (6). The dried lipid extracts were resuspended in 100 μL ethanol, and a volume corresponding to 1 mg of cell wet weight was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) electrochemical detection-mass spectrometry (ECD-MS) with a BetaBasic-18 column at a flow rate of 1 mL/minute with a mobile phase composed of 50% methanol, 40% ethanol, and 10% of a mix (90% isopropanol, 10% ammonium acetate [1 M], and 0.1% formic acid). When necessary, MS detection was performed on an MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe temperature, 400°C; cone voltage, 80 V). Single-ion monitoring detected the following compounds: UQ₈ ($M+H^+$), m/z 727–728, 6–10 minutes, scan time of 0.2 seconds; $3(^{18}\text{O})\text{-UQ}_8$ ($M+H^+$), m/z 733–734, 6–10 minutes, scan time of 0.2 seconds; UQ₈ ($M+NH_4^+$), m/z 744–745, 6–10 minutes, scan time of 0.2 seconds; and UQ₁₀ ($M+NH_4^+$), m/z 880–881, 10–17 minutes. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time of 0.3 seconds. ECD and MS peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis of the recovery of the UQ₁₀ internal standard and then were normalized to cell wet weight. The peaks of UQ₈ obtained with electrochemical detection or MS detection were quantified with a standard curve of UQ₁₀ as previously described (6).

¹⁸O₂ labeling

MG1655 wild type (wt) and $\Delta ubi1\Delta ubiH\Delta ubiF$ containing, respectively, the pBAD24 empty vector or pBAD-*ubiUV* were grown overnight at 37°C in LB medium supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 0.05% arabinose. These precultures were used to inoculate 20 mL of the same fresh medium at an OD₆₀₀ of 0.05 in Erlenmeyer flasks of 250 mL. The cultures were grown at 37°C, 180 rpm, until an OD₆₀₀ of 0.4–0.5 was reached. An aliquot was taken for lipid extraction and quinone analysis (0 minute of ¹⁸O₂), and 13 mL of each culture was transferred to an Hungate tube. Five milliliter of labeled molecular oxygen (¹⁸O₂) was injected through the septum with disposable syringes and needles, and the incubation was continued at 37°C, 180 rpm for 2 hours. Then 5 mL of each sample was taken for quinone analysis (120 minutes of ¹⁸O₂).

Mouse intestine colonization experiments

Four-week-old female BALB/cByJ were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles) and were acclimatized in a controlled animal facility under specific pathogen-free conditions for 2 weeks prior to the beginning of the colonization assay. Mice were randomly assigned to groups of three or five per cage, and ear punching was used to identify each mouse in a given cage.

The colonization experiments were adapted and performed as previously described (25, 26). Mice were given drinking water containing streptomycin sulfate and glucose (both 5 g/L) for 72 hours to remove existing resident anaerobic facultative microflora.

For the clearance of streptomycin, freshwater devoid of antibiotics and glucose was then given to mice for 48 hours before the inoculation of *E. coli* strains and for the rest of the experiment. To start the competition experiment, the mice were orally inoculated with 200 μL of a mixture in a 1:1 ratio of the two competing strains at $\sim 20,000$ cells/mL in PBS. Mice from each cage were orally inoculated with the same solution of bacteria. An aliquot of inoculum was plated on LB agar containing 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetracycline to compute the input value.

The relative abundance of both competing strains was then monitored for several days post-inoculation in fecal samples. Fecal samples were collected from each mouse in pre-weighed 1.5-mL Eppendorf tubes containing the equivalent of 100- μL glass beads (diameter 0.25–0.5 mm) and 80- μL PBS, and the feces weight was determined. A volume of PBS was then added to each tube to obtain a final concentration of 0.15 g of feces per 1-mL PBS. The feces were homogenized by vortexing for 2 minutes, serially diluted by 10-fold steps up to a 10^5 -fold dilution, and aliquots of 70 μL were plated on LB agar medium containing 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetracycline. The plates were incubated overnight at 37°C and were transferred at 4°C for at least 2 hours the following day, before imaging under blue light which revealed the fluorescent markers carried by each colony. The red and green colonies corresponding, respectively, to MP7 and MP13 strains were counted by an adapted version of ImageJ. Then, the CFU was computed per gram of feces for each strain and a competitive index (CI) was calculated as a ratio of (MP13 mutant CFU/MP7 wt CFU)/(input MP13 mutant CFU/input MP7 wt CFU), where the input CFU was determined from the inoculum for which an aliquot was plated on the day of gavage. The limit of detection in fecal plate counts was 10^2 CFU/g feces. At all time points, the wt strain was detectable on the fecal plates. The absence of CFU count and CI for 1 day in one mouse corresponds to the absence of feces for that day. Significance of CI was calculated by GraphPad Prism using one sample *t*-test compared to one.

RESULTS

Biochemical function of UbiUV *in vivo*

To get further insight into the UbiUVT system *in vivo*, we tested whether the overproduction of UbiU and UbiV could substitute for the three oxygen-dependent hydroxylases UbiI, UbiH, or UbiF. Thus, we cloned the *ubiUV* operon in the pBAD24 vector downstream the arabinose-inducible pBAD promoter (pES154 plasmid). In parallel, we also cloned *ubiUV* upstream the SPA tag encoding sequence to assess the quantities of proteins produced. The pBAD-*ubiUV*-SPA plasmid produces a level of UbiV protein approximately 30-fold higher than that produced by a chromosomal copy of *ubiV-SPA* under anaerobiosis (Fig. S2). After the transformation of mutant strains, selection, and precultures with LB medium in absence of O_2 , growth on M9 succinate was tested as it strictly depends on an aerobic UQ-dependent respiratory chain (Fig. 1). In the presence of an inducer, the pES154 plasmid was able to suppress the growth phenotype of the $\Delta ubiF$, $\Delta ubiH$, $\Delta ubiIK$, and $\Delta ubiIHF$ mutants (Fig. 1A). Note that as a control, we used the *Neisseria meningitidis ubiM* gene that we previously showed to substitute for the growth phenotype of a $\Delta ubiIHF$ mutant (19). Also, in M9 succinate, the $\Delta ubiI$ mutation alone has no growth phenotype and needs to be combined with $\Delta ubiK$ mutation for a defect to be observed (27). To test the importance of the UbiU-bound [Fe-S] cluster, a complementation test was carried out in the same conditions, using a pBAD derivative carrying the *ubiU*(C176A) allele that produces an UbiU variant lacking its [Fe-S] cluster (3). Accordingly, the suppression of $\Delta ubiH$, $\Delta ubiF$, $\Delta ubiIK$, and $\Delta ubiIHF$ was no longer observed (Fig. 1A). In addition, the pES154 plasmid was unable to suppress the growth phenotype of $\Delta ubiA$, $\Delta ubiD$, $\Delta ubiE$, or $\Delta ubiG$ strains (data not shown) and was also unable to suppress the growth phenotype of $\Delta ubiH\Delta ubiA$ or $\Delta ubiH\Delta ubiD$ mutants (Fig. 1B), showing that UbiUV intervene specifically at the hydroxylation steps and otherwise depend on all the other components of the aerobic UQ biosynthesis pathway to do so. These results indicate that in the presence of O_2 , expression of UbiUV can substitute for the O_2 -dependent UbiIHF hydroxylases and that integrity of the UbiU [Fe-S] cluster is required.

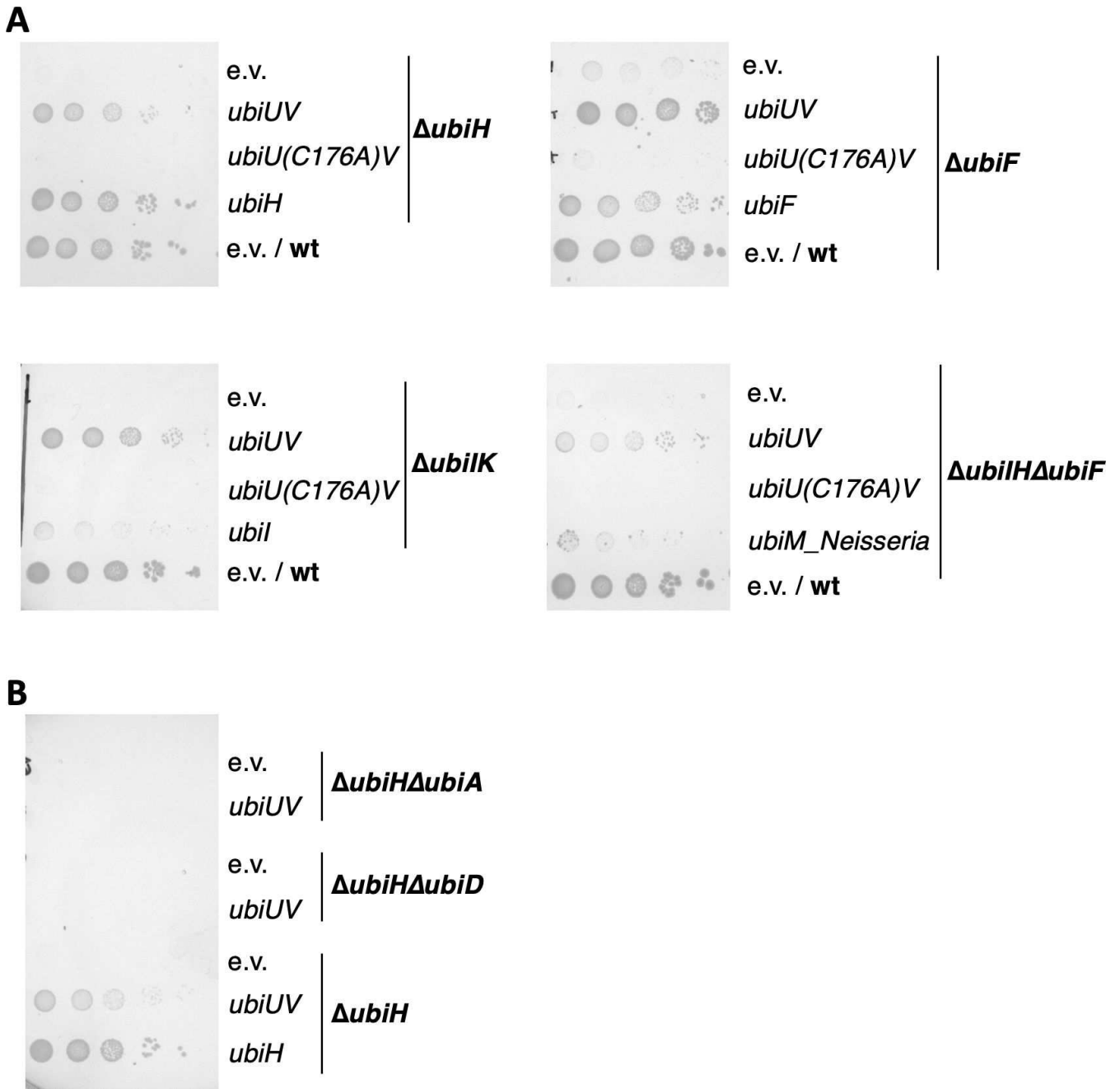


FIG 1 Complementation of *ubil*, *ubiH*, and *ubiF* mutants by pBAD-*ubiUV* in the presence of O₂. (A) *E. coli* mutant strains $\Delta ubiH$ (FBE253), $\Delta ubiF$ (FBE512), $\Delta ubiIK$ (FBE713), and $\Delta ubiH\Delta ubiF$ (FBE650) were transformed by pBAD24 (e.v.), pBAD-*UbiUV*, and pBAD-*UbiU(C176A)V* plasmids. (B) *E. coli* mutant strains $\Delta ubiH\Delta ubiA$ (FBE792), $\Delta ubiH\Delta ubiD$ (FBE793), and $\Delta ubiH$ (FBE253) were transformed by pBAD24 (e.v.) and pBAD-*UbiUV*. (A and B) After selection in the absence of O₂, cultures were washed and serially diluted in minimal medium and then spotted on M9 succinate plates containing 0.02% arabinose and incubated at 37°C for 48 hours (or 96 hours for the $\Delta ubiHF$ series) in aerobic conditions (21% O₂). The results shown are representative of at least two independent experiments.

Remarkably, the expression of the pES154 plasmid was also able to suppress growth defects of the $\Delta ubiJ$ mutant (Fig. 2A). *UbiJ* is an auxiliary factor important for organizing the aerobic Ubi metabolon. We reasoned that suppression was made possible thanks to the presence of the chromosomally encoded *UbiT* that shares sequence similarity with *UbiJ*. To test this, we repeated the complementation test in two new strains, $\Delta ubiH\Delta ubiJ$ and $\Delta ubiH\Delta ubiT$. The pES154 plasmid still complemented the growth defects of the $\Delta ubiH\Delta ubiJ$ mutant, but it was unable to complement the $\Delta ubiH\Delta ubiT$ mutant (Fig. 2B).

Similarly, pES154 was found to suppress the growth defect phenotype of a $\Delta ubiF\Delta ubiJ$ mutant but not a $\Delta ubiF\Delta ubiT$ mutant (Fig. 2C). These results showed that in the presence of O_2 , increased dosage of *ubiUV* genes suppresses the lack of O_2 -dependent hydroxylases UbiF and UbiH in an UbiT-dependent/UbiJ-independent manner.

To confirm that phenotypic suppression was due to UQ₈ synthesis, we quantified the UQ₈ content by HPLC analysis coupled to electrochemical detection (ECD) for all strains described above (Fig. 3A). Results showed that mutant strains lacking UbiI-UbiK, UbiH, and/or UbiF were severely deficient in UQ. The pES154 plasmid-enabled $\Delta ubiH$, $\Delta ubiF$, or $\Delta ubiIH$ strains to synthesize 30%–50% of the UQ level of the wt strain (Fig. 3A, first panel). The levels of UQ obtained in the $\Delta ubiIH\Delta ubiF$ and $\Delta ubiIK$ mutant strains with the pES154 plasmid were much lower. We stress that the UQ levels cannot be directly correlated with the phenotypic analysis (Fig. 1 and 2) since culture media were different (LB versus M9 succinate) to allow the recovery of enough biological material for the HPLC-ECD analyses. Importantly, the pBAD-*ubiU(C176A)V* plasmid was unable to promote UQ synthesis in $\Delta ubiH$ (Fig. 3A, second panel). Last, UQ₈ content assay confirmed that UbiT, but not UbiJ, was necessary for UbiUV to synthesize UQ in aerobic conditions (Fig. 3A, third panel).

The results above showed that UbiUV hydroxylate UQ precursors, when expressed under aerobic conditions. This result raised the possibility that under such conditions, O_2 might be used as a co-substrate of the hydroxylation reactions, as is the case for UbiI, UbiH, and UbiF in wt cells (5). To test this hypothesis, we exposed cells to $^{18}O_2$ and monitored the labeling of UQ by HPLC-ECD-MS. Two hours after $^{18}O_2$ addition, the level of UQ₈ increased in both strains (Fig. 3B). Before adding $^{18}O_2$, the mass spectra of UQ synthesized by wt or $\Delta ubiIH\Delta ubiF$ cells containing pES154 displayed H^+ and NH_4^+ adducts with *m/z* ratio characteristic of unlabeled UQ (Fig. 3C and D). As expected, 2 hours after adding $^{18}O_2$, most of the UQ₈ pool in wt cells contained three $^{18}O_2$ atoms (Fig. 3E), in agreement with O_2 being the co-substrate of the aerobic hydroxylation steps (5). In contrast, we detected only unlabeled UQ₈ in the $\Delta ubiIH\Delta ubiF$ strain expressing UbiUV (Fig. 3F), demonstrating that UbiUV utilizes another oxygen donor than O_2 , even when operating under aerobic conditions.

Altogether, both phenotypic and UQ₈ quantification results allowed us to conclude that UbiU and UbiV, when produced at sufficiently high level, function in the canonical “aerobic” UQ₈ biosynthesis pathway by catalyzing [Fe–S]-dependent hydroxylation of the benzene ring in an O_2 -independent reaction. Remarkably, UbiT is necessary for such aerobic UbiUV-mediated synthesis to occur and cannot be substituted by UbiJ.

The ISC [Fe–S] biogenesis machinery is required for anaerobic UQ biosynthesis

The UbiU and UbiV proteins each contain a [4Fe–4S] cluster, which is essential for the synthesis of UQ₈ in anaerobic conditions (3). Assembly of [4Fe–4S] clusters requires complex biosynthetic machineries, ISC and SUF (28). Therefore, the UQ₈ levels were monitored in Δisc and Δsuf mutants grown in anaerobic conditions (Fig. S3). UQ₈ content in Δisc mutants was strongly impaired (around 15% of the wt), while it was much less affected in Δsuf mutants (60%–80% of the wt). This indicated that the ISC system contributes to anaerobic UQ₈ biosynthesis likely through the maturation of [4Fe–4S] clusters in UbiU and UbiV. An alternative explanation would be that isopentenyl phosphate (IPP), which is the precursor of UQ₈ and whose synthesis depends on [4Fe–4S] containing IspG and IspH proteins, is not efficiently synthesized in the Δisc mutants. However, DMK₈ and MK₈ levels, which also rely on IspG/IspH-synthesized IPP, remained mostly unaltered in the Δisc mutants. It is likely that in this case, the SUF system takes over in a more efficient way as it does for maturing UbiU and UbiV proteins. Collectively, these results showed that the ISC system and to some minor extent the SUF system are necessary for anaerobic UQ₈ biosynthesis.

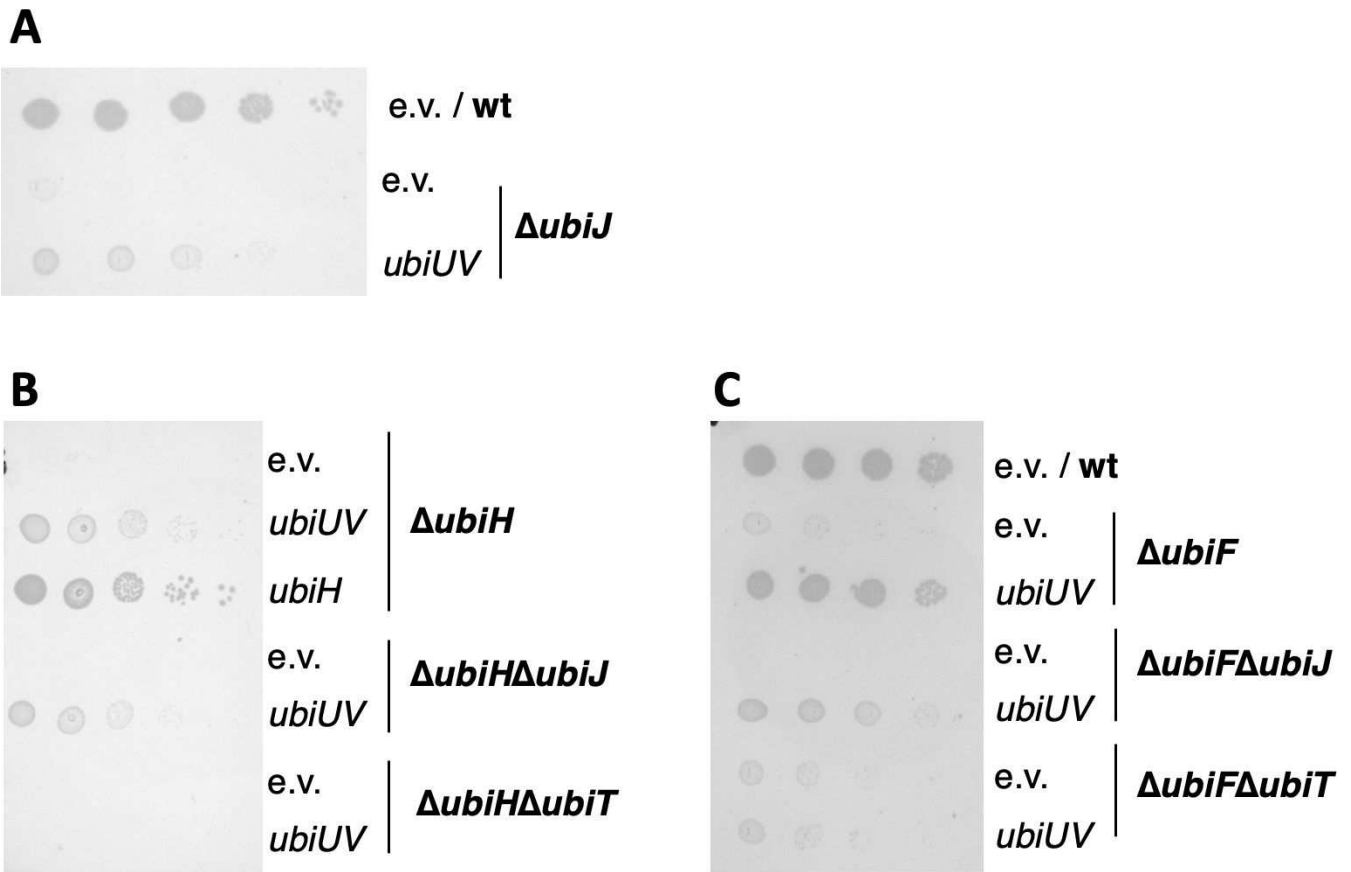


FIG 2 Complementation of *ubiH* and *ubiF* mutants by pBAD-UbiUV is *ubiT* dependent (and *ubiJ* independent). *E. coli* mutant strains were transformed by pBAD24 (e.v.) and pBAD-UbiUV plasmids. After selection in the absence of O₂, cultures were washed and serially diluted in minimal medium and then spotted on M9 succinate plates containing 0.02% arabinose at 37°C in aerobic conditions. The results shown are representative of at least two independent experiments. (A) Strains $\Delta ubiJ$ (FBE514) and wt; (B) strains $\Delta ubiH$ (FBE253), $\Delta ubiH\Delta ubiJ$ (FBE794), and $\Delta ubiH\Delta ubiT$ (FBE795); (C) strains $\Delta ubiF$ (FBE512), $\Delta ubiF\Delta ubiJ$ (FBE264), $\Delta ubiF\Delta ubiT$ (FBE265), and wt.

Anaerobic and microaerobic UQ biosynthesis

Genome-scale studies have predicted that *ubiUV* genes are under the control of the anaerobic Fnr transcriptional activator (29, 30). In contrast, *ubiT* did not appear as a potential Fnr target. This prompted us to investigate the effect of anaerobiosis (0% O₂), microaerobiosis (0.1% O₂), and aerobiosis (21% O₂) on the level of UbiU, UbiV, and UbiT proteins. To follow the quantity of UbiTUV proteins in physiological conditions, we constructed a series of recombinant strains producing the UbiT, UbiU, or UbiV proteins with a C-terminal SPA tag (14) encoded from a gene fusion at their chromosomal loci. We examined protein production by western blot assay using an anti-flag antibody and assessed loading with a polyclonal antibody against YbgF (CpoB). All three UbiTUV-SPA tagged proteins were present in strains grown in anaerobiosis (Fig. 4A) and microaerobiosis (Fig. 4B). In aerobiosis, the production of UbiU and UbiV was no longer observed, whereas a significant level of UbiT was still visible. The contribution of Fnr to anaerobiosis- or microaerobiosis-mediated activation of *ubiU* and *ubiV* genes was confirmed as no cognate UbiU or UbiV-associated band was observed in a Δfnr mutant (Fig. 4A and B). Interestingly, UbiT level was also reduced in the Δfnr mutant in -O₂. Last, to validate the physiological significance of the Fnr regulatory circuit depicted above, we quantified the amount of UQ₈ produced in wt and Δfnr strains, during aerobiosis and anaerobiosis (Fig. 4C). In comparison to the UQ content found in the wt strain in aerobiosis, the level in anaerobiosis was reduced by half. Importantly, we observed that almost no UQ was

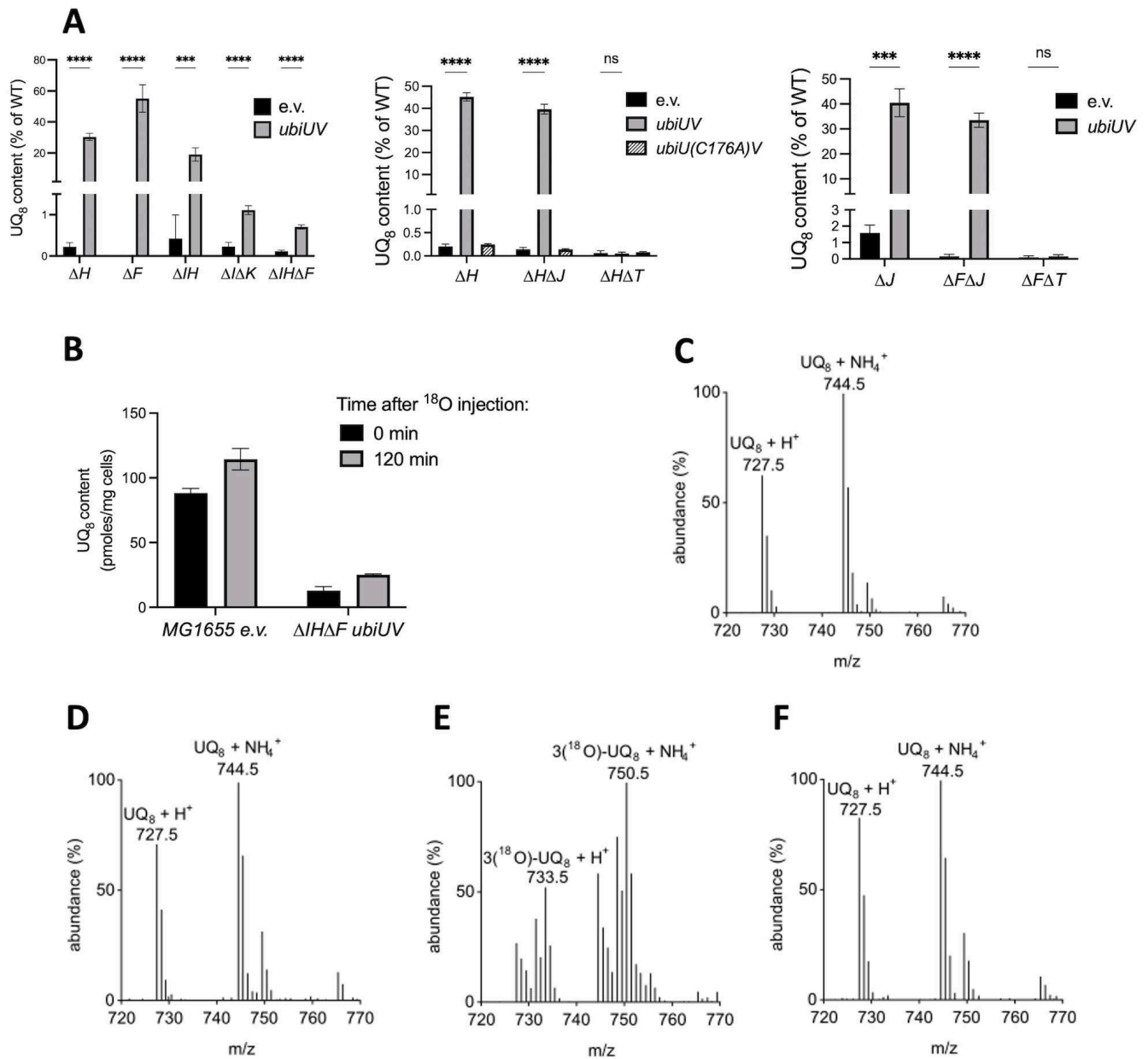


FIG 3 UbiUV restores the UQ₈ content of $\Delta ubiH$ and $\Delta ubiF$ mutants without using O₂ for the hydroxylation steps. (A) UQ₈ content of the indicated strains containing either pBAD (e.v.), pBAD-*ubiUV*, or pBAD-*ubiU(C176A)V* after aerobic growth overnight at 37°C in LB medium. Mean ± SD (*n* = 3 to 4). *****P* < 0.001; *****P* < 0.0001 by unpaired Student's *t*-test. (B–F) Detection of UQ₈ with ¹⁸O₂ labeling. (B) Quantification of UQ₈ content in wt (MG1655) cells containing an empty vector (e.v.) and in $\Delta ubiH\Delta ubiF$ cells containing the pBAD-*ubiUV* vector just before (0 minute) and 2 hours (120 minutes) after adding ¹⁸O₂. Mean ± SD (*n* = 2). (C–F) Mass spectra of UQ₈ from cells shown in B, wt (C and E), and $\Delta ubiH\Delta ubiF$ with pBAD-*ubiUV* (D and F), before (C and D) and 2 hours after (E and F) the addition of ¹⁸O₂. Mass spectra representative of two independent experiments.

detected in the Δfnr mutant (Fig. 4C). This revealed the pivotal role that Fnr plays in allowing UQ₈ synthesis in the absence of O₂.

Genetic control of *ubiUVT* gene expression

Previous genome Chip-seq analysis reported binding of Fnr within the *ubiT-ubiUV* intergenic region. Additionally, in a whole-genome sequence search study, one transcription start site has been described upstream of the *ubiUV* operon (*ubiUV_p*) and two sites described upstream of *ubiT* (*ubiT_{p1}*, *ubiT_{p2}*) (31) (Fig. 5A and B). On inspection of that

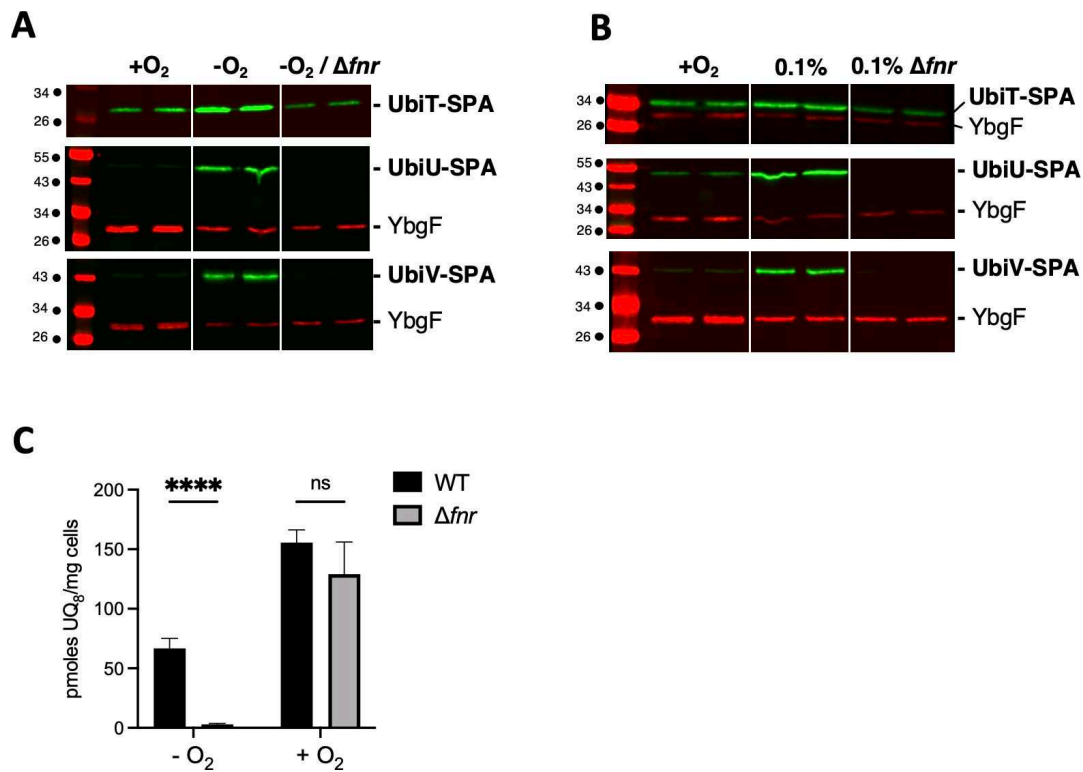


FIG 4 Fnr controls UbiTUV expression and UQ biosynthesis under anaerobiosis. (A and B) *E. coli* strains UbiU-SPA, UbiV-SPA, and UbiT-SPA, and their corresponding Δfnr versions (strains FBE656, FBE789, FBE655, FBE695, FBE696, and FBE694) were grown in LB at 37°C in +O₂ and -O₂ (A) or in +O₂ and 0.1% O₂ (B) and analyzed by western blot: normalized quantities of total protein extracts (in biological duplicate) were separated by SDS-PAGE 12% and detected by western blot using anti-Flag monoclonal antibody for the detection of the SPA tag (green) or anti-YbgF polyclonal antibodies as an internal loading control (red). (C) UQ₈ content of the wild-type and Δfnr (FBE354) strains was assayed after aerobic or anaerobic growth overnight at 37°C in LB medium. Mean \pm SD ($n = 3-4$). **** $P < 0.0001$ by unpaired Student's *t*-test.

region, we were able to identify two potential Fnr-binding sites fitting well with the described Fnr-binding consensus. The F1 site, reading TTGATTTAAGGCAG is located 36 nucleotides (nt) upstream the *ubiUV_p* transcription start site (Fig. 5A). The F2 site reading TTGATTATACCGC locates 33 nt upstream the proximal +1 transcription starting site *ubiT_{p2}* and 19 nt downstream the distal *ubiT_{p1}* (Fig. 5A and B).

To detail the molecular mechanism of regulation and to dissect the promoter organization of the intergenic region between *ubiUV* and *ubiT*, we used transcriptional fusions with GFP (23). We used four different transcriptional fusions encompassing *ubiUV_p*, *ubiT_{p1}*, *ubiT_{p2}*, and a construction *ubiT_{p1p2}* containing the two promoters of *ubiT* (Fig. 5B). We compared the expression of these transcriptional fusions in anaerobiosis, in a Δfnr mutant complemented or not with a pBAD-*fnr* plasmid. The *ubiUV_p* and *ubiT_{p2}* promoters were strongly activated in the presence of pBAD-*fnr*, whereas the *ubiT_{p1}* promoter was not (Fig. 5C and D). This suggested that the *ubiUV_p* promoter was activated by Fnr binding to the F1 site and that the *ubiT_{p2}* promoter was activated by Fnr binding to the F2 site. When we introduced mutations in the F1-binding site (five mutated nucleotides; mutF1; Fig. 5A), the activation of the expression from the *ubiUV_p* transcriptional fusion was severely reduced (Fig. 5C). Mutations of the F2 site (mut Δ F2 complete deletion or mutF2 with five mutated nucleotides; Fig. 5A) also affected the expression of the *ubiT_{p1p2}* transcriptional fusion, but a basal level of expression was maintained, probably due to the expression from the distal *ubiT_{p1}* promoter (Fig. 5E).

Next, we introduced the same mutations in the F1 and F2 Fnr-binding sites at the locus in the *ubiU-ubiT* intergenic region in the chromosome of the strains producing UbiV-SPA or UbiT-SPA tagged proteins. Mutation within the F1 site upstream *ubiU* completely prevented the production of UbiV in the absence of O₂ (Fig. 5F). Mutation

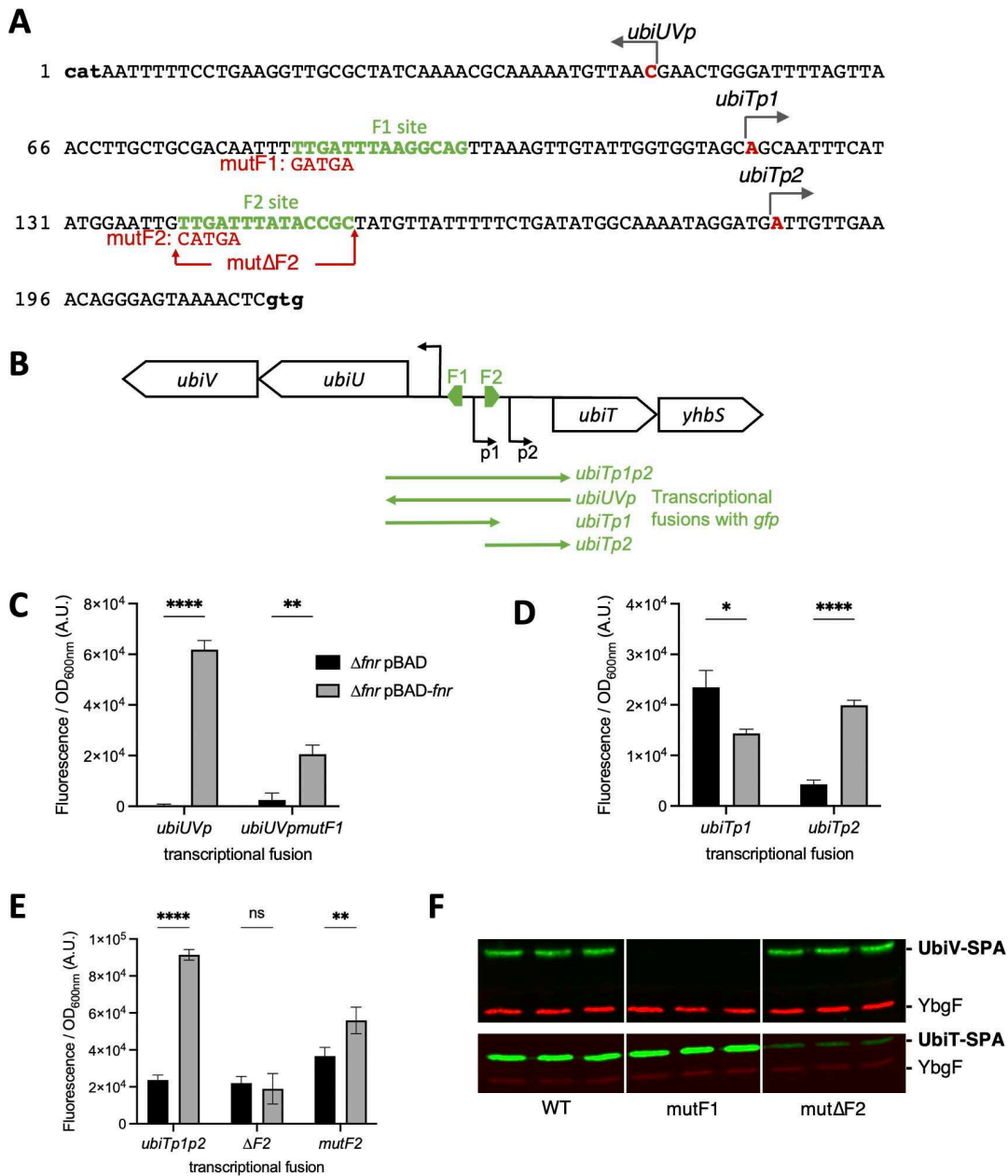


FIG 5 (A) Organization of the promoter region of *ubiUV* genes. The sequence of the intergenic region between *ubiU* and *ubiT* genes is shown, from the start codon of *ubiU* to the start codon of *ubiT* (both indicated in bold at the extremities of the sequence). The transcription start sites as determined in (31) are indicated in red. The two Fnr-binding sites F1 and F2 are indicated in green. The *mutF1*, *mutF2*, and *mutΔF2* mutations introduced in the transcriptional fusions are depicted in red. (B) Limits of transcriptional fusions used in panels C–E. (C–E) Activity of the transcriptional fusions with or without *fnr* expression. Δfnr *E. coli* strain was co-transformed by pBAD24 or pBAD-*fnr* together with the indicated transcriptional fusions. After overnight growth of four biological replicates at 37°C in LB in anaerobiosis, GFP levels were quantified. Errors bars indicate the SD. * $P < 0.1$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ by unpaired Student's *t*-test. (F) Role of the Fnr sites in UbiTUV physiological levels. *E. coli* strains UbiV-SPA and UbiT-SPA, without (wt) or with the indicated mutation in the F1- or F2-binding sites, were grown in LB overnight at 37°C in the absence of O₂. Normalized quantities of total protein extracts (in biological triplicate) were separated by 12% SDS-PAGE and detected by western blot using anti-Flag monoclonal antibody for the detection of the SPA tag (green) or anti-YbgF polyclonal antibody as an internal loading control (red).

within the F2 site upstream the proximal *ubiTp2* promoter prevented the induction of *ubiT* in the absence of O₂, without altering the basal level of UbiT-SPA observed in the presence of O₂ (Fig. 5F; Fig. S4). Notably, the mutation in the F1-binding site did not

affect the expression of *ubiT* and conversely, the mutation of the F2-binding site did not affect the expression of *ubiV*.

Altogether, these results showed that Fnr activates *ubiUV* transcription under anaerobiosis, while *ubiT* expression can be triggered from two promoters, one aerobically active (P1) and the other anaerobically active (P2) under Fnr control.

Physiological role of UbiUVT at different O₂ levels

We have previously reported that UbiU, UbiV, and UbiT are essential for the anaerobic synthesis of UQ in *E. coli* when grown in LB, glycerol/DMSO, or lactate/NO₃⁻ (3). However, the contribution to *E. coli* physiology of UQ synthesized by UbiUVT in anaerobic conditions was not investigated in detail. We made use of a set of mutants altered in aerobic (*ubiH*) or anaerobic (*ubiUV*, *ubiT*) UQ₈ synthesis, as well as mutants altered in DMK/MK biosynthesis (*menA*) to assess the contribution of each type of quinone for growth in a wide range of O₂ level, 21% (aerobic), 0.1% (microaerobic), and 0% O₂ (anaerobic), and with varying carbon sources (e.g., glycerol or glucose) and electron terminal acceptors (e.g., O₂ or NO₃⁻).

In the presence of glycerol and NO₃⁻ under aerobic conditions (Fig. 6, upper left panel), $\Delta ubiUV$ and $\Delta ubiT$ strains showed no growth phenotype. In such conditions, while NO₃ is present, O₂ is used for respiration. This contrasted with the $\Delta ubiH$ mutant, which was severely affected. Combining $\Delta ubiH$ and $\Delta ubiUV$ bore no aggravating effect. In contrast, combining both $\Delta ubiH$ and $\Delta menA$ had an aggravating effect, indicating that in addition to UQ, DMK and/or MK can support *E. coli* growth even in aerobiosis, as previously suggested (32). In microaerobic conditions (Fig. 6, upper center panel), no phenotype was observed for $\Delta ubiUV$ or $\Delta ubiT$ strains. In contrast, the $\Delta menA \Delta ubiH$ strain still exhibited a clear defect, suggesting that *ubiUV* and *ubiT* do not bear a prominent role in NO₃⁻-dependent respiratory metabolism under microaerobic conditions, despite being expressed in microaerobiosis (see above). This notion was also supported by the fact that at 0.1% O₂, the $\Delta ubiH$ and $\Delta ubiH \Delta ubiUV$ strains did not show any phenotype. At 0.1% O₂, UQ-dependent metabolism through cytochrome *bd* or *bo* oxidases would remain inconsequential, and cells presumably rely on DMK/MK-dependent metabolism for anaerobic respiration (33). Last, in anaerobic conditions, with NO₃⁻ used for respiration, $\Delta ubiUV$, $\Delta ubiT$, and $\Delta menA$ strains showed wt-like growth phenotype (Fig. 6, upper right panel). However, combining $\Delta menA$ and $\Delta ubiUV$ mutations or $\Delta menA$ and $\Delta ubiT$ mutations drastically hampered NO₃⁻ respiratory capacities. In fact, the growth of these mutants on M9 glycerol NO₃⁻ was barely better than a Δfnr strain (Fig. 6), which was used as a control since it was shown that such strain is unable to respire nitrate but can still use glucose anaerobically (34). These results indicated that anaerobically UbiUVT-synthesized UQ and MK are fully interchangeable electron carriers during NO₃⁻ respiration under full anaerobiosis (35). Furthermore, we could exclude that the aerobic UQ biosynthetic pathway could contribute to growth in such conditions as the $\Delta ubiH$ and $\Delta menA \Delta ubiH$ mutants exhibited no growth phenotype.

In the presence of glucose as a carbon source and under aerobiosis, $\Delta ubiUV$ and $\Delta ubiT$ mutants exhibited wt-like growth capacity (Fig. 6, left middle panel). The $\Delta ubiH$ mutant showed some slower growth, but a most spectacular negative additive effect was observed on combining $\Delta ubiH$ and $\Delta menA$ mutations. It likely points out a role for DMK/MK in aerobic electron transport (36). In anaerobiosis, neither $\Delta ubiH$ nor $\Delta menA$, alone or in combination, showed defect in the presence of glucose as a carbon source (Fig. 6, middle right panel). In contrast, $\Delta menA \Delta ubiUV$ or $\Delta menA \Delta ubiT$ mutants exhibited additive growth defects (Fig. 6, middle right panel). This indicated that the UbiUVT-biosynthesized UQ was crucial for growth in glucose fermentative conditions, in the absence of MK. A possibility was that this negative effect reflected auxotrophy for uracil, whose synthesis depends on electron transfer from PyrD dihydroorotate dehydrogenase to fumarate reductase (FrdABCD) via quinones in anaerobiosis (37). As a matter of fact, adding uracil to the medium had a rescuing effect (Fig. 6, lower right panel), supporting the notion that uracil deficiency was responsible for the growth defect observed in the

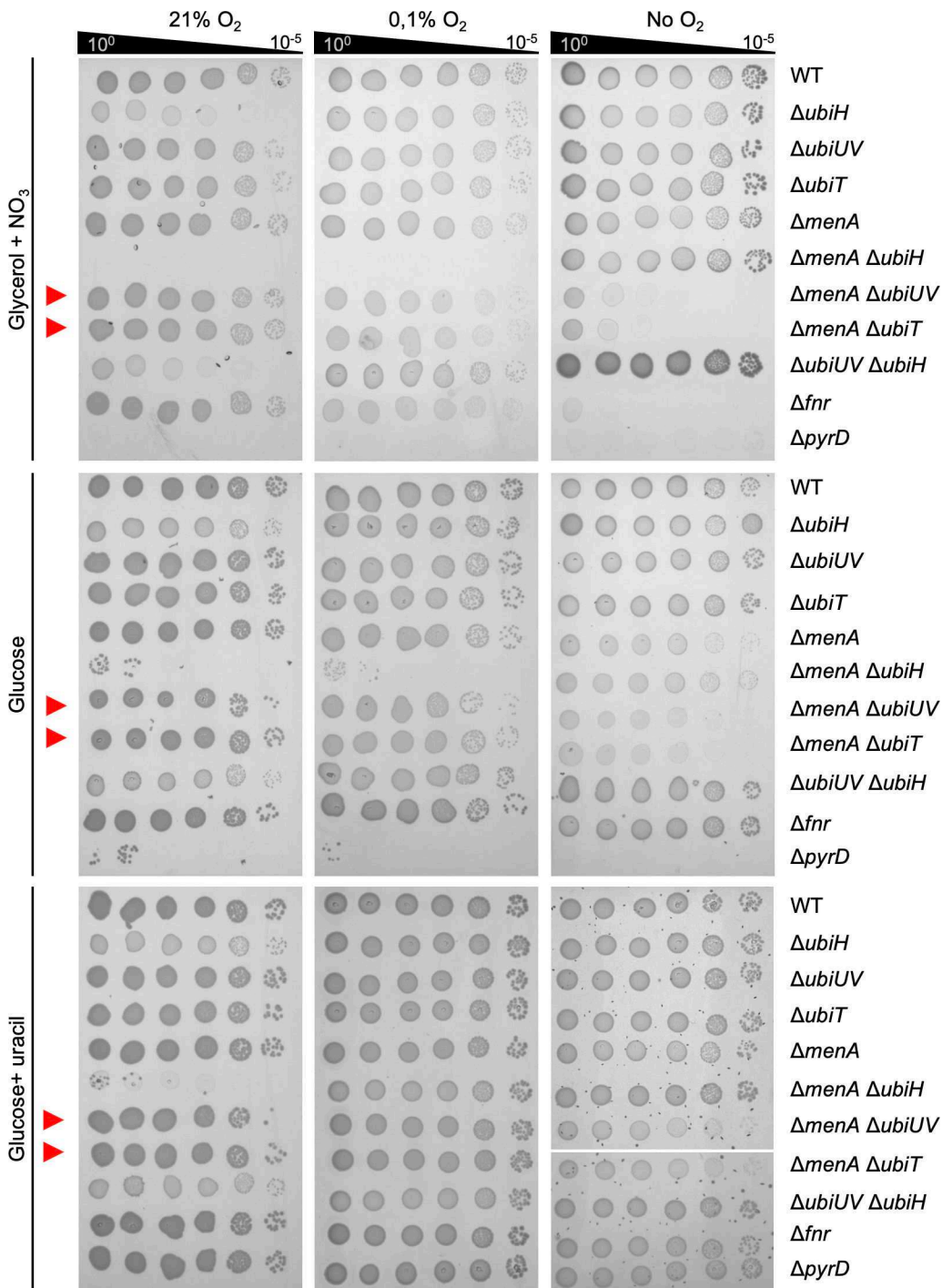


FIG 6 Role of *ubiUV* in anaerobic growth. *E. coli* wt and strains devoid of the MK/DMK ($\Delta menA$), UQ synthesis pathways— aerobic ($\Delta ubiH$) and anaerobic ($\Delta ubiUV$ or $\Delta ubiT$)—and controls for anaerobic growth (Δfnr) and auxotrophy for uracil ($\Delta pyrD$) were grown aerobically at 37°C in LB medium or LB glucose 0.2% (for $\Delta menA \Delta ubiH$), washed, and resuspended in M9 medium without carbon source to OD₆₀₀ of 1. Serial dilutions were spotted in agarose M9 medium plates supplemented with carbon source (glycerol or glucose), KNO₃, or uracil and incubated at 37°C at the indicated O₂ concentration until growth was observed. Experiments were performed in triplicates and confirmed with at least four independent biological replicates.

$\Delta ubiUV \Delta menA$ mutant in anaerobiosis. This was an important observation as early studies had proposed that the PyrD/FrdABCD electron transfer chain relied mostly on MK/DMK and marginally, if at all, on UQ (37). Our observation clearly shows that

anaerobically synthesized UQ can also allow the functioning of PyrD. Incidentally, we noticed that the addition of uracil did not rescue the growth defect of the $\Delta menA \Delta ubiH$ mutant in aerobiosis, but we have no explanation for this observation.

Contribution of the O₂-independent UQ biosynthesis pathway to mouse intestine colonization

Since enterobacteria evolve mostly in anaerobic conditions in their natural habitat, we evaluated the physiological importance of the O₂-independent UQ biosynthesis pathway in the mouse intestine. To do so, we performed competition experiments between two isogenic strains, MP7 and MP13, which respectively express mCherry and GFP in the presence of tetracycline (22). We deleted *ubiUV* in the MP13 background and confirmed, as expected, that this strain was deficient for UQ₈ when grown anaerobically (Fig. S5A). MK was previously shown to be important for the efficient colonization of the mouse intestine by *E. coli* (38). Thus, we also constructed a $\Delta menA$ mutant in the MP13 background. We checked that the deletion of $\Delta menA$ abrogated the synthesis of DMK and MK (Fig. S5B and C). The fitness of the $\Delta ubiUV$ and $\Delta menA$ mutants was tested in competition experiments with the MP7 wt strain. We monitored the abundance of each strain in the feces of mice up to 10 days after co-inoculation by oral gavage (Fig. 7A). In both experiments, the total CFU count reached $\sim 10^8$ /g of feces 24-hour post-inoculation (Fig. 7B and C; Fig. S6A and B) and then gradually decreased to $\sim 10^5$, showing efficient colonization of the MP7 strain. The abundance of the *ubiUV* mutant was slightly decreased compared to wt (Fig. 7B; Fig. S6A), which translated into an average CI <1 (Fig. 7D; Fig. S6C) at days 1, 2, 4, and 10. We noticed, however, a rather high inter-individual variability (Fig. S6C). In contrast, the $\Delta menA$ mutant was markedly less abundant than the wt (Fig. 7C; Fig. S6B) and was even undetectable at day 10. CI <1 were observed for every mouse at every sampling (Fig. 7E; Fig. S6D), and the values obtained were much lower than in the case of the *ubiUV* mutant. Collectively, these data confirm that DMK/MK is the most important quinone for the physiology of *E. coli* in the mouse intestine (38). However, they also reveal a contribution, albeit minor, of the O₂-independent UbiUV-mediated UQ biosynthesis pathway.

Role of UbiT within the anaerobiosis–aerobiosis shift

Phenotypic analysis above revealed that anaerobically UbiUVT-synthesized UQ₈ was contributing to growth via glucose fermentation or NO₃[−] respiration. In both conditions, anaerobic UbiUVT-synthesized UQ₈ was functionally redundant with anaerobically synthesized DMK/MK. Because UQ₈ is crucial under aerobiosis, we wondered whether anaerobically synthesized UQ₈ might prepare the cells to adapt to an aerobic environment, that is, before the aerobic UbiIHF-dependent synthesis takes over. Thus, we investigated the role of UbiUVT-synthesized UQ₈ in the anaerobiosis–aerobiosis transition.

First, we used $\Delta menA \Delta ubiH$ and $\Delta menA \Delta ubiUV$ strains that only produce UQ₈ under anaerobiosis and aerobiosis, respectively. Strains were grown in LB supplemented with NO₃[−] under anaerobic conditions for 24 hours, then switched to aerobic conditions with succinate as a carbon source, that is, in conditions wherein growth strictly relies on UQ₈ (35). The wt strain showed differential efficiency in shifting from anaerobiosis to aerobiosis as compared with the $\Delta menA$ and $\Delta menA \Delta ubiUV$ strains. Indeed, by taking the end of the lag period at the time point at which growth resumes an upward trajectory, lag periods were 2 hours for the wt and 7 hours for the $\Delta menA$ and the $\Delta menA \Delta ubiUV$ mutant strains (Fig. 8A). This suggested that UbiUVT-synthesized UQ₈ does not bear a significant influence on the shift between anaerobiosis and aerobiosis. Eventually, all three strains showed the same growth rate in the exponential phase and reached the same final OD₆₀₀ value, suggesting that the UbiIHF-synthesized UQ₈ was activated and provided UQ₈ in extended aerobic conditions. To confirm this hypothesis, we re-inoculated these cells into the same medium (Fig. 8A, refresh), and as expected we

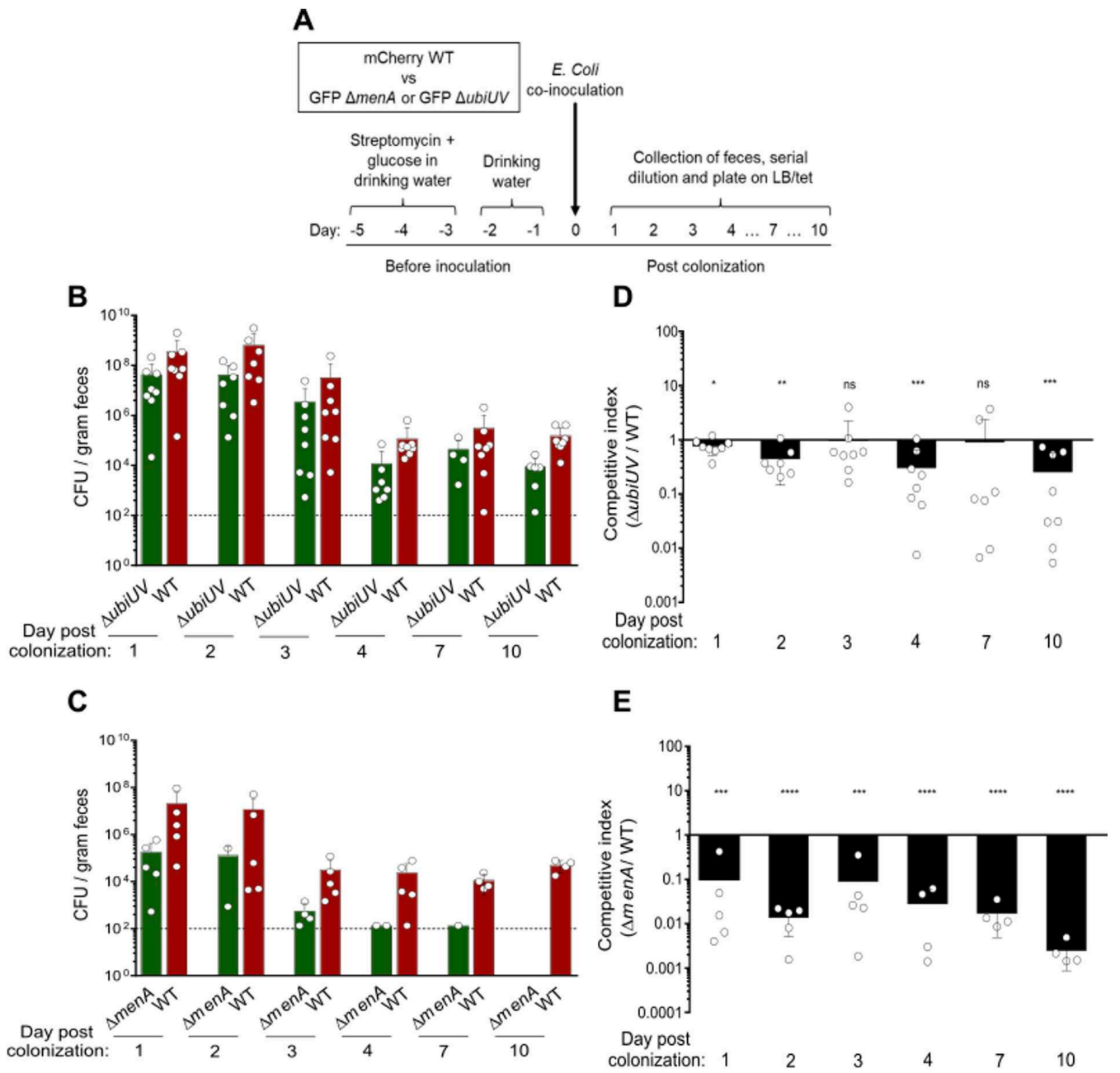


FIG 7 Quinones contribute differently to the colonization of the mouse gut by *E. coli*. (A) Schematic representation of the experimental protocol for the mouse intestine colonization competitions, adapted from Ref. (25). (B and C) Total CFU counts (B) and associated competitive index (CI) (C) in feces of mice after oral co-inoculation with a 1:1 ratio of MP7 wt and MP13 $\Delta ubiUV$ strains. (D and E) Same as panels B and C with MP7 wt and MP13 $\Delta menA$ strains. The limit of detection of 10^2 CFU is indicated as dotted line. Mean \pm SD, each white circle represents values for individual mice ($n = 5$ and 8), circles missing corresponds to the absence of feces for that day. ns, not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ by one sample *t* test. Changes in total CFU counts and CI throughout the experiment in each mouse are shown in Fig. S6.

observed that lag periods were the same for all three strains, indicating that they had accumulated the same level of UQ₈ since the beginning of the growth.

Surprisingly, the $\Delta menA\Delta ubiH$ mutant—a strain defective for the aerobic UQ₈ synthesis pathway—was able to grow after the transition to aerobic conditions, with the same lag period as the $\Delta menA$ and $\Delta menA\Delta ubiUV$ mutant strains, that is, 7 hours. This showed that UbiUVT-synthesized UQ₈ in the $\Delta menA\Delta ubiH$ allowed a shift from anaerobiosis to aerobiosis. Yet, the $\Delta menA\Delta ubiH$ strain showed a slower and shorter exponential

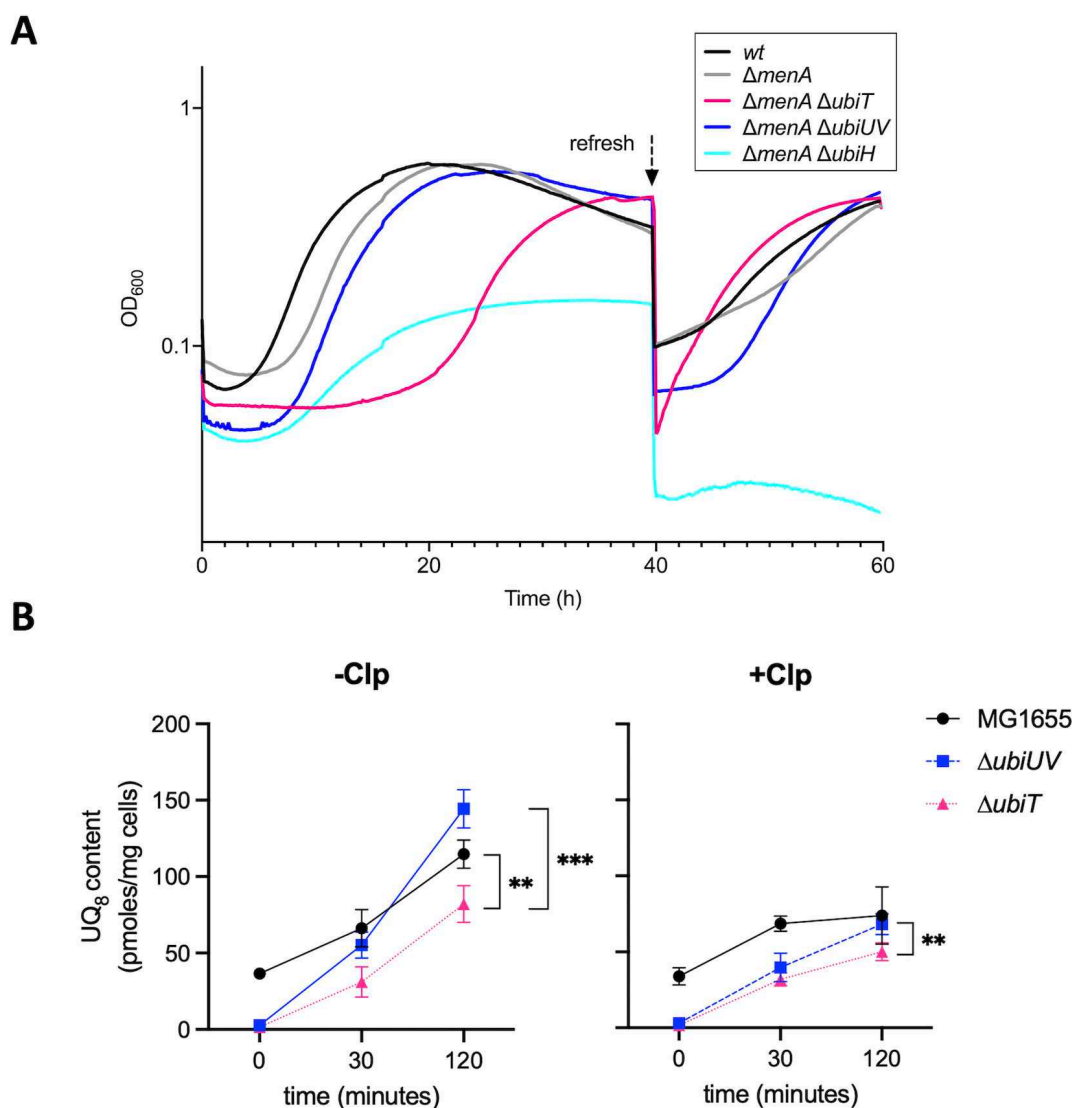


FIG 8 Role of *ubiUVT* in the anaerobic to aerobic transition. (A) *E. coli* wt and strains devoid of the MK/DMK ($\Delta menA$) and UQ aerobic ($\Delta ubiH$) and anaerobic ($\Delta ubiUV$ or $\Delta ubiT$) synthesis pathways were grown anaerobically in LB KNO₃ medium, washed in M9 medium without carbon source, and resuspended in M9 succinate medium to OD₆₀₀ = 0.02. Growth was followed aerobically at 37°C in a TECAN microplate reader in three independent experiments. At 40 hours of growth, cells were diluted 1/100 in the same medium (refresh), and growth was resumed for 20 hours more. (B) *E. coli* wt (MG1655), $\Delta ubiUV$, and $\Delta ubiT$ strains were cultured anaerobically in LB medium containing NO₃⁻ as final electron acceptor until OD ~ 1. After 20 minutes of treatment with chloramphenicol (+Clp) at 200 μ g/mL or without chloramphenicol (-Clp) under anaerobic conditions, the cultures were shifted to ambient air for a 2-hour incubation. UQ₈ content was quantified before (0 minutes) or after oxidic transition (30 minutes and 120 minutes) by HPLC-ECD of lipid extracts from 1 mg of cells. Quantifications are expressed as picomole per milligram of cells ($n = 4$ biological replicates). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by unpaired Student's *t*-test. Mean \pm SD is indicated.

phase and a lower final OD₆₀₀ value as compared with the wt, $\Delta menA$, and $\Delta menA \Delta ubiUV$ strains. Then, as expected, the $\Delta menA \Delta ubiH$ mutant failed to resume growth in reinoculation in a fresh medium, indicating that the level of anaerobically UbiUV-synthesized UQ₈ failed to sustain protracted aerobic growth (Fig. 8A). The fact that anaerobically synthesized UQ₈ has a positive, yet minor effect on the anaerobic-aerobic transition, somehow contradicted the first conclusion reached when studying the $\Delta menA$ and $\Delta menA \Delta ubiUV$ mutant strains (see above). A possible explanation is that in the $\Delta menA \Delta ubiUV$ strain, newly synthesis of UQ₈ by UbiIHF might be quick enough to compensate for the lack of UbiUV-synthesized UQ₈.

UQ₈ content was subsequently measured over a shorter time period during the transition from anaerobic to aerobic conditions in a separate experiment (Fig. 8B). For

this, cultures in LB of $\Delta ubiUV$ or $\Delta ubiT$ mutants were subjected or not to chloramphenicol (Clp) treatment prior to the shift, and samples were taken at 0 minute, 30 minutes, and 120 minutes for UQ₈ quantification. UQ₈ level increased with time in both the wt and the $\Delta ubiUV$ mutant, but in the 30–120 minute period, it stopped increasing in the presence of translation inhibitor Clp. The likeliest explanation is that UQ₈ biosynthesis is driven by UbiUV before the shift and later *de novo* synthesized by UbiIHF in aerobic conditions. This suggested that the three hydroxylases UbiI, H, and F were already present under anaerobiosis, in a standby state, waiting for O₂ to allow hydroxylation. Importantly, this was confirmed as levels of UbiI, H, and F proteins were found to be similar in both aerobic and anaerobic conditions (Fig. S7). Also, this is consistent with the hypothesis of a very quick synthesis of UbiIHF-synthesized UQ₈ (see above).

Second, the role of the accessory factor, UbiT, was investigated using the $\Delta menA \Delta ubiT$ mutant. As described before, the $\Delta menA \Delta ubiT$ strain was grown first in LB with NO₃⁻ under anaerobiosis, subsequently shifted in succinate minimal medium, and growth was monitored. A most unexpected and spectacular effect was observed as a lag period with this strain in these conditions was approximately 20 hours whereas that of the wt was approximately 2 hours (Fig. 8A). The $\Delta menA \Delta ubiT$ strain finally reached a final OD₆₀₀ value similar to WT, $\Delta menA$, $\Delta menA \Delta ubiUV$ strains at 40 hours and also resumed growth on re-inoculation at 40 hours (Fig. 8A). This highlighted a crucial role of UbiT in the anaerobic–aerobic transition phase. This result was strengthened by direct quantification of UQ₈ synthesized with time after shifting cultures from anaerobiosis to aerobiosis (Fig. 8B). The $\Delta ubiT$ mutant exhibited a two-fold reduction in UQ₈ as compared with the $\Delta ubiUV$ mutant after the shift. When Clp was added, the difference was much smaller. This confirmed that UbiT is necessary at the onset of aerobic UQ₈ biosynthesis, presumably via the UbiIHF complex.

The *yhbS* gene is not involved in UQ₈-based metabolism

The *yhbS* gene predicted to encode an acetyltransferase lies downstream the *ubiT* gene (Fig. S8A). It was recently proposed to intervene in small noncodingRNA (sncRNA)-mediated expression control (39). Using RT-PCR, we showed that *yhbS* and *ubiT* genes share a single transcription unit (Fig. S8B). Using YhbS-SPA tag protein, we observed that YhbS protein synthesis takes place both under aerobiosis and anaerobiosis. The level of YhbS-SPA protein appears slightly higher in $-O_2$, and this induction seems to be lost in the Δfnr mutant, as expected if *yhbS* and *ubiT* genes are co-expressed and co-regulated by Fnr (Fig. S8C). The $\Delta yhbS$ mutant shows no defect in NO₃⁻ respiratory capacity, and no aggravating effect was observed on combining $\Delta yhbS$ and $\Delta menA$ mutations (Fig. S8D). Last, we carried out shift experiments, from $-O_2$ to $+O_2$, as described above for *ubiT* and failed to identify any defect in the $\Delta yhbS$ mutant (not shown). Altogether with previous assays failing to reveal a defect in UQ₈ levels in anaerobiosis in the $\Delta yhbS$ mutant (3), these results allowed us to rule out a role of YhbS in UQ₈ synthesis.

DISCUSSION

UQ is an essential component of electron transfer chains and of respiratory metabolism. For decades, the dogma has been that UQ was exclusively used for aerobic respiratory metabolism, whereas DMK/MK was used for electron transfer in anaerobic respiratory chains. Following our recent discovery that UQ is also synthesized under anaerobiosis, which contradicted the above assumption (3), the present study identified two versatile anaerobic physiological processes that rely on the anaerobic UQ biosynthesis pathway, namely NO₃⁻ respiration and uracil biosynthesis. Moreover, we provide clear evidence that UbiUV catalyzes hydroxylation steps independently from O₂. Last, UbiT was found to play a key role in both anaerobiosis and aerobiosis conditions, allowing a smooth transition between the two conditions. Overall, this analysis uncovers a new facet of the strategy used by *E. coli* to adapt to changes in O₂ levels and respiratory conditions. This is of particular interest in the context of gut microbiota studies, as changes in O₂ level and

in respiratory electron acceptors are key factors that the host uses to select the type of flora present through the different sections of the intestine (40).

UbiUV-mediated UQ synthesis takes place under anaerobiosis. Here we showed that this is made possible by Fnr-mediated activation of expression of the *ubiUV* operon that takes place from microaerobiosis (0.1% O₂) to anaerobiosis. In contrast, expression of the *ubiT* gene is more versatile with two promoters, one under Fnr control, allowing UbiT synthesis under microaerobiosis and anaerobiosis, simultaneously with UbiUV, and the second constitutive one, insuring expression in aerobiosis. This genetic regulation is consistent with the presence of UbiT proteins under both aerobic and anaerobic conditions. Such a versatile expression meets with other evidence we collected, which together pave the way to an important role of UbiT in the anaerobiosis to aerobiosis transition: (i) UbiT is required for insuring continuous UQ synthesis on shifting from anaerobiosis to aerobiosis, (ii) *ubiT* was found to compensate for the lack of *ubiJ* in conditions where high dosage of *ubiUV* genes suppressed absence of *ubilHF* under aerobiosis, and (iii) UbiHF enzymes are present in anaerobiosis but not active as one would expect for O₂-dependent hydroxylases. This indicates that the O₂-dependent pathway is in a standby mode in anaerobic conditions, waiting only for the presence of O₂ to activate the O₂-dependent hydroxylases and produce UQ, as proposed previously (41). This is also consistent with the fact that UbiUV synthesis is strictly controlled at the transcriptional level, whereas expression of *ubilHF* is constitutive. Altogether, this leads us to propose that UbiT and UbiJ are required for the formation of two related but distinct metabolons, respectively, an anaerobic one containing UbiUV and an aerobic one containing UbiHF. Besides, both UbiJ and UbiT are likely to bind UQ biosynthetic intermediates via their SCP2 domain, thereby providing the substrates to UbiUV and UbiHF (9, 42).

UbiUV catalyzes hydroxylation of the benzene ring in the absence of O₂. Moreover, our results show that they can substitute for aerobic hydroxylases UbiHF in the presence of O₂, but that they still catalyze the hydroxylation without relying on O₂ in this condition. This raises the question of the source of the O atom under anaerobiosis. Previous analysis on RhIA, a member of the U32 protein family to which UbiU and V belong, indicated that prephenate, an intermediate within the aromatic amino acid biosynthesis pathway, could act as an O donor (11). Our ongoing studies aim at investigating such a possibility in the case of anaerobic UQ biosynthesis. [Fe–S] clusters seem to play a role in the process since *isc* mutants devoid of anaerobic [Fe–S] biogenesis machinery and UbiU variant lacking [Fe–S] cluster fail to produce UQ. The simplest hypothesis is that [Fe–S] clusters are transferring electrons from the O source to a terminal reductase, both to be identified.

UbiUVT-synthesized UQ has a significant contribution to growth in anaerobiosis and microaerobiosis (0.1% O₂). Indeed, we found that UbiUVT-synthesized UQ are key for NO₃⁻ respiration in the absence of DMK, in agreement with early biochemical work on formate-nitrate reductase (37) and with our previous study reporting that *P. aeruginosa*-denitrifying activity depends on UbiUVT-synthesized UQ (42). Moreover, we observed that the anaerobically synthesized UQ greatly contributes to uracil synthesis. This was unexpected as uracil synthesis was reported to depend mainly on the oxidation of (S)-dihydroorotate to orotate with fumarate as a hydrogen acceptor and DMK/MK as an electron carrier (37). Our present physiological studies demonstrate that the anaerobically produced UQ can fully compensate for the DMK/MK loss, likely through an as yet unknown reductase since UQ is too electropositive to be a frdABCD substrate (43). Last, UQ could be used as an electron sink to other catabolic processes taking place in both aerobiosis and anaerobiosis such as heme biosynthesis, wherein the HemG enzyme utilizes UQ or MK for the conversion of protoporphyrinogen IX into protoporphyrin IX (44).

The contribution of anaerobically synthesized UQ for *E. coli* multiplication in the gut appeared as marginal. This implies that either absence of UV-synthesized UQ was masked by MK/DMK synthesis or anaerobic UQ-dependent processes such as NO₃⁻

respiration or uracil biosynthesis is dispensable. Clearly, the first possibility is the likeliest given the paramount importance of anaerobic respiration for *E. coli* multiplication in the gut (45, 46), as nicely confirmed by the drastically altered multiplication of MK/DMK-deficient cells (Fig. 7). This is of particular interest as the presence and nature of respiratory electron acceptors were proposed to be drivers of bacterial community composition in the different regions of the intestine (40). Likewise, the relatively high O₂ level in the duodenum, of NO₃⁻ in ileum, and hypoxia in the cecum were proposed to be causal of the different flora hosted in these regions in a healthy host. Strategies used by *E. coli* to live in such different respiratory and fermentative conditions are therefore key aspects of its adaptation to the host. In this context, it is important to understand the mechanism underlying the switch from O₂-rich to NO₃⁻-rich and/or hypoxic compartments, and the present study highlights the added value of having overlapping systems permitting a smooth shift from anaerobic NO₃⁻ to aerobic respiration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marc Fontecave and Murielle Lombard from College de France, and the members of the SAME unit at Pasteur for discussion and help. We thank Mark Goulian (University of Pennsylvania, USA) for providing the MP7 and MP13 *E. coli* strains and Laurent Loiseau for providing the UbiUVT SPA-tagged strains. We gratefully acknowledge the help of TrEE team members with the mouse intestine colonization experiments, Françoise Blanquet, Dalil Hannani, Clément Caffaratti, and Amélie Amblard. We are also grateful to Arnold Fertin for developing the ImageJ plugin used for the automatic counting of red and green colonies.

This project was supported by Institut Pasteur and CNRS and by grants from the ANR (ANR-10-LABX-62-IBEID and ANR-19-CE44-0014O2-TABOO).

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, UMR CNRS 6047, SAME Unit, Paris, France

²Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France

³Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, Grenoble, France

AUTHOR ORCID*s*

Ludovic Pelosi  <http://orcid.org/0000-0002-4198-5681>

Fabien Pierrel  <http://orcid.org/0000-0003-2083-3002>

Frédéric Barras  <http://orcid.org/0000-0003-3458-2574>

FUNDING

| Funder | Grant(s) | Author(s) |
|--|--------------------------|-----------------|
| Agence Nationale de la Recherche (ANR) | ANR-10-LABX-62-IBEID | Frédéric Barras |
| Agence Nationale de la Recherche (ANR) | ANR-19-CE44-0014O2-TABOO | Fabien Pierrel |

ETHICS APPROVAL

All animal experiments were performed in accordance with the institutional and national guidelines. Experiments were performed under the supervision of C. Loeuillet (agreement 38 10 38) in the Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) animal care facility (agreement C3851610006 delivered by the Direction Départementale de la Protection des Populations) and were approved by the ethics committee of the PHTA and by the French government (APAFIS no. 14895-2018042623275606.v5).

ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

Supplemental Material

Figure S1 (mBio03298-22-s0001.tif). UQ biosynthetic pathway.

Figure S2 (mBio03298-22-s0002.tif). UbiV-SPA amounts.

Figure S3 (mBio03298-22-s0003.tif). Quinone content in *isc* and *surf* mutants.

Figure S4 (mBio03298-22-s0004.tif). UbiT-SPA amounts.

Figure S5 (mBio03298-22-s0005.tif). UQ content in strains used for colonization experiments.

Figure S6 (mBio03298-22-s0006.tif). cfu counts of colonization experiments.

Figure S7 (mBio03298-22-s0007.tif). Amounts of UbiLHF proteins.

Figure S8 (mBio03298-22-s0008.tif). *ubiT* is in operon with the unknown function *yhbS* gene.

REFERENCES

- Kawamukai M. 2018. Biosynthesis and applications of Prenylquinones. *Biosci Biotechnol Biochem* 82:963–977. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1433020>
- Franza T, Gaudu P. 2022. Quinones: more than electron shuttles. *Res Microbiol* 173:103953. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103953>
- 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>
- Abby SS, Kazemzadeh K, Vraginac C, Pelosi L, Pierrel F. 2020. Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861:148259. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148259>
- 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>
- 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. *ubiI*, 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>
- 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>
- Asquith CRM, Murray NH, Pagliarini DJ. 2019. ADCK3/COQ8A: the choice target of the UbiB protein kinase-like family. *Nat Rev Drug Discov* 18:815. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00158-w>
- 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 metabolon synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone. *Cell Chem Biol* 26:482–492. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>
- Sakai Y, Kimura S, Suzuki T. 2019. Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability. *Nat Commun* 10:2858. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10750-8>
- 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>
- Lauhon CT. 2019. Identification and characterization of genes required for 5-Hydroxyuridine synthesis in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* tRNA. *J Bacteriol* 201:e00433-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00433-19>
- 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>
- Zeghouf M, Li J, Butland G, Borkowska A, Canadien V, Richards D, Beattie B, Emili A, Greenblatt JF. 2004. Sequential peptide affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res* 3:463–468. <https://doi.org/10.1021/pr034084x>
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-Step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- 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)
- Link AJ, Phillips D, Church GM. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* 179:6228–6237. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6228-6237.1997>
- Mettert EL, Kiley PJ. 2007. Contributions of [4Fe-4S] -FNR and integration host factor to FNR transcriptional regulation. *J Bacteriol* 189:3036–3043. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-07>
- Pelosi L, Ducluzeau A-L, 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>
- Loiseau L, Fyfe C, Aussel L, Hajj Chehade M, Hernández SB, Faivre 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>
- 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>
- Lasaro M, Liu Z, Bishar R, Kelly K, Chattopadhyay S, Paul S, Sokurenko E, Zhu J, Goulian M. 2014. *Escherichia coli* isolate for studying colonization of the mouse intestine and its application to two-component signaling knockouts. *J Bacteriol* 196:1723–1732. <https://doi.org/10.1128/JB.01296-13>
- Zaslav A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, Liebermeister W, Surette MG, Alon U. 2006. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* 3:623–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth895>
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177:4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>

25. Samuels AN, Roggiani M, Zhu J, Goulian M, Kohli RM. 2019. The SOS response mediates sustained Colonization of the mammalian gut. *Infect Immun* 87:e00711-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00711-18>
26. Samuels AN, Roggiani M, Smith KA, Zhu J, Goulian M, Kohli RM. 2020. Deciphering the role of Colicins during Colonization of the mammalian gut by Commensal *E. Coli*. *Microorganisms* 8:664. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050664>
27. Agrawal S, Jaswal K, Shiver AL, Balecha H, Patra T, Chaba R. 2017. A genome-wide screen in *Escherichia coli* reveals that ubiquinone is a key antioxidant for metabolism of long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 292:20086–20099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806240>
28. Esquilin-Lebron K, Dubrac S, Barras F, Boyd JM. 2021. Bacterial approaches for assembling iron-sulfur proteins. *mBio* 12:e0242521. <https://doi.org/10.1128/mBio.02425-21>
29. Myers KS, Yan H, Ong IM, Chung D, Liang K, Tran F, Keleş S, Landick R, Kiley PJ. 2013. Genome-scale analysis of *Escherichia coli* FNR reveals complex features of transcription factor binding. *PLoS Genet* 9:e1003565. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003565>
30. Federowicz S, Kim D, Ebrahim A, Lerman J, Nagarajan H, Cho B, Zengler K, Palsson B. 2014. Determining the control circuitry of redox metabolism at the genome-scale. *PLoS Genet* 10:e1004264. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004264>
31. Thomason MK, Bischler T, Eisenbart SK, Förstner KU, Zhang A, Herbig A, Nieselt K, Sharma CM, Storz G. 2015. Global transcriptional start site mapping using differential RNA sequencing reveals novel antisense RNAs in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 197:18–28. <https://doi.org/10.1128/JB.02096-14>
32. Nitzschke 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>
33. Tseng CP, Albrecht J, Gunsalus RP. 1996. Effect of Microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJ, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178:1094–1098. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1094-1098.1996>
34. Lambden PR, Guest JR. 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J Gen Microbiol* 97:145–160. <https://doi.org/10.1099/00221287-97-2-145>
35. Wallace BJ, Young IG. 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* 461:84–100. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90071-8)
36. 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>
37. Newton NA, Cox GB, Gibson F. 1971. The function of menaquinone (vitamin K 2) in *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta* 244:155–166. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(71\)90132-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(71)90132-2)
38. Jones SA, Gibson T, Maltby RC, Chowdhury FZ, Stewart V, Cohen PS, Conway T. 2011. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 79:4218–4226. <https://doi.org/10.1128/IAI.05395-11>
39. Chen J, To L, de Mets F, Luo X, Majdalani N, Tai C-H, Gottesman S. 2021. A fluorescence-based genetic screen reveals diverse mechanisms silencing small RNA signaling in *E. Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2106964118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106964118>
40. Lee J-Y, Tsois RM, Bäumlér AJ. 2022. The Microbiome and gut homeostasis. *Science* 377:eabp9960. <https://doi.org/10.1126/science.abp9960>
41. Knoell HE. 1981. Stand-by position of the dioxygen-dependent ubiquinone-8 synthesis apparatus in anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 10:59–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1981.tb06206.x>
42. Vo C-D-T, Michaud J, Elsen S, Faivre B, Bouveret E, Barras F, Fontecave M, Pierrel F, Lombard M, Pelosi L. 2020. The O₂-independent pathway of ubiquinone biosynthesis is essential for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 295:9021–9032. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013748>
43. Cecchini G, Schröder I, Gunsalus RP, Maklashina E. 2002. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1553:140–157. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00238-9)
44. Möbius K, Arias-Cartin R, Breckau D, Hännig AL, Riedmann K, Biedendieck R, Schröder S, Becher D, Magalon A, Moser J, Jahn M, Jahn D. 2010. Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10436–10441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000956107>
45. Jones SA, Chowdhury FZ, Fabich AJ, Anderson A, Schreiner DM, House AL, Autieri SM, Leatham MP, Lins JJ, Jorgensen M, Cohen PS, Conway T. 2007. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 75:4891–4899. <https://doi.org/10.1128/IAI.00484-07>
46. Gillis CC, Hughes ER, Spiga L, Winter MG, Zhu W, Furtado de Carvalho T, Chanin RB, Behrendt CL, Hooper LV, Santos RL, Winter SE. 2018. Microbial respiration and formate oxidation as metabolic signatures of inflammation-associated dysbiosis. *Cell Host Microbe* 21:208–219. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.006>

Supplementary data for :

Role of the *Escherichia coli* ubiquinone-synthesizing UbiUVT pathway in adaptation to changing respiratory conditions

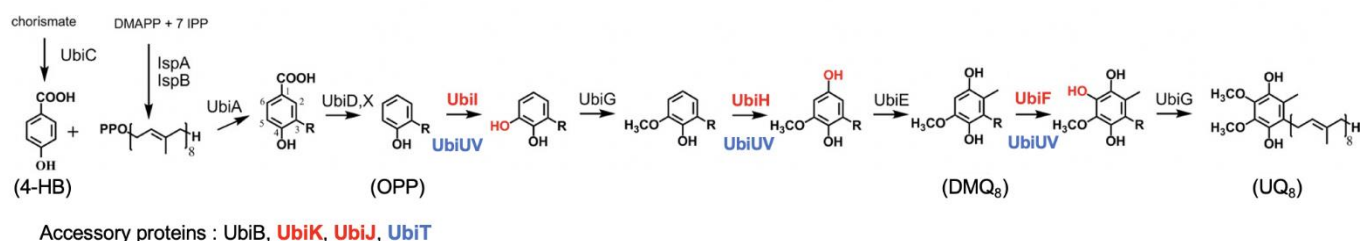


Figure S1 : O_2 -dependent and O_2 -independent biosynthetic pathways of UQ in *E. coli*. R, octaprenyl chain illustrated on the UQ₈ structure; 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid; OPP, 3-octaprenylphenol; DMQ₈, C-6-demethoxyubiquinone; DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; IPP, isopentenyl pyrophosphate. The Ubi-enzymes and accessory factors common between the two pathways are in black, those corresponding to the aerobic pathway in red, and those corresponding to the anaerobic pathway are in blue. Hydroxyl groups added on C5, C1 and C6 are highlighted in red.

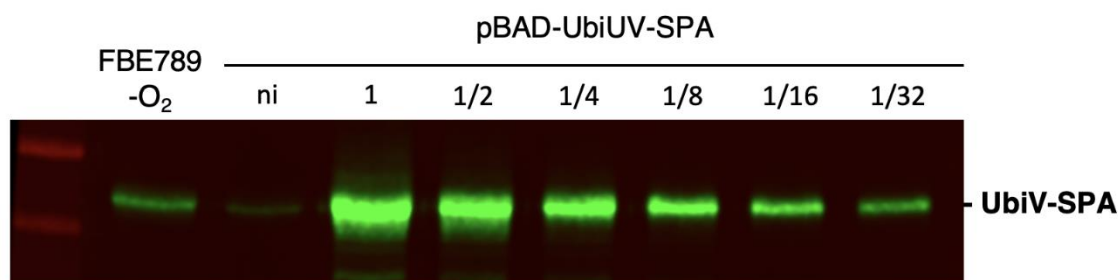


Figure S2 : Amount of UbiV-SPA produced in + O_2 from pBAD-UbiUV-SPA plasmid compared with physiological amount in - O_2 of chromosome-encoded UbiV-SPA. Strain UbiV-SPA (FBE789) was grown in LB in the absence of O_2 . Wild type *E. coli* transformed by pBAD-UbiUV-SPA (pES184) was grown in LB in + O_2 and induced 2 hours with 0.02% arabinose. After preparation of whole cell extract, the sample was diluted 2-fold serially (1 to 1/32). Western blot was performed using an anti-Flag antibody. ni : uninduced cells.

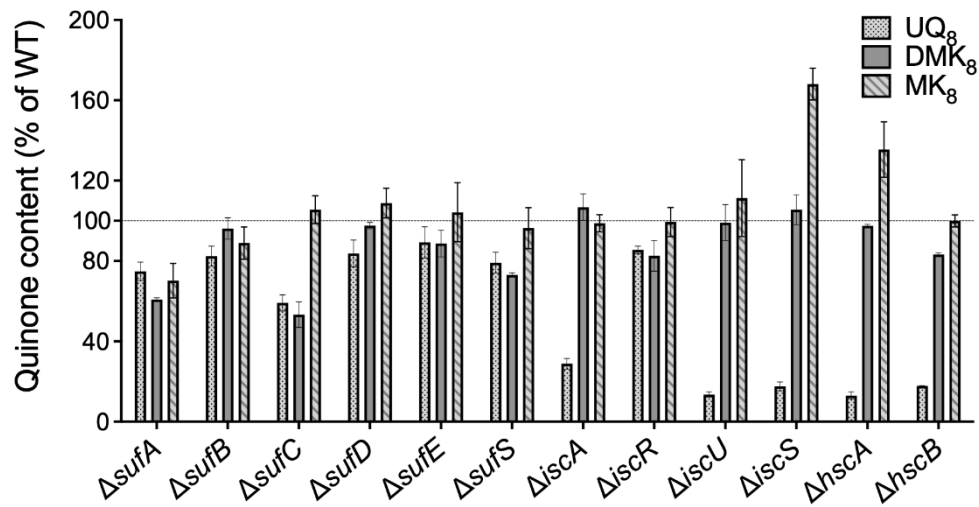


Figure S3 : Ubiquinone 8 (UQ₈), demethylmenaquinone 8 (DMK₈) and menaquinone 8 (MK₈) content in the indicated mutant strains of the Keio collection (37) after anaerobic growth overnight at 37°C in LB medium. Mean ± standard deviations (SD) (n=2).

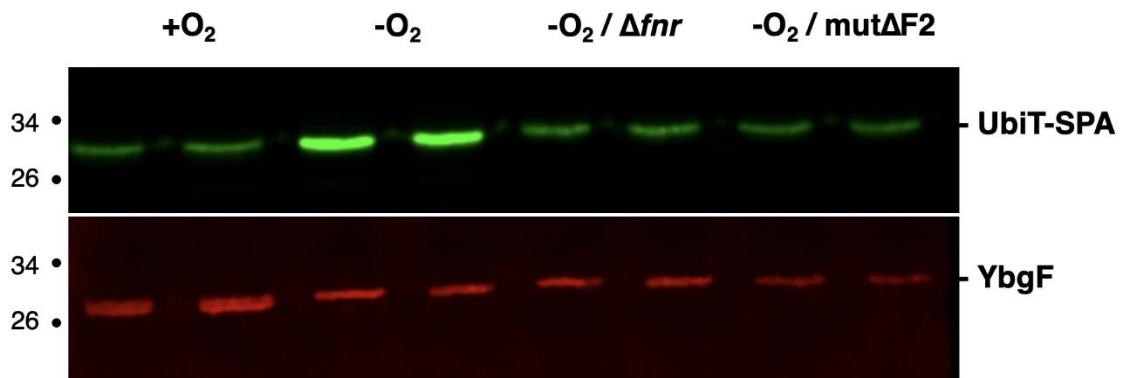


Figure S4 : Comparison of UbiT-SPA levels in the regulation mutants in $-O_2$ and in $+O_2$. *E. coli* strains expressing UbiT-SPA with or without the Δfnr or $mut\Delta F2$ chromosomal mutations (FBE655, FBE694, and FBE883) were grown in biological duplicates in LB at 37°C in the indicated oxygenic conditions until $OD_{600nm}=1$. Normalized quantities of total protein extracts in duplicate were separated by SDS-PAGE 12% and detected by Western-Blot using anti-Flag monoclonal antibody for the detection of the SPA tag or anti-YbgF polyclonal antibodies as an internal loading control.

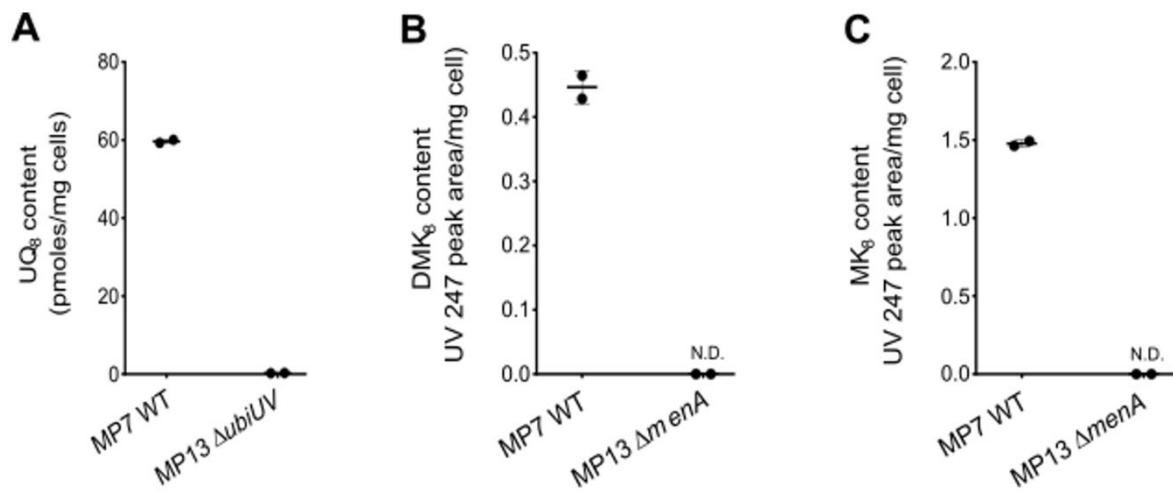


Figure S5: (A) Ubiquinone 8 (UQ₈), (B) demethylmenaquinone 8 (DMK₈) and (C) menaquinone 8 (MK₈) content in MP7 WT, and MP13 Δ ubiUV or MP13 Δ menA strains after anaerobic (A) and aerobic (B and C) growth overnight at 37°C in LB medium. Mean \pm standard deviations (SD) (n=2). N.D., not detected.

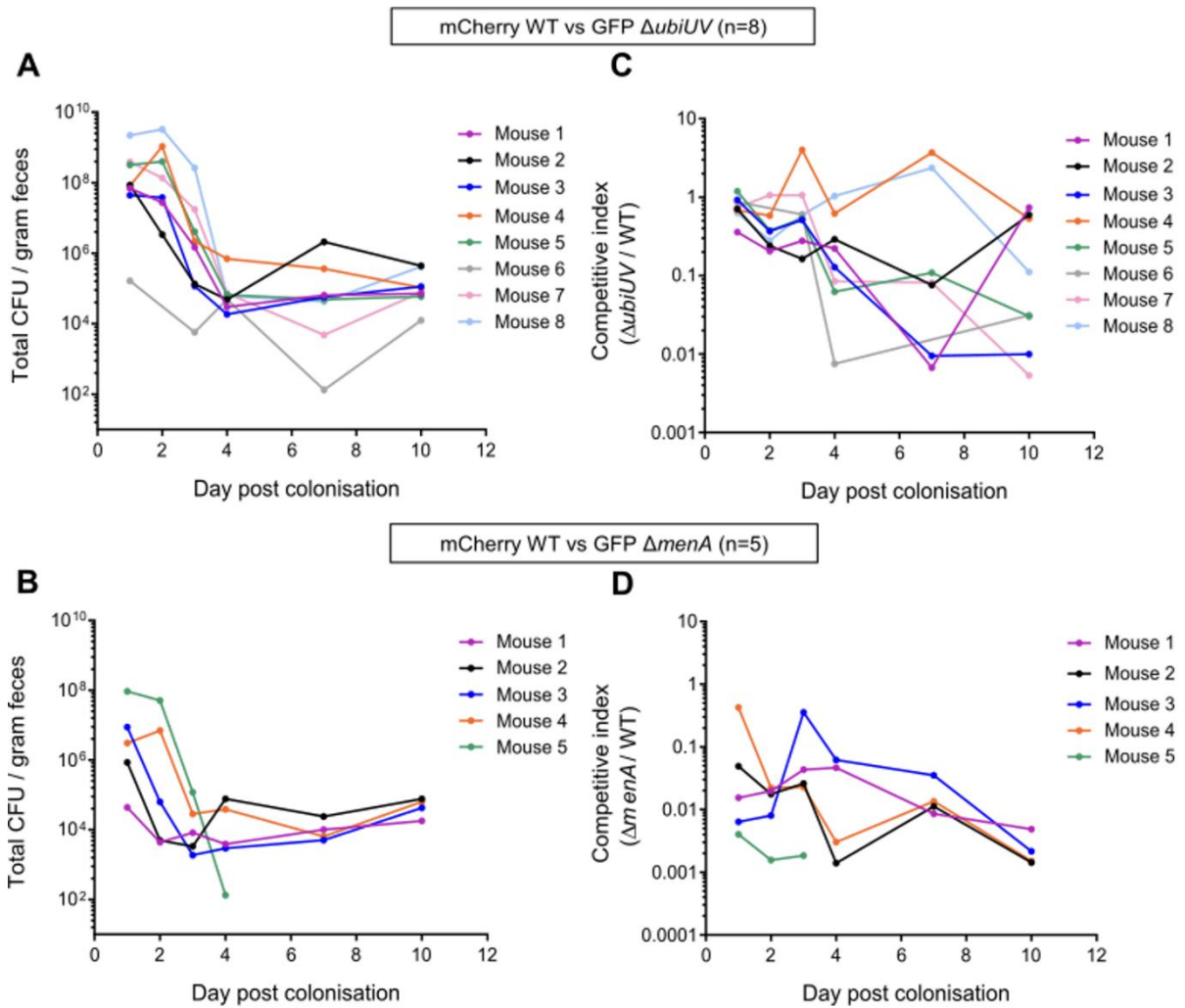


Figure S6: Total CFU count per gram of feces (**A and B**) and competitive index (**C and D**) for either MP7 (mCherry-tagged MP1) WT:MP13 (GFP-tagged MP1) $\Delta ubiUV$ (**A and C**) or MP7 WT:MP13 $\Delta menA$ (**B and D**) competition experiments in each mouse of the experiments shown in Figure 7. The limit of detection was 10^2 CFU. The absence of total CFU count in one day corresponds to the absence of feces for that day.

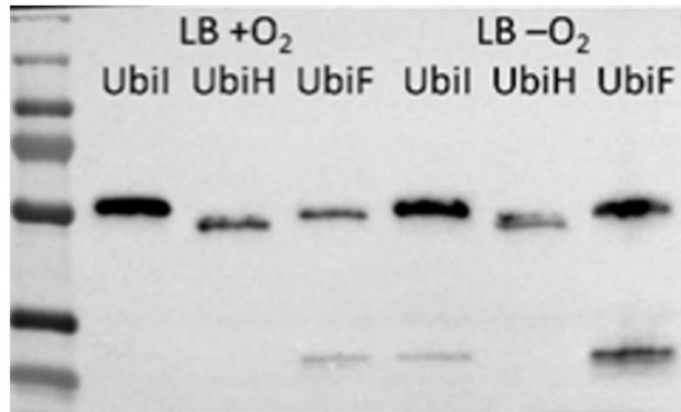


Figure S7: Protein levels of UbiIHF proteins in aerobic and anaerobic conditions. Strains producing UbiI, UbiH, and UbiF tagged with SPA at the chromosome, were grown in LB in aerobic and anaerobic conditions. Whole cell extracts were analyzed by Western blot with an anti-Flag antibody. Results representative of two independent experiments.

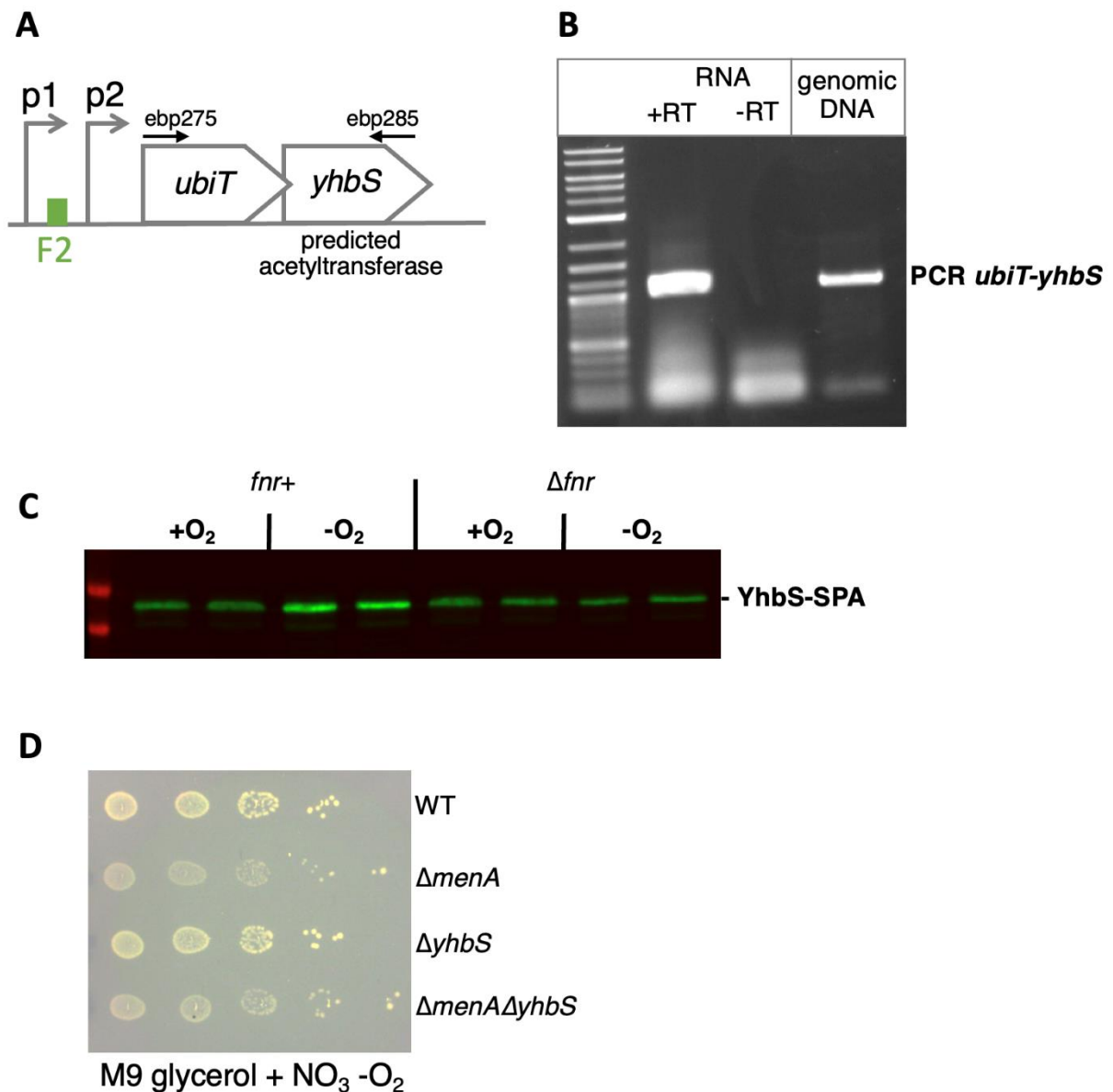


Figure S8 : *ubiT* is in operon with the unknown function *yhbS* gene. **A.** Genetic organization. See legend of figure 5. **B.** RT-PCRs were performed on total RNA prepared on MG1655 cells in exponential phase, with oligonucleotides ebp275 and ebp285 (Table 3). The positions of hybridization of the oligonucleotides are indicated in panel A. +/- RT indicates the absence or presence of the reverse transcriptase (RT) enzyme in the reaction mixture. A control PCR was performed on genomic DNA with the same oligonucleotides. **C.** *E. coli* strains YhbS-SPA and Δ *fnr*/YhbS-SPA (FBE855, FBE856) were grown in LB at 37°C in the indicated oxygenic conditions until OD_{600nm}=1. Normalized quantities of total protein extracts in duplicate were separated by SDS-PAGE 12% and detected by Western-Blot using anti-Flag monoclonal antibody for the detection of the SPA tag. **D.** The indicated *E. coli* strains were grown anaerobically for two days at 37°C on M9 medium plates supplemented with 0.2% glycerol and NO₃.

II.2. Un donneur d'atome d'oxygène organique pour les réactions d'hydroxylation biologique

Récemment, nous avons montré qu' *Escherichia coli*, utilise l'hétérodimère UbiU-V pour réaliser les trois réactions d'hydroxylation de la biosynthèse de l'UQ en absence de la molécule d'oxygène (O₂) (Arias-Cartin *et al.*, 2023). UbiU-V possèdent chacune un centre [4Fe-4S] et appartiennent à la famille des peptidases U32 qui représente une nouvelle classe d'hydroxylase. Le donneur de groupement d'hydroxyle pour les réactions d'hydroxylation catalysées par ces enzymes reste à élucider.

A ce jour, dans les systèmes biologiques, les hydroxylases sont connues pour utiliser soit O₂ soit H₂O comme donneurs de groupement hydroxyle. L'O₂ peut être activé par divers cofacteurs protéiques tels que les hèmes, les flavines et les centres métalliques non hémiques de fer ou de cuivre (Torres Pazmiño *et al.*, 2010) et H₂O est activée par les molybdoptérines (Hille, 2005; Dermer and Fuchs, 2012). Cependant, l'hétérodimère UbiU-V ne partage aucune caractéristique avec les hydroxylases à molybdoptérine, les seules enzymes connues jusqu'au présent pour être impliquées dans l'hydroxylation anaérobie. De plus, notre équipe a démontré que la biosynthèse TUV dépendante de l'UQ n'est pas affecté chez les mutants de *Pseudomonas aeruginosa* incapable de synthétiser de cofacteur molybdoptérine (Vo *et al.*, 2020). Ceci suggère qu'H₂O n'est probablement pas le cosubstrat de l'hétérodimère UbiU-V. En outre, nos données préliminaires montraient que chez *E. coli*, certains mutants de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (voie du shikimate) étaient déficients pour la biosynthèse de l'UQ₈ qu'en conditions anaérobies. Ces data suggèrent qu'un métabolite de cette voie pourrait être le donneur de groupement hydroxyle des réactions d'hydroxylation impliquées dans la biosynthèse de l'UQ₈. En accord avec ces données, il a été montré que deux autres peptidase U32 d'*E. coli*, RlhA et TrhP, sont respectivement impliquées dans l'hydroxylation de la cytidine 2501 sur l'ARN ribosomique 23S (Kimura *et al.*, 2017) et sur l'uracile 34 de certains ARNt (Lauhon, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019) de manière dépendant du préphénate (un métabolite en aval du shikimate). Toutes ces données sont cohérentes avec l'hypothèse que le préphénate pourrait être le donneur de groupement hydroxyle utilisé par les peptidases U32 pour les réactions d'hydroxylation indépendante d'O₂.

Dans l'étude ci-après, en analysant des différents mutants de la voie du shikimate chez *E. coli*, nous avons tout d'abord démontré que seule la souche déficiente pour la synthèse de préphénate était altérée dans sa capacité à synthétiser l'UQ₈ en anaérobiose. De plus, l'ajout de préphénate dans son milieu de culture rétablit une synthèse significative d'UQ₈. Ensuite, nous avons montré qu'en conditions anaérobies, l'ajout de shikimate (métabolite en amont du

préphénate) marqué à l'oxygène 18 (^{18}O) dans le milieu de culture d'une souche incapable de synthétiser le shikimate conduit à la biosynthèse d'UQ₈ possédant trois atomes ^{18}O . Nos résultats démontrent donc que le préphénate est bien le donneur de groupement hydroxyle utilisé par UbiU-V dans les réactions d'hydroxylation O₂-indépendantes conduisant à la biosynthèse de l'UQ₈. Notre étude révèle la première molécule organique utilisée comme donneur d'hydroxyle dans des réactions biologiques et suggèrent que les protéines appartenant à la même famille qu'UbiU-V pourraient fonctionner de façon similaire.

Mes contributions

Ce projet faisait également partie de l'ANR collaborative « O₂-taboo » avec nos partenaires du Collège de France et de l'Institut Pasteur à Paris. J'ai travaillé à la rédaction de cet article pendant la finalisation de mon manuscrit de thèse et l'article a été soumis au journal « PNAS » en décembre 2023 et est toujours en cours de review. Le shikimate marqué a été synthétisé par nos collaborateurs au Collège de France (Dr. Philippe Simon et Dr. Murielle Lombard). Toutes les souches *d'E. coli* utilisées dans ces expériences ont été construites par nos collaborateurs à l'Institut Pasteur (Dr. Rodrigo Arias-Cartin et Dr. Emmanuelle Bouveret). Ces derniers ont également effectué les analyses phénotypiques des différentes souches *d'E. coli* étudiées. Une partie des analyses de quinones dans les mutants de la voie du shikimate a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire. J'ai effectué toutes les analyses avec le préphénate et les protéines qui convertissent le chorismate en préphénate ainsi que toutes les expériences de marquage.

Title: An organic O donor for biological hydroxylation reactions

Katayoun Kazemzadeh Ferizhendi^{1†}, Philippe Simon^{2†}, Ludovic Pelosi¹, Emmanuel Séchet³,
Roache Arulanandam², Mahmoud Hajj Chehade¹, Martial Rey⁴, Deniz Onal², Laura
Flandrin¹, Rouba Chreim¹, Bruno Faivre², Samuel Chau-Duy-Tam Vo², Rodrigo Arias-
Cartin³, Frédéric Barras³, Marc Fontecave², Emmanuelle Bouveret³, Murielle Lombard^{2*},
Fabien Pierrel^{1*}

Affiliations:

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France

² Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Collège de France, CNRS UMR 8229, PSL Research University, Sorbonne Université, Paris, France

³ SAME Unit, Département de Microbiologie, Université Paris-Cité, Institut Pasteur, UMR CNRS 6047, Paris, France

⁴ Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UAR2024, Mass Spectrometry for Biology, F-75015 Paris, France

* Corresponding author. Email: fabien.pierrel@univ-grenoble-alpes.fr ;
murielle.lombard@college-de-france.fr

† These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

All biological hydroxylation reactions are thought to derive the oxygen atom from one of three inorganic oxygen donors, O₂, H₂O₂ or H₂O. Here, we have identified the organic compound prephenate as the oxygen donor for the three hydroxylation steps of the O₂-independent biosynthetic pathway of ubiquinone, a widely distributed lipid coenzyme. Prephenate is an intermediate in the aromatic amino acid pathway and genetic experiments showed that it is essential for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. Metabolic labeling experiments with ¹⁸O-shikimate, a precursor of prephenate, demonstrated the incorporation of ¹⁸O atoms into ubiquinone. The role of specific Fe-S enzymes belonging to the widespread U32 protein family is discussed. Prephenate-dependent hydroxylation reactions represent a novel biochemical strategy for adaptation to anaerobic environments.

SIGNIFICANCE STATEMENT

Microorganisms colonize anoxic ecological niches and use water as an oxygen donor for hydroxylation reactions in such environments. Here, we identify a novel source of oxygen, namely the metabolite prephenate, which enables the anaerobic biosynthesis of ubiquinone, a lipid important for bacterial bioenergetics. We predict that prephenate is involved as an oxygen donor in several biological pathways, including RNA modification. This study opens a new avenue for deciphering anaerobic metabolism and designing antimicrobial agents.

INTRODUCTION

3 Hydroxylation reactions are involved in the biosynthesis, degradation, and modulation of the
biological activity of a wide variety of molecules, by introducing a single oxygen (O) atom into
a carbon-hydrogen bond. The enzymes that catalyze hydroxylation reactions, collectively
6 referred to as hydroxylases, typically derive the added O atom from O₂ or its reduction product
H₂O₂ (1, 2), and therefore require aerobic conditions to function. Enzymes such as flavin
monooxygenases or heme/nonheme monooxygenases form large families of O₂-dependent
9 hydroxylases that have been studied for decades (3–7). In anaerobic environments, H₂O is
currently the only known O-donor for biological hydroxylation reactions. H₂O-dependent
hydroxylases contain a molybdenum cofactor and represent a diverse family with well-known
12 members like xanthine oxidase, resorcinol hydroxylase or ethylbenzene dehydrogenase (8, 9).

Ubiquinone (UQ) is a redox lipid that contributes to the function of energy-producing
respiratory chains in both aerobiosis and anaerobiosis (10–12). The biosynthesis of UQ requires
15 three hydroxylation steps, which are catalyzed by flavin-dependent hydroxylases (UbiI, UbiH
and UbiF in *E. coli*) under aerobic conditions, using O₂ as the O-donor (13) (Fig. 1). Under
anaerobiosis, the iron-sulfur (Fe-S) proteins UbiU and UbiV are essential for UQ biosynthesis,
18 but the O-donor used remains unknown (Fig. 1) (14, 15). UbiU-V are widely distributed in
Proteobacteria and belong to the U32 peptidase family. Most of the twelve subfamilies of U32
proteins remain uncharacterized, but two have been linked to O₂-independent hydroxylation
21 reactions of RNA molecules (16–18), raising the possibility of a common hydroxylation
function with an as yet unidentified O-donor.

Here we show, using genetics and isotopic labeling, that prephenate, a molecule derived from
24 the shikimate pathway, is the O-donor for the hydroxylation reactions of the UQ biosynthetic
pathway operating under anaerobic conditions. We propose a novel prephenate-dependent
hydroxylation chemistry that is likely shared by U32 proteins.

27

RESULTS

The *aro* pathway is required for the biosynthesis of UQ in anaerobic conditions

30 Preliminary evidence indicated that the aromatic amino acids (*aro*) pathway is involved in O₂-
independent UQ biosynthesis in *E. coli* (14). When grown anaerobically in LB medium
containing aromatic amino acids, Δ *aro* mutants showed a strong decrease in the level of UQ
33 (Fig. 2A-B), whereas the latter remained unaffected in cells grown aerobically (Fig. S1A).
Furthermore, the anaerobically grown Δ *aro* mutants accumulated octaprenyl-phenol (OPP)
(Fig. 2C), a UQ pathway intermediate downstream of 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) (Fig. 1),
36 suggesting that the UQ deficiency was independent of 4-HB. Accordingly, the addition of 4-
HB to cultures of Δ *aro* mutants did not increase their UQ levels (Fig. S1B).

The Δ *aro* mutants were also deficient in demethylmenaquinone (DMK) and menaquinone
39 (MK), but this was true under both anaerobic and aerobic conditions (Fig. S1C-D). This is likely
due to a deficiency in the isochorismate precursor, which is derived directly from chorismate
in the *aro* pathway (Fig. 2D). Overall, this genetic analysis shows that preventing the synthesis
42 of chorismate affects the biosynthesis of UQ under anaerobic conditions at a step downstream
of OPP (Fig. 1).

45 Prephenate is essential for the biosynthesis of UQ under anaerobic conditions

Single deletions of genes located downstream of chorismate in the *aro* pathway had no effect
on UQ levels (Fig. 3A). In contrast, combined inactivation of *pheA* and *tyrA* resulted in a severe
48 UQ deficiency under anaerobic conditions (Fig. 3A) associated with increased OPP levels (Fig.
S2A), while UQ levels were normal under aerobic conditions (Fig. S2B). Expression of the
chorismate mutase domain of PheA (PheA_CM) complemented the deficiency (Fig. 3B),
51 supporting that prephenate, the product of PheA_CM (Fig. 2D), is required for the O₂-
independent biosynthesis of UQ. Accordingly, the addition of prephenate to cultures of the
 Δ *pheA* Δ *tyrA* strain increased UQ levels (Fig. 3C). We observed a residual level of UQ in the
54 Δ *pheA* Δ *tyrA* strain, which was abolished upon inactivation of the O₂-dependent hydroxylases,
UbiI and UbiH (Fig. 3C). The residual level of UQ was therefore attributed to the activity of
the O₂-dependent hydroxylases using trace amounts of O₂ in the anaerobic culture medium, a
57 hypothesis supported by the complete absence of UQ in the Δ *aroD* Δ *ubiIH* mutant (Fig. 3D).
Importantly, prephenate increased UQ levels in both strains (Fig. 3D). Collectively, the data
support that prephenate is essential for UQ biosynthesis under anaerobic conditions.

60

The hydroxylation steps involving UbiU-V are dependent on prephenate

The expression of UbiU-V is tightly regulated by the transcription factor FNR; as a result, the
63 two proteins are well expressed under anaerobiosis but very poorly expressed under aerobiosis
(15). When expressed under aerobic conditions thanks to a constitutive promoter, UbiU-V can
replace UbiI, UbiH and UbiF in catalyzing the three hydroxylation reactions necessary for UQ
66 biosynthesis, using an unidentified O-donor (15). In line with previous results, UbiU-V allowed
robust aerobic growth of the Δ *ubiIH* strain on succinate medium, which is strictly dependent
on UQ biosynthesis (Fig. 3E). Consistent with the requirement of the 4Fe-4S cluster of UbiU
69 for activity (15), the C176A mutation, which impairs the binding of the Fe-S cluster, abolished

72 growth on succinate (Fig. 3E). Deletion of *aroD* (Fig. 3E) or *pheA tyrA* (Fig. 3F) abolished the
independent of UQ, was maintained in all cases. Addition of shikimate rescued the growth of
the $\Delta aroD \Delta ubiIH$ strain expressing UbiU-V (Fig. 3E), demonstrating that a metabolite
75 downstream of shikimate in the *aro* pathway is required for UbiU-V function. Furthermore,
expression of PheA_CM in the $\Delta pheA \Delta tyrA \Delta ubiH$ strain restored the function of UbiU-V
(Figure 3F). Taken together, these results demonstrate that prephenate is required for the UbiU-
78 V-dependent hydroxylation steps and suggest that prephenate could be the O-donor for the O₂-
independent hydroxylation reactions of UQ biosynthesis.

Biosynthesis of ¹⁸O₃-UQ from C₄[¹⁸O]-shikimate under anaerobic conditions

81 To test whether prephenate is the O-donor of the hydroxylation reactions of the anaerobic UQ
pathway, we designed an *in vivo* labeling experiment using shikimate labeled with ¹⁸O at
position 4 exclusively, which we termed C₄[¹⁸O]-shikimate. Shikimate was preferred over
84 prephenate, which has a low bioavailability (19) and is unstable in solution, especially under
acidic conditions (20–23). Moreover, the C₄-hydroxyl group of shikimate remains intact during
in vivo conversion to prephenate (24), and shikimate restored higher UQ levels when added to
87 cultures of the $\Delta aroD$ strains (Fig. 3D and Fig. S2C). The synthesis of C₄[¹⁸O]-shikimate was
performed in five steps using commercial shikimate as the starting material (Fig. 4A, Data S1).
The general strategy was to protect all reactive functions of the molecule, except the hydroxyl
90 at position 4 to selectively label it with ¹⁸O, and then remove the protecting groups (Fig. 4A).
LC-MS analysis of the final compound revealed that 64% of shikimate was labeled with ¹⁸O,
while 36% remained unlabeled and contained ¹⁶O (Fig. S3A).

93 C₄[¹⁸O]-shikimate and unlabeled shikimate, used as control, were added to anaerobic cultures
of the $\Delta aroD \Delta ubiIH$ strain and yielded similar levels of UQ (Fig. S3B). The mass spectra of
UQ differed significantly depending on whether the shikimate added to the cultures was labeled
96 or not (Fig. 4B-C). With C₄[¹⁸O]-shikimate, the most prominent ions corresponding to H⁺,
NH₄⁺, and Na⁺ adducts of UQ₈ were predominantly shifted by + 4 mass units, and lower peaks
at + 6 were also detected (Fig. 4B-C), indicating the incorporation of two and three ¹⁸O atoms,
99 respectively. Quantification of these signals by single-ion monitoring of the H⁺ adducts (Fig.
S3C-D) yielded a relative abundance consistent with a quantitative incorporation of three
oxygen atoms from a precursor labeled at 64% with ¹⁸O (compare Fig. 4D and Fig. S3E-G).
102 Importantly, when 4-HB, which provides the hydroxyl group at position C₄ of UQ (Fig. 1), was
added together with C₄[¹⁸O]-shikimate, the labeling of UQ₈ was not affected (compare Fig. 4C
and Fig. S3H). This result established that the ¹⁸O labels incorporated from C₄[¹⁸O]-shikimate
105 are present at the three positions C₁, C₅ and C₆ of the UQ₈ molecule. Collectively, the data
demonstrate that an organic molecule derived from shikimate is the O-donor for the three
hydroxylation reactions required to convert OPP into UQ₈ under anaerobic conditions.

108

DISCUSSION

111 We have established genetically that prephenate is essential for the biosynthesis of UQ under
112 anaerobic conditions. In addition, isotopic labeling experiments demonstrated that the three O
113 atoms of UQ are derived exclusively from the O atom at position C4 of shikimate, the unique
114 precursor of prephenate. These data show conclusively that the hydroxylation reactions of the
115 O₂-independent pathway leading to the biosynthesis of UQ use prephenate as the O-donor. This
116 is the first example of an organic molecule serving as an O-donor in a biological reaction, with
117 only O₂, H₂O₂ and H₂O previously known as O-donors (1, 2, 8).

117 We have shown here that prephenate is required for the function of UbiU-V, two Fe-S proteins
118 of the U32 family that are essential for the hydroxylation steps of the O₂-independent UQ
119 biosynthetic pathway (14, 15). Interestingly, two other U32 members, RlhA and TrhP, are
120 involved in O₂-independent hydroxylation reactions of RNA molecules (16–18), but a direct
121 hydroxylation activity has not been demonstrated so far. Overall, an attractive hypothesis is that
122 U32 proteins are *bona fide* hydroxylases that catalyze prephenate-dependent hydroxylation
123 reactions, consistent with previous proposals (16, 17). While waiting for the development of *in*
124 *vitro* activity assays, the availability of C₄[¹⁸O]-shikimate, through the chemical synthesis
125 reported here, provides an opportunity to confirm *in vivo* the importance of prephenate for U32
126 protein-dependent pathways.

We propose the following mechanism for prephenate-dependent hydroxylation: (i) a 2-electron
127 oxidation of the substrate aromatic ring would lead to a cation intermediate, followed by (ii) a
128 concerted prephenate decarboxylation, releasing a nucleophilic hydroxide molecule that would
129 quench the reactive cation to form the hydroxylated product and phenylpyruvate (Fig. 5).
130 Interestingly, such a decarboxylation coupled to aromatization occurs in prephenate
131 dehydratase (PDT) (25) and in carboxy-S-adenosyl-L-methionine synthase (CmoA) (26). The
132 unknown oxidant involved in step (i) probably has a high redox potential to oxidize the aromatic
133 ring. The [4Fe-4S] clusters bound to UbiU and UbiV are functionally important (14, 15) and
134 may serve as part of an electron transfer chain from the substrate to the yet unidentified electron
135 acceptor. Remarkably, this role may be conserved in other U32 proteins as Fe-S clusters are
136 likely to be a common feature of this family. Indeed, the function of TrhP and RlhA has been
137 shown to depend either directly (18) or indirectly (16) on Fe-S clusters, and the four cysteine
138 residues that coordinate the 4Fe-4S cluster in UbiU-V form a motif that is present in most U32
139 proteins (14).

141 The development of chemical analogs of prephenate as inhibitors of U32 proteins may be a
142 promising antimicrobial strategy, considering that the *aro* pathway is found only in
143 microorganisms and plants, and that U32 proteins are not present in humans and are almost
144 exclusively distributed in bacteria, and to a lesser extent in archaea (17). UbiU-V have recently
145 been implicated in the transition from chronic to acute infection in *Pseudomonas aeruginosa*
146 (27), suggesting that inhibition of the anaerobic metabolism of this potent pathogen with
147 prephenate analogs would affect its pathogenicity.

The existence of the O₂-independent UQ biosynthetic pathway was documented in 1978 (28),
148 and it took 45 years to identify prephenate as the O-donor. Hydroxylation reactions occur in
149 several other anaerobic pathways (29, 30), but the enzymes and O-donors involved remain
150

largely uncharacterized. Of particular interest, one of the pathways for anaerobic microbial degradation of common aromatic pollutants, such as benzene and naphthalene, begins with hydroxylation of the aromatic ring with an unknown O-donor (31–33). Since about one third of bacterial genomes show no evidence for the use of the molybdenum cofactor required for H₂O-dependent hydroxylation reactions (8, 34), these species must rely on other hydroxylation mechanisms under anaerobic conditions. Given the high conservation of the *aro* pathway among microbes (35), we propose that prephenate acts as an O-donor in some of these hydroxylation reactions.

159

REFERENCES

1. D. E. Torres Pazmiño, M. Winkler, A. Glieder, M. W. Fraaije, Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology* **146**, 9–24 (2010).
162
2. M. Hobisch, D. Holtmann, P. Gomez de Santos, M. Alcalde, F. Hollmann, S. Kara, Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. *Biotechnology Advances* **51**, 107615 (2021).
165
3. C. C. Hansen, D. R. Nelson, B. L. Møller, D. Werck-Reichhart, Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. *Molecular Plant* **14**, 1244–1265 (2021).
4. C. E. Paul, D. Eggerichs, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. van Berkel, Flavoprotein monooxygenases: Versatile biocatalysts. *Biotechnology Advances* **51**, 107712 (2021).
168
5. A. J. Jasniewski, L. Que, Dioxygen Activation by Nonheme Diiron Enzymes: Diverse Dioxygen Adducts, High-Valent Intermediates, and Related Model Complexes. *Chem Rev* **118**, 2554–2592 (2018).
171
6. X. Huang, J. T. Groves, Oxygen Activation and Radical Transformations in Heme Proteins and Metalloporphyrins. *Chem Rev* **118**, 2491–2553 (2018).
174
7. E. Romero, J. R. G. Castellanos, G. Gadda, M. W. Fraaije, A. Mattevi, Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chem. Rev.* **118**, 1742–1769 (2018).
177
8. R. Hille, J. Hall, P. Basu, The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 3963–4038 (2014).
9. P. I. Darley, J. Hellstern, B. Schink, B. Philipp, Resorcinol Hydroxylase of *Azoarcus anaerobius*: Molybdenum Dependence, Activity, and Heterologous Expression. *Curr Microbiol* **77**, 3385–3396 (2020).
180
10. T. Franza, P. Gaudu, Quinones: more than electron shuttles. *Research in Microbiology* **173**, 103953 (2022).
183
11. S. S. Abby, K. Kazemzadeh, C. Vragliau, L. Pelosi, F. Pierrel, Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1861**, 148259 (2020).
186
12. C.-D.-T. Vo, J. Michaud, S. Elsen, B. Faivre, E. Bouveret, F. Barras, M. Fontecave, F. Pierrel, M. Lombard, L. Pelosi, The O₂-independent pathway of ubiquinone biosynthesis is essential for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **295**, 9021–9032 (2020).
189
13. K. Kazemzadeh, L. Pelosi, C. Chenal, S.-C. Chobert, M. Hajj Chehade, M. Jullien, L. Flandrin, W. Schmitt, Q. He, E. Bouvet, M. Jarzynka, N. Varoquaux, I. Junier, F. Pierrel, S. S. Abby, Diversification of ubiquinone biosynthesis via gene duplications, transfers, losses, and parallel evolution. *Mol Biol Evol*, msad219 (2023).
192
195

14. L. Pelosi, C. D. Vo, S. S. Abby, L. Loiseau, B. Rascalou, M. Hajj Chehade, B. Faivre, M. Gousse, C. Chenal, N. Touati, L. Binet, D. Cornu, C. D. Fyfe, M. Fontecave, F. Barras, M. Lombard, F. Pierrel, Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway. *mBio* **10**, e01319-19 (2019).
15. R. Arias-Cartin, K. Kazemzadeh Ferizhendi, E. Séchet, L. Pelosi, C. Loeuillet, F. Pierrel, F. Barras, E. Bouveret, Role of the Escherichia coli ubiquinone-synthesizing UbiUVT pathway in adaptation to changing respiratory conditions. *mBio*, e0329822 (2023).
16. S. Kimura, Y. Sakai, K. Ishiguro, T. Suzuki, Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic acids research* **45**, 12974–12986 (2017).
17. Y. Sakai, S. Kimura, T. Suzuki, Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability. *Nat Commun* **10**, 2858 (2019).
18. C. T. Lauhon, Identification and characterization of genes required for 5-hydroxyuridine synthesis in Bacillus subtilis and Escherichia coli tRNA. *Journal of bacteriology*, doi: 10.1128/JB.00433-19 (2019).
19. G. B. Cox, F. Gibson, Role of shikimic acid in the biosynthesis of vitamin K₂. *Biochemical Journal* **100**, 1- (1966).
20. H. Maeda, A. K. Shasany, J. Schnepf, I. Orlova, G. Taguchi, B. R. Cooper, D. Rhodes, E. Pichersky, N. Dudareva, RNAi Suppression of Arogenate Dehydratase1 Reveals That Phenylalanine Is Synthesized Predominantly via the Arogenate Pathway in Petunia Petals. *Plant Cell* **22**, 832–849 (2010).
21. J. Dayan, D. B. Sprinson, “[70a] Preparation of prephenic acid” in *Methods in Enzymology* (Elsevier, 1970; <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687971172400>)vol. 17, pp. 559–561.
22. H. Plieninger, Prephenic Acid: Properties and the Present Status of its Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1**, 367–372 (1962).
23. L. O. Zamir, R. Tiberio, R. A. Jensen, Differential acid-catalyzed aromatization of prephenate, arogenate, and spiro-arogenate. *Tetrahedron Letters* **24**, 2815–2818 (1983).
24. M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe, Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* **42**, D199-205 (2014).
25. J. Van Vleet, A. Kleeb, P. Kast, D. Hilvert, W. W. Cleland, ¹³C isotope effect on the reaction catalyzed by prephenate dehydratase. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 752–754 (2010).
26. J. Kim, H. Xiao, J. B. Bonanno, C. Kalyanaraman, S. Brown, X. Tang, N. F. Al-Obaidi, Y. Patskovsky, P. C. Babbitt, M. P. Jacobson, Y.-S. Lee, S. C. Almo, Structure-guided discovery of the metabolite carboxy-SAM that modulates tRNA function. *Nature* **498**, 123-+ (2013).
27. P. Cao, D. Fleming, D. A. Moustafa, S. K. Dolan, K. H. Szymanik, W. K. Redman, A. Ramos, F. L. Diggle, C. S. Sullivan, J. B. Goldberg, K. P. Rumbaugh, M. Whiteley, A

- Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection. *Nature* **618**, 358–364 (2023).
- 237 28. K. Alexander, I. G. Young, Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic
biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**, 4750–5 (1978).
- 240 29. R. Rabus, M. Boll, J. Heider, R. U. Meckenstock, W. Buckel, O. Einsle, U. Ermler, B. T.
Golding, R. P. Gunsalus, P. M. H. Kroneck, M. Krueger, T. Lueders, B. M. Martins, F.
Musat, H. H. Richnow, B. Schink, J. Seifert, M. Szalaniec, T. Treude, G. M. Ullmann, C.
243 Vogt, M. von Bergen, H. Wilkes, Anaerobic Microbial Degradation of Hydrocarbons:
From Enzymatic Reactions to the Environment. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 5–28
(2016).
- 246 30. L.-B. Shou, Y.-F. Liu, J. Zhou, Z.-L. Liu, L. Zhou, J.-F. Liu, S.-Z. Yang, J.-D. Gu, B.-Z.
Mu, New evidence for a hydroxylation pathway for anaerobic alkane degradation
supported by analyses of functional genes and signature metabolites in oil reservoirs. *AMB
Express* **11**, 18 (2021).
- 249 31. T. Zhang, P.-L. Tremblay, A. K. Chaurasia, J. A. Smith, T. S. Bain, D. R. Lovley,
Anaerobic Benzene Oxidation via Phenol in *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ.
Microbiol.* **79**, 7800–7806 (2013).
- 252 32. M. E. Bedessem, N. G. Swoboda-Colberg, P. J. S. Colberg, Naphthalene mineralization
coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiology Letters*
152, 213–218 (1997).
- 255 33. C. Chen, Z. Zhang, P. Xu, H. Hu, H. Tang, Anaerobic biodegradation of polycyclic
aromatic hydrocarbons. *Environ. Res.* **223**, 115472 (2023).
- 258 34. T. Peng, Y. Xu, Y. Zhang, Comparative genomics of molybdenum utilization in
prokaryotes and eukaryotes. *BMC Genomics* **19**, 691 (2018).
- 261 35. X.-Y. Zhi, J.-C. Yao, H.-W. Li, Y. Huang, W.-J. Li, Genome-wide identification, domain
architectures and phylogenetic analysis provide new insights into the early evolution of
shikimate pathway in prokaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **75**, 154–164 (2014).
- 264 36. S. Zhang, D. B. Wilson, B. Ganem, Probing the catalytic mechanism of prephenate
dehydratase by site-directed mutagenesis of the *Escherichia coli* P-protein dehydratase
domain. *Biochemistry* **39**, 4722–8 (2000).
- 267 37. T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M.
Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-
gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2** (2006).
- 270 38. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in
Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645
(2000).
- 273 39. P. P. Cherepanov, W. Wackernagel, 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 (1995).

- 276 40. M. Hajj Chehade, L. Loiseau, M. Lombard, L. Pecqueur, A. Ismail, M. Smadja, B. Golinelli-Pimpaneau, C. Mellot-Draznieks, O. Hamelin, L. Aussel, S. Kieffer-Jaquinod, N. Labessan, F. Barras, M. Fontecave, F. Pierrel, *ubiI*, a New Gene in *Escherichia coli* Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **288**, 20085–20092 (2013).
- 279 41. L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol* **177**, 4121–4130 (1995).
- 282 42. A. C. Chang, S. N. Cohen, Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol* **134**, 1141–1156 (1978).
- 285 43. J. Huang, F.-E. Chen, An efficient synthesis of a potential (-)-reserpine intermediate from (-)-shikimic acid of the chiral pool. *Helv. Chim. Acta* **90**, 1366–1372 (2007).
- 288 44. D. Dess, J. Martin, A Useful 12-I-5 Triacetoxypiperidine (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7277–7287 (1991).
- 291 45. M. Byrn, M. Calvin, Oxygen-18 Exchange Reactions of Aldehydes and Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1916- (1966).
46. J. Risley, R. Vanetten, O-18 Isotope Shift Upon C-13 Nmr-Spectra and Its Application to the Study of Oxygen-Exchange Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 252–253 (1979).
- 294 47. J. Diakur, T. Nakashima, J. Vederas, Magnitudes of O-18 Isotope Shifts in C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectra of Ketones and Alcohols. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **58**, 1311–1315 (1980).

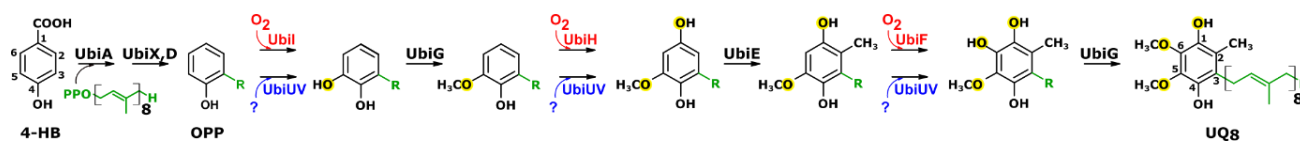
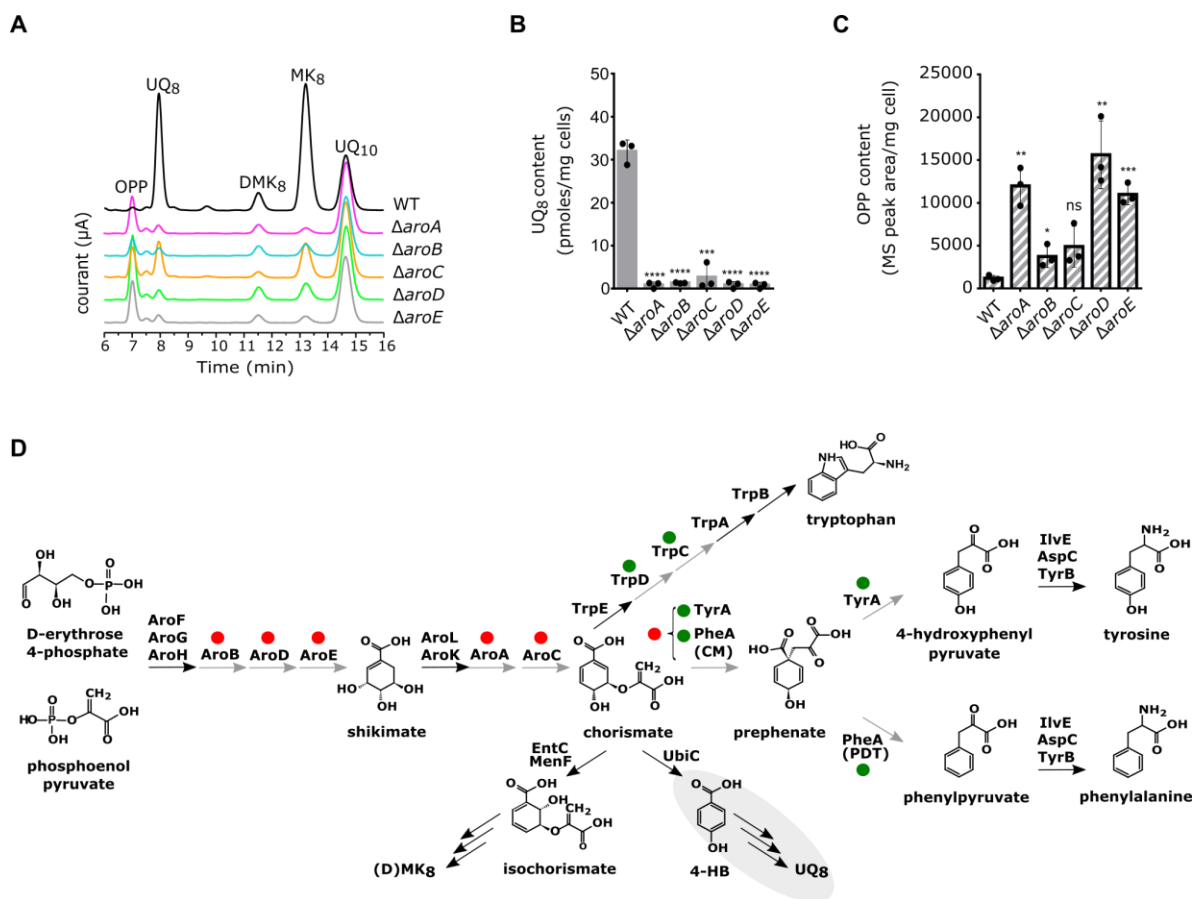


Figure 1. Aerobic and anaerobic pathways of UQ₈ biosynthesis in *E. coli*. The Ubi-enzymes common to both pathways are in black, those specific to the O₂-dependent pathway are shown in red, and those specific to the O₂-independent pathway are shown in blue (? for the unknown O- donor). The O atoms derived from the three hydroxylation steps are highlighted in yellow. R, octaprenyl chain shown in green in the UQ₈ structure; 4-HB, 4-hydroxybenzoic acid; OPP, 3-octaprenylphenol; UQ₈, ubiquinone-8.

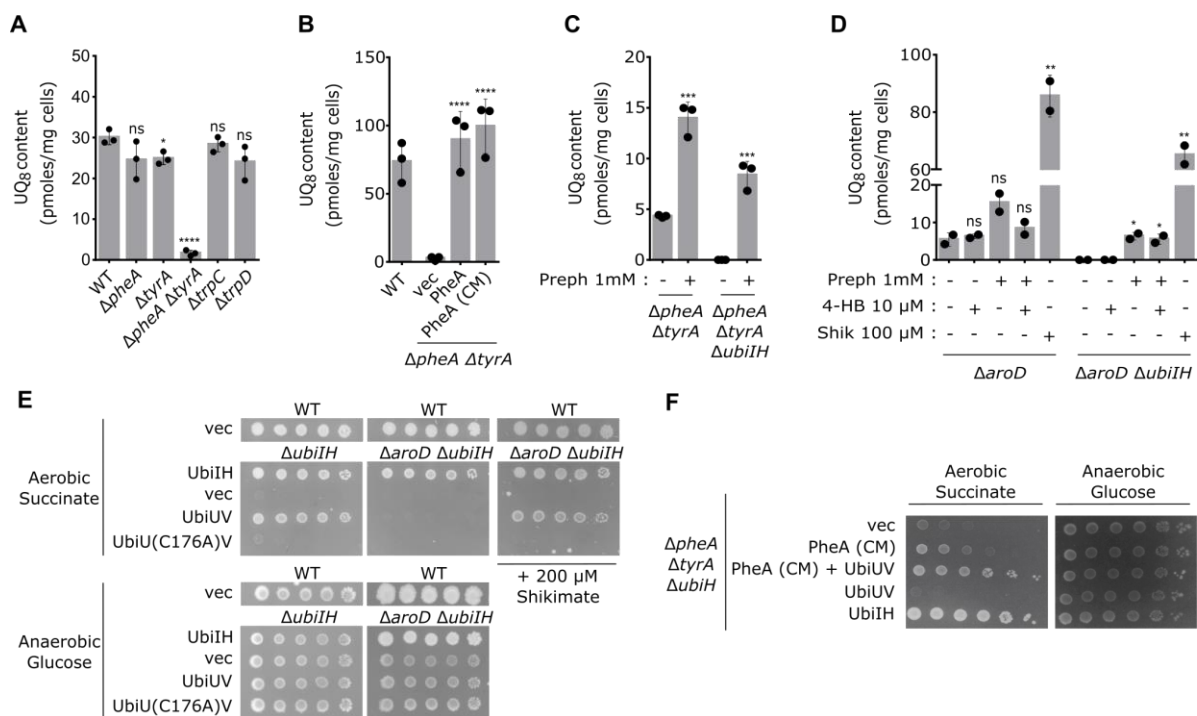


306

Figure 2. O₂-independent biosynthesis of ubiquinone depends on the *aro* pathway in *E.*

coli. **(A)** HPLC-ECD analysis of lipid extracts from *E. coli* Δ *aro* strains grown anaerobically in LB medium, UQ₁₀ added as internal standard. UQ₈ **(B)** and OPP **(C)** content in the strains analyzed in A. Mean \pm standard deviation (SD) (n=3). ****P < 0.0001, ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05 by unpaired Student's t-test comparing to WT. ns, not significant. **(D)** Metabolic pathway of aromatic amino acids in *E. coli*, modified from (17). The chorismate mutase (CM) and prephenate dehydratase (PDT) domains of PheA convert chorismate to prephenate and prephenate to phenylpyruvate, respectively (36). The black and gray arrows indicate the mutants not tested or tested in this study. The red and green disks indicate the proteins dispensable or essential for UQ₈ biosynthesis under anaerobic conditions, respectively. The Δ *pheA* and Δ *tyrA* strains are not deficient for UQ₈ but the double mutant Δ *pheA* Δ *tyrA* is. The UQ pathway is highlighted in gray, and (D)MK₈ corresponds to the (demethyl) menaquinone pathway.

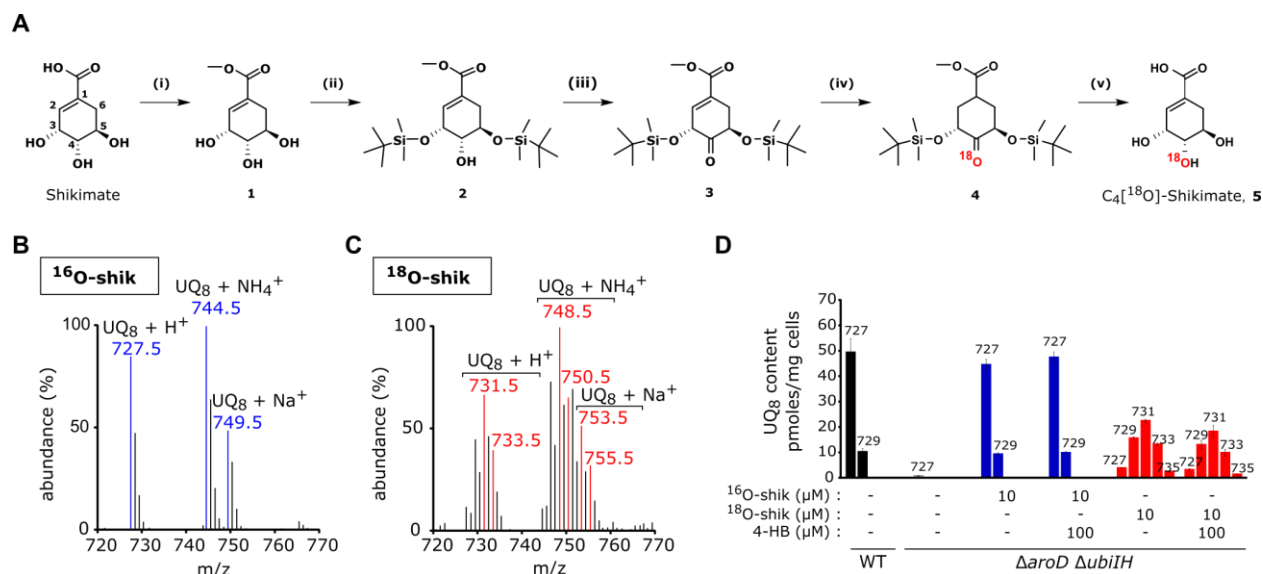
321



324

Figure 3. Prephenate is required for the O₂-independent biosynthesis of ubiquinone. The indicated *E. coli* strains were grown anaerobically in either LB (A-B) or MOPS (C-D) media. UQ₈ content in the mutants downstream of chorismate (A), in the Δ*pheA* Δ*tyrA* double mutant containing either pTet (vec), pTet-*pheA* (PheA) or pTet-*pheA*-CM (PheA (CM)) (B), in the double mutant Δ*pheA* Δ*tyrA* and the quadruple mutant Δ*pheA* Δ*tyrA* Δ*ubiIH* strains supplemented or not with 1mM of prephenate (Preph) (C), in the Δ*aroD* and the Δ*aroD* Δ*ubiIH* strains supplemented with 1 mM of prephenate and/or 10 μM 4-HB and/or 100 μM of shikimate (Shik) (D). Mean ± SD (n=3) except for D (n=2). ****P < 0.0001, ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05 by unpaired Student's t-test comparing to WT for A, to vec for B and to mutant strains without supplementation for C-D. (E) Serial dilutions of the mutant strains Δ*ubiIH*, or Δ*aroD* Δ*ubiIH* containing either pBAD24 (vec), pES077 (UbiIH), pES154 (UbiUV), or pES185 (UbiU(C176A)V) on M9 succinate plates containing Phe, Tyr, Trp, 0.02% arabinose and supplemented or not with 200 μM shikimate. (F) Serial dilutions of the Δ*pheA*Δ*tyrA* Δ*ubiH* strain containing either pTet + pEB067 (vec), pES047 + pEB067 (PheA_CM), pES047 + pES232 (PheA_CM + UbiUV), pTet + pES154 (UbiUV), or pES077 + pEB067 (UbiIH) on M9 succinate plates containing Phe, Tyr and 0.1% arabinose. Succinate plates were incubated at 37°C for 48 hours, and the results are representative of at least two independent experiments (E-F).

342



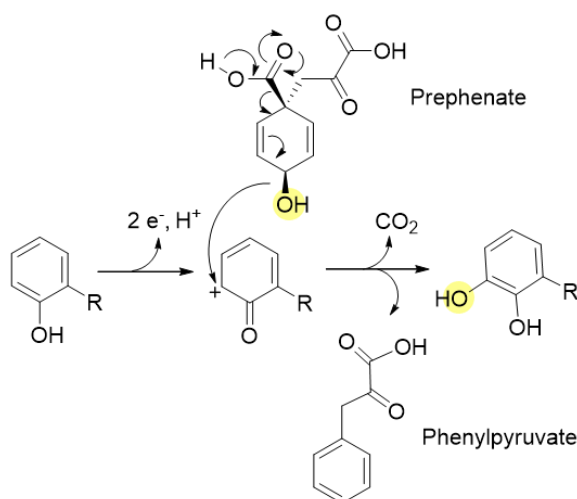
345

348

351

354

Figure 4. Addition of C₄[¹⁸O]-shikimate to the *ΔaroD* strain leads to the biosynthesis of ¹⁸O₃-UQ in anaerobic conditions. (A) Synthetic route of ¹⁸O-shikimate (3R,4S,5R)-3,4[¹⁸O],5-trihydroxy-4-cyclohex-1-ene-1-carboxylic acid. (i) APTS, CH₃OH; (ii) TBDMSOtf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂; (iii) Dess-Martin Periodinane, CH₂Cl₂, rt; (iv) H₂¹⁸O, CH₃C[¹⁸O]₂H, THF; (v) a) NaBH₄, THF/H₂O; b) APTS, THF/H₂O. Mass spectra of UQ₈ from *ΔaroD ΔubiIH* strain grown anaerobically in the presence of 10 μM unlabeled ¹⁶O-shikimate (B) or C₄[¹⁸O]-shikimate (C). The peaks corresponding to adducts of either unlabeled UQ₈ or UQ₈ labeled with two ¹⁸O (¹⁸O₂-UQ₈) or three ¹⁸O (¹⁸O₃-UQ₈) are represented in blue (B) and red (C), respectively. Mass spectra representative of three independent experiments. (D) Quantification of UQ₈ H⁺ adducts (m/z 727-735) in WT and *ΔaroD ΔubiIH* cells grown with ¹⁶O-shikimate or C₄[¹⁸O]-shikimate. Mean ± SD (n = 3), see also Fig S3.



357

Figure 5: Proposed molecular mechanism of prephenate-dependent hydroxylation: the reaction exemplifies the first hydroxylation step in the O₂-independent biosynthesis of UQ₈. R, octaprenyl chain.

360

Acknowledgments: We thank members of the TrEE team at TIMC for comments and Dr. John Willison for editing the manuscript. This project was supported by CNRS, Collège de France, Institut Pasteur, Université Grenoble-Alpes, the French State Program ‘Investissements d’Avenir’ “LABEX DYNAMO”, and by the O2-TABOO grant from the Agence Nationale de la Recherche.

Funding:

Agence Nationale de la Recherche ANR-19-CE44-0014 (FP, ML, FB)

Agence Nationale de la Recherche ANR-11-LABX-0011 (MF)

Author contributions:

Conceptualization: FP, ML, MF, LP, FB

Methodology: FP, ML, MF, PS, LP, FB, EB, MR

Investigation: KKF, PS, FP, LP, ML, ES, RA, MHC, MR, DO, LF, RC, BF, SCDTV, RAC, EB

Funding acquisition: FP, ML, FB, MF

Project administration: FP, ML

Supervision: FP, ML, FB

Writing – original draft: FP, ML, KKF, FB, MF

Writing – review & editing: FP, ML, FB, MF, KKF, LP, PS, EB, RAC

Competing interests: Authors declare that they have no competing interests.

Data and materials availability: All data are available in the main text or the supplementary materials.

Supplementary Materials

Materials and Methods

Figs. S1 to S3

Tables S1 to S3

References 41-47

Materials and Methods

Strains and plasmids constructions

363 All the strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 and S2, respectively.
The knockout strains (Table S1) were obtained by generalized Φ P1 transduction using donor
366 strains from the Keio collection (37). For the generation of specific knockouts, PCR
recombination with the λ Red system was used (38). Alleles were combined in a same strain by
generalized Φ P1 transduction. When necessary, the antibiotic resistance marker was removed
369 using FLP recombinase expression from plasmid pCP20 as described previously (39). Cassette
removal and plasmid loss were verified by antibiotic sensitivity and confirmed by PCR
amplification.

Expression plasmids for *pheA* and *ubiIH* were constructed using primers listed in Table
372 S3. DNA fragments obtained by PCR on genomic DNA from the MG1655 strain were cloned
in EcoRI/XhoI restriction sites of the pTet vector (15). The compatible plasmid pACYC-pBAD-
ubiUV was constructed by transferring the EcoRV/HindIII fragment from pES232 into the
375 pACYC184 vector digested by the same enzymes.

Media and growth conditions

378 Strains were grown in LB medium (10g/l of tryptone, 10g/l of NaCl and 5g/l of yeast
extract) or MOPS (<https://www.genome.wisc.edu/resources/protocols/mopsminimal.htm>)
supplemented with 0.4% glycerol as the carbon source and 19 amino acids (10 mM Ser, 0.8
381 mM Ala/Gly/Leu, 0.6 mM Gln/Glu/Val, 0.4 mM Arg/Asn/Ile/Lys/Phe/Pro/Thr, 0.2 mM
His/Met/Tyr, and 0.1 mM Cys/Trp), 5 vitamins (0.02 mM thiamine hydrochloride, 0.02 mM
calcium pantothenate, 0.02 mM 4-aminobenzoic acid, 0.02 mM 4-hydroxybenzoic acid, 0.02
384 mM 2,3-dihydroxybenzoic acid) according to Sakai *et al.* (17). Ampicillin (100 μ g/ml),
kanamycin (50 μ g/ml), chloramphenicol (35 μ g/ml), 4-HB (10 or 100 μ M), prephenate (1 mM)
(Sigma-Aldrich) and shikimate (10, 100, or 300 μ M) (Sigma-Aldrich) or synthesized labeled
387 18 O-shikimate (10 μ M) were added when needed from aqueous stock solutions sterilized by
filtration through 0.2 μ m filters. PheA and PheA-CM expression from pTet in Δ *pheA* Δ *tyrA*
strain was induced by promotor leak.

390 Aerobic cultures were performed in glass tubes (15 cm long and 2 cm in diameter) at 37°C,
with 180 rpm shaking. 5 mL of fresh medium was inoculated with 100 μ L of an overnight
culture and the culture was grown overnight.

393 Anaerobic cultures were performed in Hungate tubes as previously described (14), using
LB or MOPS media. LB medium was supplemented with 2.5 mg/liter resazurin as an anaerobic
indicator, with 100 mg/liter L-cysteine (adjusted to pH 6 with NaOH) in order to reduce residual
396 dioxygen, and with anti-foam (Sigma Life Science, 0.5 mL/L). 5 or 13 mL of this medium was
distributed in Hungate tubes and deoxygenated by bubbling high purity argon for 40 min. The
Hungate tubes were sealed and autoclaved. The resazurin was initially purple, it turned to pink
399 after deoxygenation and become colorless after autoclaving. The resazurin remained colorless
during culture indicating anaerobic conditions. The sterile MOPS medium was supplemented
with 100 mM sterile KNO₃ as final electron acceptor and 5 mL of this medium was distributed
402 to the Hungate tubes and deoxygenated under sterile conditions by bubbling high purity argon
for 40 min. The tubes were sealed and were then used for cultures. The precultures were
performed overnight at 37°C in Eppendorf tubes filled to the top with either LB or MOPS
405 media. The Hungate tubes were then inoculated through the septum by disposable syringes and
needles with 100 μ L of precultures and incubated at 37°C without agitation. For Hungate tubes
containing LB medium, the shikimate, the prephenate and the antibiotic were added after
408 autoclave and at the same time as the preculture. In contrast, for the Hungate tubes containing
MOPS medium, the supplements were added before deoxygenation.

411 For testing complementation of the $\Delta pheA \Delta tyrA \Delta ubiH$ mutant by *ubiUV*, in the presence
or absence of the PheA chorismate mutase activity and for testing complementation of the
414 \DeltaaroD or $\DeltaaroD \Delta ubiIH$ or $\Delta ubiIH$ mutants by *ubiUV*, in the presence or absence of shikimate,
strains were transformed and selection was performed in $-O_2$. Precultures were done in $-O_2$ in
LB at 37°C. The cultures were diluted in series (10 fold dilution at each step) in M9 medium
and 5 μ L drops were plated on minimal medium with 50 mM succinate and incubated at 37°C
417 in $+O_2$ or with 0.1% glucose and incubated in the absence of O_2 . Arabinose was added at the
concentrations indicated in figure legends for inducing expression of *ubiUV* genes.

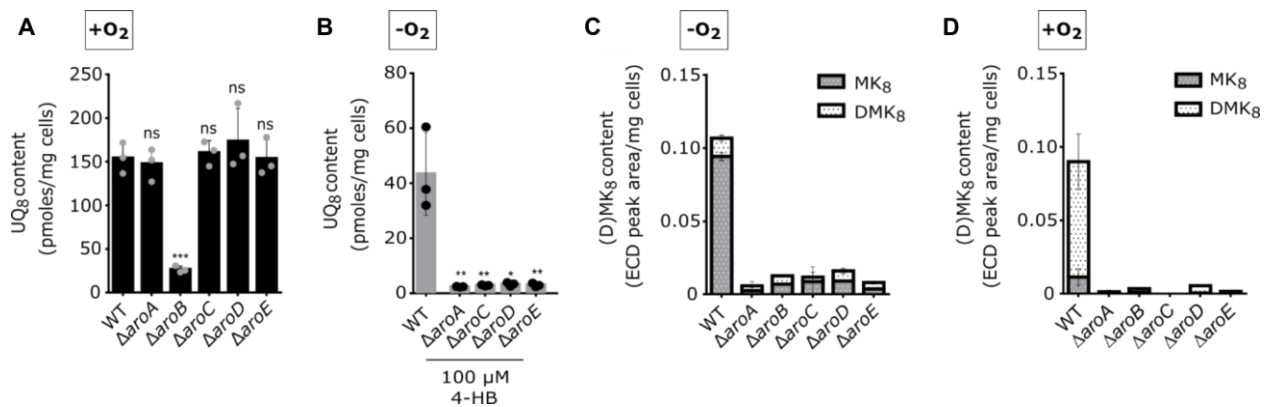
Lipid extraction and quinone analysis

420 5 mL of each culture was cooled on ice for at least 30 min before centrifugation at 3200 g
at 4°C for 10 min. Cell pellets were washed in 1 mL ice-cold phosphate-buffer saline (PBS)
and transferred to preweighted 1.5 mL Eppendorf tubes. After centrifugation at 12,000 g at 4
423 °C for 1 min, the supernatant was discarded, the cell wet weight was determined and pellets
were stored at -20°C until lipid extraction, if necessary. Quinone extraction from cell pellets
was performed as previously described (40). The dried lipid extracts were resuspended in 100
426 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 (Thermo
Scientific) at a flow rate of 1 mL/min with a mobile phase composed of 50% methanol, 40%
429 ethanol, and 10% of a mix (90% isopropanol, 10% ammonium acetate (1 M), and 0.1% formic
acid). When necessary, MS detection was performed on an MSQ spectrometer (Thermo
Scientific) with electrospray ionization in positive mode (probe temperature, 400°C; cone
432 voltage, 80 V). Single-ion monitoring detected the following compounds: UQ_8 ($M+H^+$), m/z
727-728, 6–10 min, scan time of 0.2 s; $^{18}O-UQ_8$ ($M+H^+$), m/z 729-730, 6–10 min, scan time of
0.2 s; $2(^{18}O)-UQ_8$ ($M+H^+$), m/z 731-732, 6–10 min, scan time of 0.2 s; $3(^{18}O)-UQ_8$ ($M+H^+$),
435 m/z 733-734, 6–10 min, scan time of 0.2 s; $4(^{18}O)-UQ_8$ ($M+H^+$), m/z 735-736, 6–10 min, scan
time of 0.2 s; UQ_8 ($M+NH_4^+$), m/z 744-745, 6–10 min, scan time of 0.2 s; UQ_{10} ($M+NH_4^+$),
438 m/z 880–881, 10-17 min. MS spectra were recorded between m/z 600 and 900 with a scan time
of 0.3 s. ECD and MS peak areas were corrected for sample loss during extraction on the basis
of the recovery of the UQ_{10} internal standard (40). The absolute quantification of UQ_8 based on
the m/z 744-745 signal at 7.8 min was performed with a standard curve of UQ_8 ranging from
441 6.25 to 50 pmol UQ_8 .

Synthesis of $C_4[^{18}O]$ -shikimate

444 The synthesis of $C_4[^{18}O]$ -Shikimate is described in Supplementary Data S1. To determine
the percentage of labeled shikimate, 3 or 9 μ L of an aqueous solution of the synthesized product
(0.34 mg/mL) was analyzed by HPLC-MS with a BetaBasic-8 column (Agilent C8 (4.6 X 150
447 mm; 5 μ m) at a flow rate of 0.7 mL/min with a mobile phase composed of 0.1% formic acid in
water. MS detection was performed on an MSQ spectrometer (Thermo Scientific) with
electrospray ionization in negative mode (probe temperature, 450°C; cone voltage, 60 V).
450 Single-ion monitoring detected the following compounds: ^{16}O -shikimate (M-H), m/z 172.5-
173.5, 0-6 min, scan time of 0.2 s; ^{18}O -shikimate (M-H), m/z 174.5-175.5, 0-6 min, scan time
of 0.2 s. MS spectra were recorded between m/z 150 and 300 with a scan time of 0.3 s. The
453 percentage of $C_4[^{18}O]$ -Shikimate was calculated as a ratio $(A_{175}/(A_{175}+A_{173})) \times 100$ in which
 A_{175} and A_{173} correspond to the peak area of the SIM signals at m/z 175 and m/z 173,
respectively. The value obtained ($64 \pm 1.2\%$) corresponds to the average of the values measured
456 for the two injections.

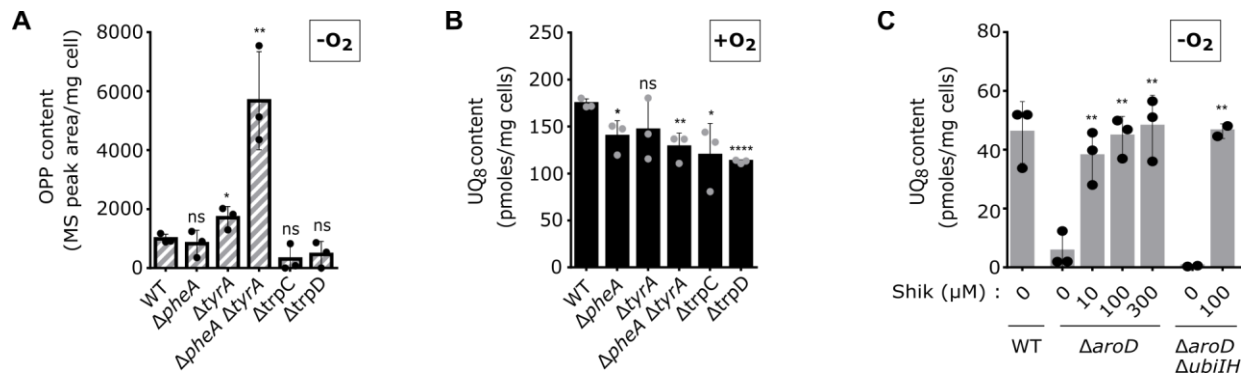
459



462 **Fig. S1.**

465 UQ₈ content in the *aro* mutant strains after aerobic growth in LB medium (A) and after
 466 anaerobic growth in LB medium supplemented with 100 μM 4-HB (B). MK₈ and DMK₈ content
 467 in the Δ*aro* mutant strains represented in figure 2 A-B after anaerobic growth (C) and in the
 468 Δ*aro* mutant strains represented in figure S1A after aerobic growth (D). Mean ± standard
 deviations (SD) (n=3). ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05 by unpaired Student's t-test
 comparing to WT. ns, no significant.

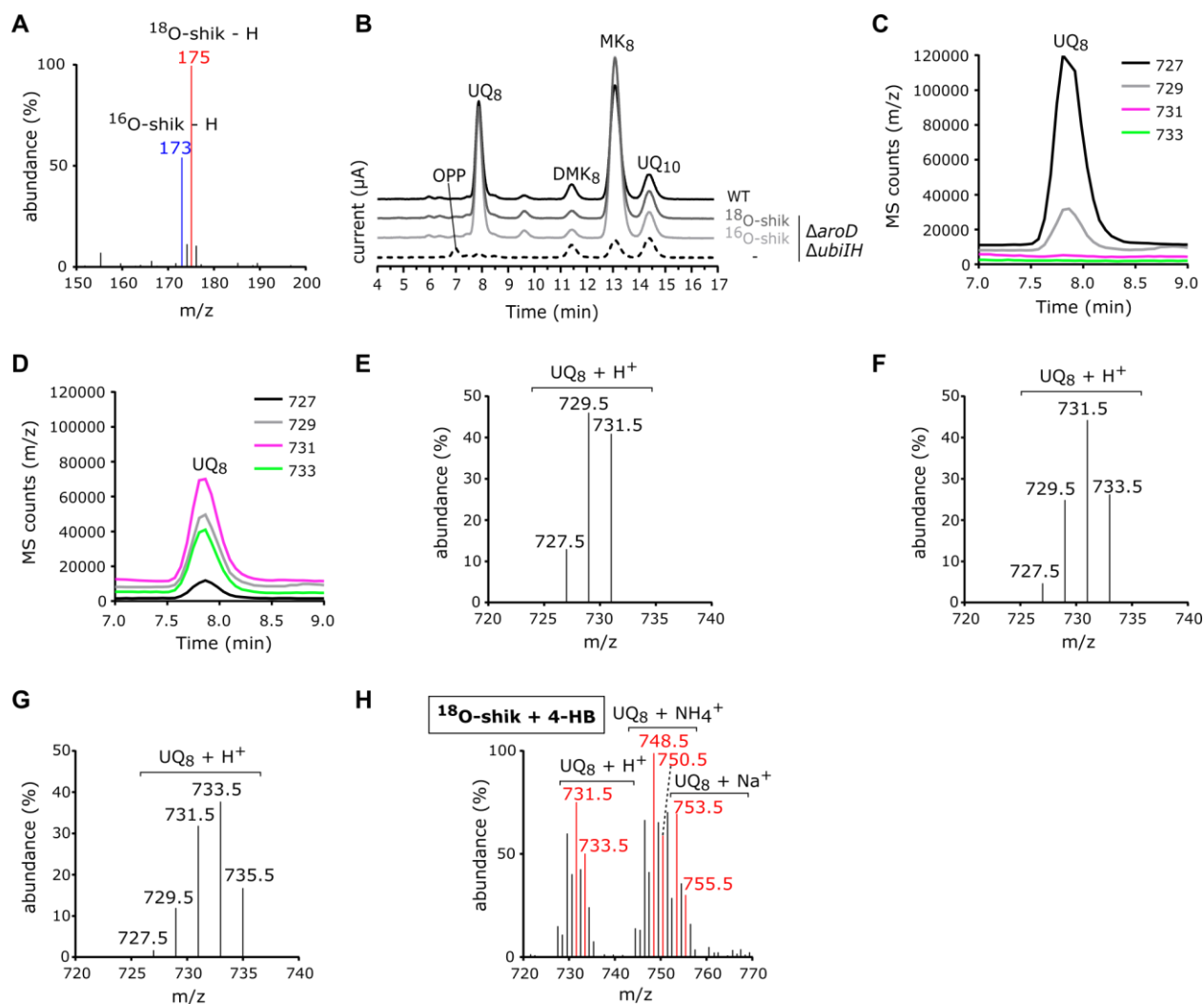
471



474 **Fig. S2.**

477 (A) OPP content in cells shown on figure 3A. UQ₈ content in the same strains than on figure
 480 3A after aerobic growth in LB medium (B) and in Δ*aroD* and Δ*aroD* Δ*ubiIH* cells after
 anaerobic growth in LB medium supplemented with 10, 100 or 300 μM of shikimate (C). Mean
 ± SD (n=3). ****P < 0.0001, **P < 0.01, *P < 0.05 by unpaired Student's t-test comparing to
 WT (A-B) and to mutant strains without added shikimate (C). ns, no significant; Shik,
 shikimate.

483



486

Fig. S3.

489 (A) Mass spectrum of synthesized $C_4[^{18}O]$ -shikimate with the peaks corresponding to the
 492 unlabeled (^{16}O -shik) and labeled (^{18}O -shik) compounds represented in blue and red,
 495 respectively. (B) HPLC-ECD analysis of lipid extracts from 1 mg of WT and $\Delta aroD \Delta ubiIH$
 498 stains represented in figure 4B-D. The chromatograms are representative of at least three
 independent samples. The peaks corresponding to UQ₈, OPP, DMK₈, MK₈ and the UQ₁₀
 standard are indicated. (C-D) HPLC-MS profiles for indicated SIM with H⁺ adduct (UQ₈ + H⁺)
 corresponding to the analyses of figure 4B (C) and figure 4C (D). (E-G) Theoretical abundance
 of H⁺ adducts of UQ₈ with two ^{18}O atoms ($^{18}O_2$ -UQ₈) (E), three ^{18}O atoms ($^{18}O_3$ -UQ₈) (F), or
 four ^{18}O atoms ($^{18}O_4$ -UQ₈) (G) based on $C_4[^{18}O]$ -shikimate labeled at 64%. (H) Mass spectrum
 of UQ₈ from $\Delta aroD \Delta ubiIH$ strain grown anaerobically in LB medium supplemented with 10
 μM of $C_4[^{18}O]$ -shikimate and 100 μM 4-HB corresponding to the analyses of figure 4D.

| Strain | Genotype | Construction | Source |
|---------------|---|--|------------|
| WT | MG1655 | | Lab strain |
| Δ aroA | BW25113 Δ aroA | | (37) |
| Δ aroB | BW25113 Δ aroB | | (37) |
| Δ aroC | BW25113 Δ aroC | | (37) |
| Δ aroD | BW25113 Δ aroD | | (37) |
| Δ aroE | BW25113 Δ aroE | | (37) |
| Δ trpC | BW25113 Δ trpC | | (37) |
| Δ trpD | BW25113 Δ trpD | | (37) |
| Δ tyrA | Δ tyrA::kan | Φ P1 transduction from Keio Δ tyrA to MG1655 | This work |
| Δ pheA | Δ pheA::kan | Φ P1 transduction from Keio Δ pheA to MG1655 | This work |
| FBE269 | Δ tyrA-pheA::kan | Cassette FRT-kan-FRT from plasmid pKD4 recombined in MG1655 using the λ Red system | This work |
| FBE303 | Δ tyrA-pheA | kanamycin cassette removed from FBE269 with pCP20 | This work |
| FBE860 | Δ ubiHI::cat | Cassette FRT-cat-FRT from plasmid pKD3 recombined in MG1655 using the λ Red | This work |
| FBE740 | Δ aroD::kan | Φ P1 transduction from Keio Δ aroD to MG1655 | This work |
| FBE748 | Δ ubiHI::cat Δ aroD::kan | Φ P1 transduction from FBE860 in FBE740 | This work |
| FBE843 | Δ ubiHI::cat Δ tyrA-pheA | Φ P1 transduction from FBE860 in FBE303 | This work |
| FBE1253 | Δ tyrA pheA Δ ubiH ::kan | Φ P1 transduction from Keio Δ ubiH to FBE303 | This work |

Table S1

Strains used in this study

| Plasmid | Name | Description | Source |
|----------------|---------------------------|--|---------------|
| pCP20 | pCP20 | Amp, Cm, FLP recombinase expression | (39) |
| pEB268 | pKD3 | AmpR – FRT-cat-FRT | (38) |
| pEB269 | pKD4 | AmpR – FRT-kanaR-FRT | (38) |
| pEB1823 | pTet | AmpR – ColE1 ori – pBAD promoter | (15) |
| pES031 | pTet- <i>pheA</i> | PCR on MG1655 genomic DNA ebp28/29 (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pES047 | pTet- <i>pheA_CM</i> | PCR on MG1655 genomic DNA ebp28/43 (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pES059 | pTet- <i>ubiH</i> | | (15) |
| pES077 | pTet- <i>ubiHI</i> | PCR on MG1655 genomic DNA ebp61/65 (EcoRI/XhoI) in pTet (EcoRI/XhoI) | This work |
| pEB227 | pBAD24 | AmpR – ColE1 ori – pBAD promoter | (41) |
| pES154 | pBAD- <i>ubiUV</i> | | (15) |
| pES185 | pBAD- <i>ubiU(C176A)V</i> | | (15) |
| pEB067 | pACYC184 | Cam, Tet, p15a origin | (42) |
| pES232 | pACYC-pBAD- <i>ubiUV</i> | pES154 (EcoRV/HindIII) in pEB067 (EcoRV/HindIII) | This work |

Table S2.

Plasmids used in this study

| Primers | Sequence | Use |
|----------------|--|------------|
| Ebp28 | ACTGAATTCATGACATCGGAAAACCCGTTAC | pheA FW |
| Ebp29 | ACGCTCGAGTTAGGTTGGATCAACAGGCAC | pheA RV |
| Ebp43 | ACGCTCGAGTTATGAGTGCGGATTAATTTATTGAGATG | pheA_CM RV |

Table S3.

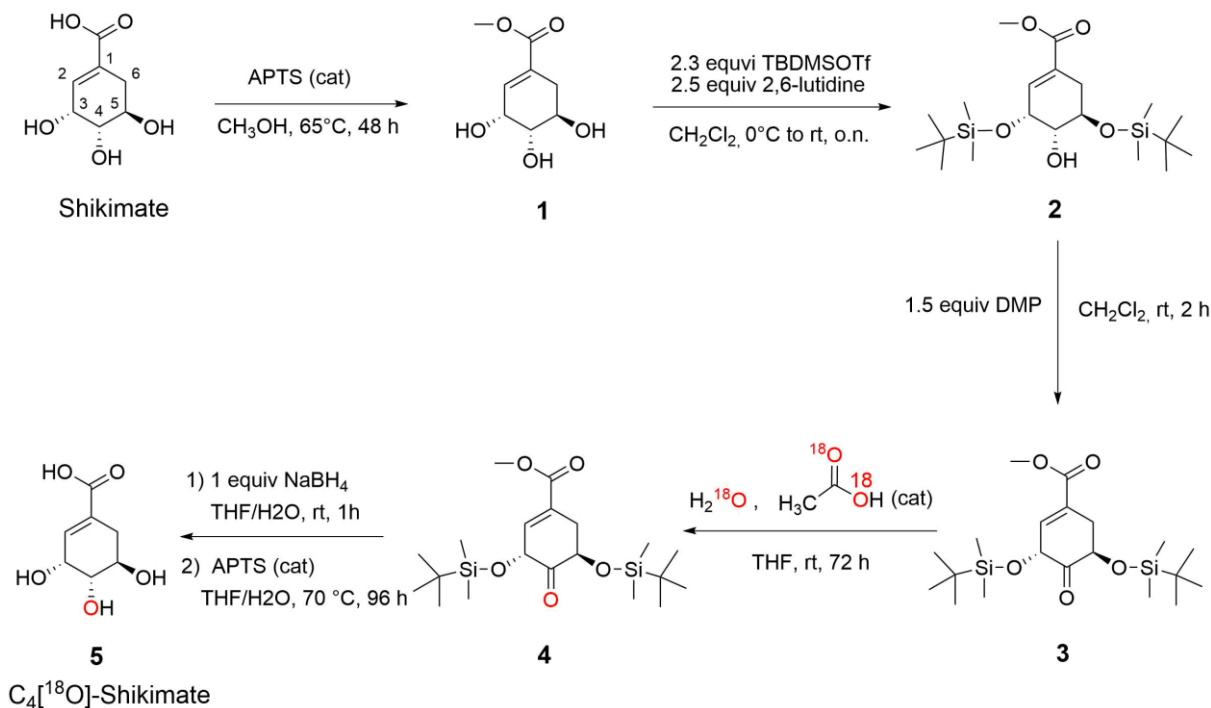
Primers used in this study

Data S1.

See separate file.

Data S1:

501 Synthesis of C₄[¹⁸O]-Shikimate



504

The synthesis of C₄[¹⁸O]-shikimate was performed in five steps, starting with commercial shikimate. The general strategy was to protect all the reactive functions except the alcohol at position 4, in order to label it selectively with ¹⁸O, and then to remove the protective groups.

507

The first step consisted in protecting the carboxylic acid by an esterification reaction. This was carried out using methanol and paratoluenesulphonic acid (APTS), which acts as a catalyst. In

510

a second step, the two alcohol functions at positions 3 and 5 were selectively protected with a silyl group. The tert-Butyldimethylsilyl group was chosen for its bulky nature and stability. The synthesis was carried out according to a slightly modified procedure previously published(43)

513

by substituting tert-Butyldimethylsilyl chloride with tert-Butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TBDMSOTf), for its high reactivity towards hindered alcohols. In

516

a third step, the hydroxyl function at position 4 was oxidized to the corresponding ketone, using the Dess-Martin Periodinane (DMP) reagent, known for its gentle and selective conversion of alcohols into carbonyl compounds(44). In the fourth step, the ketone was labelled with H₂¹⁸O in an acidic aqueous medium (CH₃C¹⁸O₂H) based on previously published work(45). In the

519

fifth final step, the selective reduction of the labelled ketone was achieved with NaBH₄, leading

exclusively to the desired diastereomer. Finally, all the protecting groups were removed in the presence of APTS and H₂O to give the C₄[¹⁸O]-Shikimate.

522 All solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. Dry THF was purchased under argon from Sigma-Aldrich. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using precoated silica gel plates from
525 Macherey-Nagel (DC-Fertigfolie POLYGRAM SIL G/UV254) followed by phosphomolybdic acid and heat as developing agents. Centrifugation was performed on Eppendorf Centrifuge 5424 R.

528 **NMR analysis:** Spectra of Compounds **1**, **2**, **3**, **5** (¹⁸O Shikimate) and commercial Shikimate were recorded on Bruker Advance 300 MHz NMR spectrometer. The chemicals shift (δ) are given in ppm and were measured relative to solvent residual peaks as an internal standard. For
531 ¹H NMR: CDCl₃, δ 7.26; CD₃OD, δ 3.31. For ¹³C NMR CDCl₃, δ 77.16; CD₃OD, δ 49. The data is being reported as (s = singlet, d= doublet, t = triplet, m = multiplet or unresolved, coupling constant(s) in Hz, integration, interpretation). HPLC analyses of **5** were performed on
534 Agilent 1260 Infinity II with an Atlantis Prep T3 column (10 × 250 mm, particle size 5μM) using the following settings: flow: 2 mL/min, injection volume: 40 μL. Solvent A : H₂O/TFA 0.1% (v/v), Solvent B: Acetonitrile. An isocratic flow with 100% solvent A was performed (0-
537 15 min) followed by a gradient (15-22 min) from 0% to 5% solvent B, and then a gradient (22-30 min) from 5 to 100 % solvent B. Elution of the HPLC column was followed at 215 nm. The final purified product was concentrated using Labconco CentriVap Concentrator connected to
540 the Labconco CentriVap Cold Trap and the Vacuubrand Pump.

HR-MS analysis: Compounds **1**, **2**, **3**, **5** (¹⁸O Shikimate) and commercial Shikimate were diluted to 1μg/mL into 1:1:4 mix of Isopropyl alcohol 20 % in water, methanol and acetonitrile
543 before mass measurement. Each compound was nanoelectrosprayed using Nanomate (TriVersa) equipped with 5.5 μm ID nozzle chip mounted on Q exactive HF (ThermoFisher Scientific) high resolution orbitrap mass spectrometer. Masses were recorded at 60,000
546 resolution at 200 m/z, with an AGC set at 1^E6 and with 1 μscan per scan in negative mode (except for compound **1**, recorded in positive mode).

MS/MS analysis: Commercial Shikimate and compound **5** were isolated with a 1.9 Th width
549 and 1^E6 AGC value. Then isolated compounds were fragmented by Higher-energy collisional dissociation (HCD) with a normalized energy of collision of 10 and the resulted spectra recorded between 70 and 180 m/z.

552

Synthesis of methyl (3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (1):

Shikimate (1g, 5.7 mmol, 1 equiv) and methanol (25 mL) were added to a 100 mL round bottom flask equipped with a stir bar and a reflux condenser. The mixture was heated to reflux and stirred to ensure dissolution of shikimate. After complete dissolution, paratoluene sulfonic acid (APTS) (50mg, 0.26 mmol) was introduced as a catalyst (cat) and was heated to reflux for 2 days, after which ^1H NMR analysis of a reaction aliquot indicated complete conversion. Therefore, the mixture was allowed to cool to room temperature then the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up in a minimal amount of methanol. The product was purified by pouring the reaction mixture drop by drop into excess pentane under rapid stirring and the precipitate filtered off using a *Büchner vacuum filtration funnel* to afford the expected product shikimate ester as a white powder (833 mg, 4.4 mmol, 77%).

Figure S1: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , 25 °C) δ 6.81 (dtd, $J = 3.7, 1.9, 0.7$ Hz, 1H, H_2), 4.38 (m, 1H, H_3), 4.01 (dddd, $J = 7.1, 5.4, 4.9, 0.6$ Hz, 1H, H_5), 3.76 (s, 3H, COOMe), 3.71 (dd, $J = 7.2, 4.2$ Hz, 1H, H_4), 2.71 (ddtd, $J = 18, 4.8, 1.8, 0.3$ Hz, 1H, H_6), 2.22 (ddt, $J = 18, 5.3, 1.7$ Hz, 1H, H_6').

Figure S2: ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD , 25 °C) δ 168.14, 138.53, 129.62, 72.01, 67.83, 66.69, 51.78, 30.91.

Figure S3: *HRMS* Calculated $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5$ $[M+H]^+$ 189.07574 | Found 189.0758

Figure S1: Compound **1**
 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD)

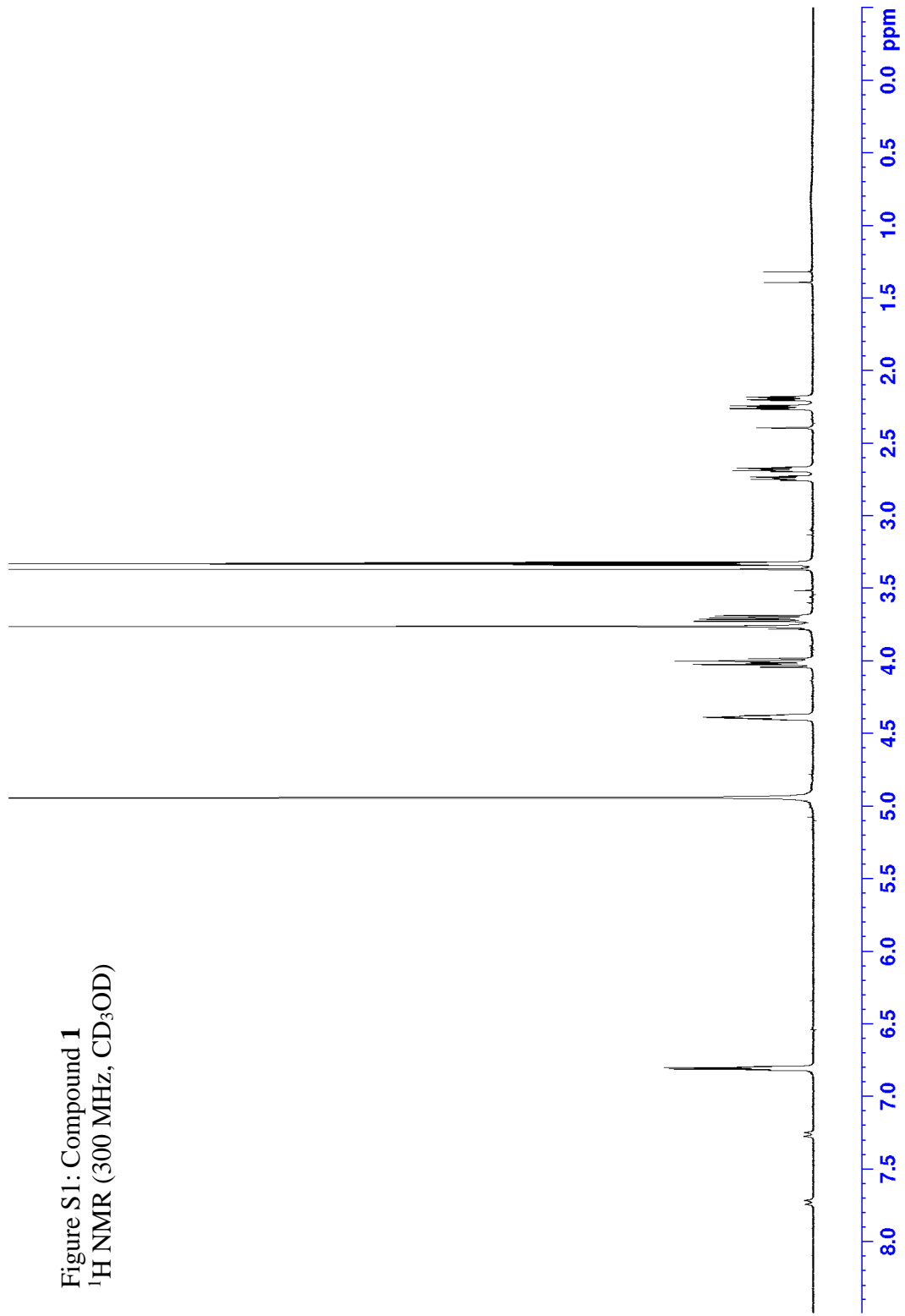


Figure S2: Compound **1**
 ^{13}C NMR (300 MHz, CD_3OD)

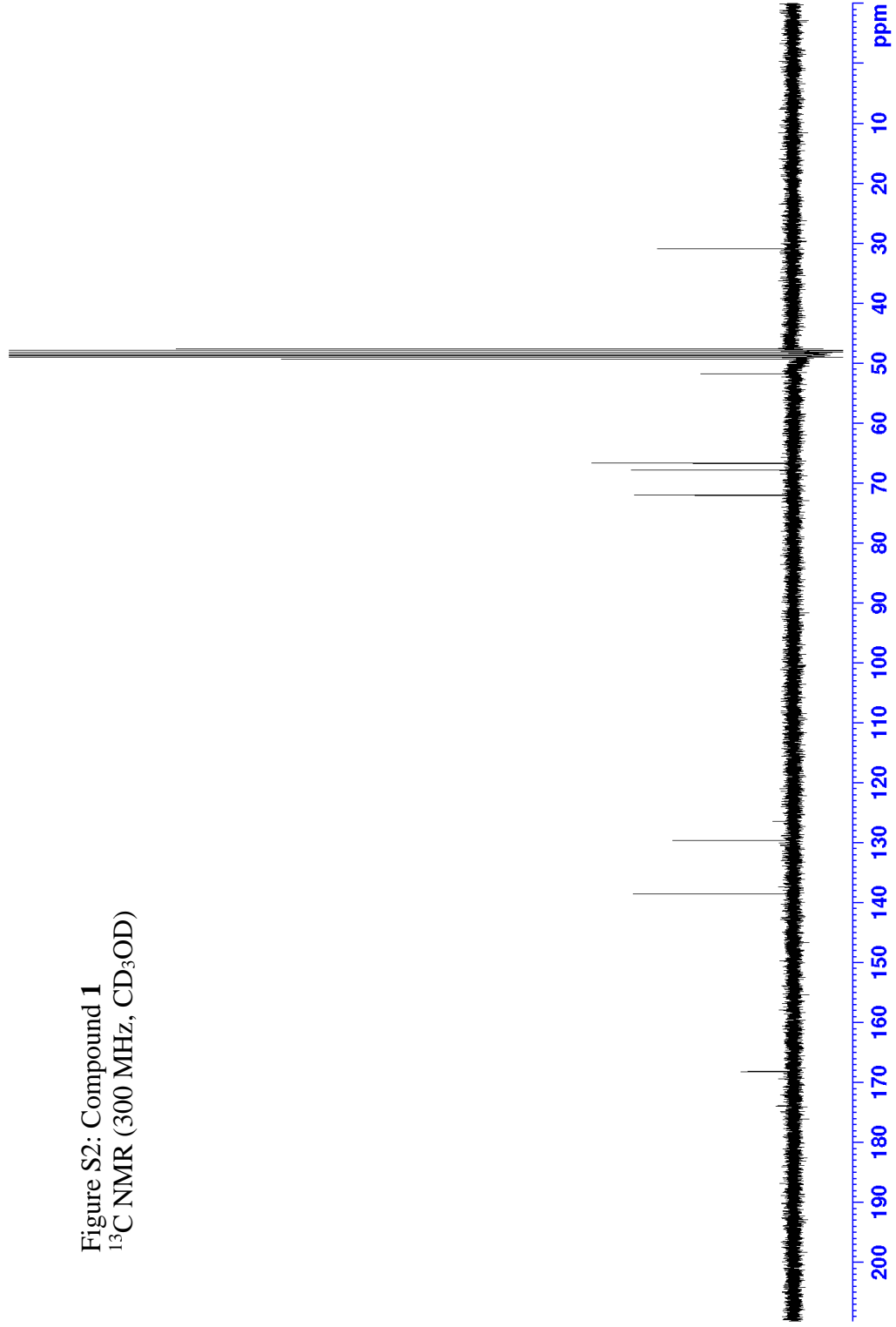
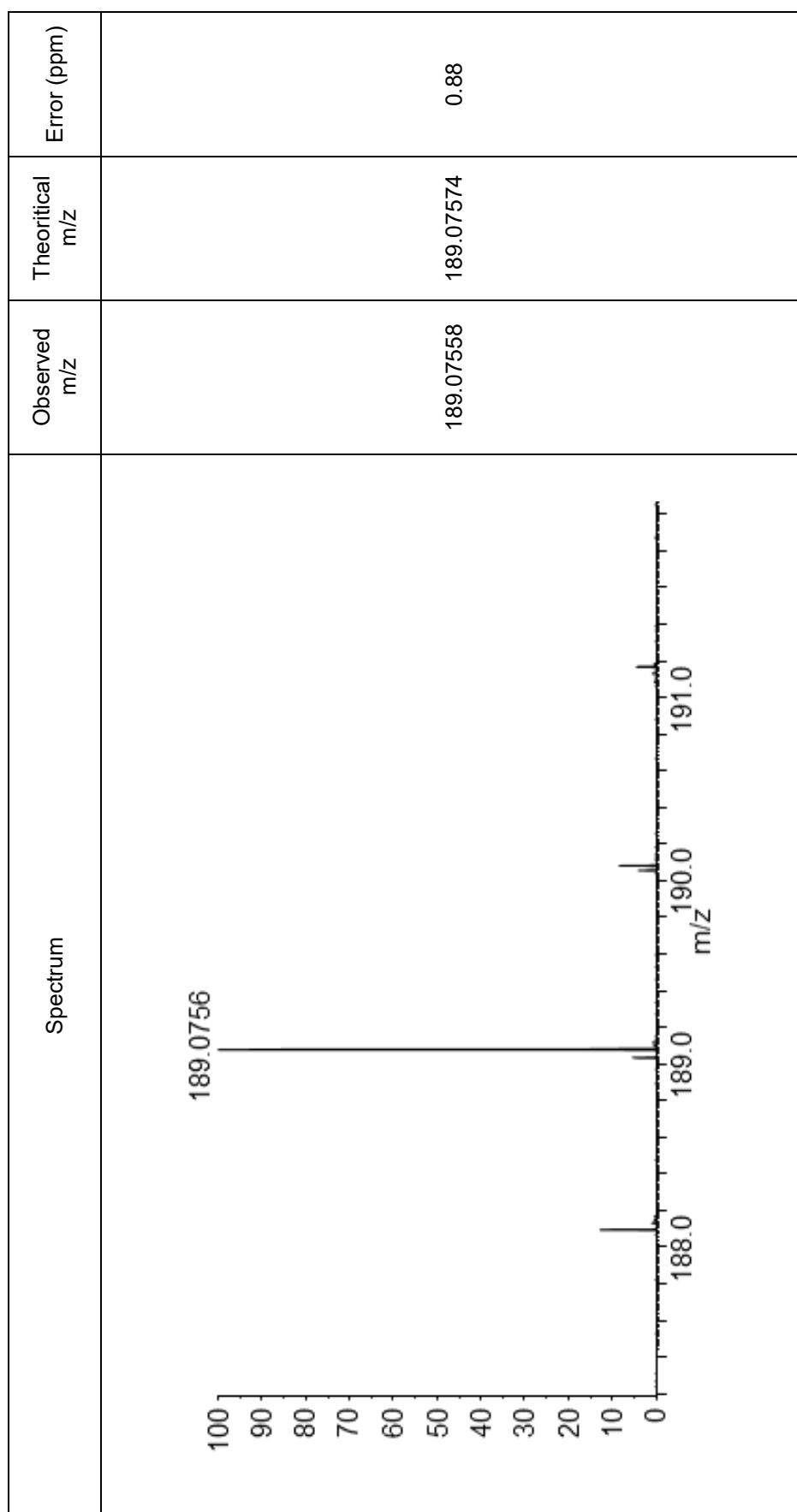


Figure S3: HRMS of compound **1**



Synthesis of methyl (3R,4S,5R)-3,5-bis((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-4-hydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (2):

A 250 mL round bottom flask equipped with reflux condenser and stir bar was charged with dichloromethane (50 mL) and compound **1** (833 mg, 4.4 mmol, 1 equiv). The solution was stirred and heated under reflux for 2 hours to dissolve the shikimate ester. After being refluxed, the mixture was allowed to cool to room temperature then in an ice bath. The stirring was continued in ice. 2,6-lutidine (1.28 mL, 11 mmol, 2.5 equiv) was added to the solution and TBDMSOTf (2.3 mL, 10.1 mmol, 2.3 equiv) was gradually introduced to the resulting mixture, starting with 1 mL. After 2 hours, the remaining of the TBDMSOTf (1.3 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. TLC analysis showed a large proportion of desired double protected product (low R_f) and low level of triple protected product (high R_f). The crude mixture was purified by column chromatography over silica gel using dichloromethane as eluent to give 1.2 g (2.9 mmol, 65 %) of product **2** as a colourless oil. The ^1H and ^{13}C NMR spectra are consistent with the literature(43).

Figure S4: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 6.63 (dddd, $J = 2.7, 2.5, 1.5, 1.4$ Hz, 1H, H_2), 4.54 (m, 1H, H_3), 4.20 (dddd, $J = 5.8, 4, 3.3, 0.5$ Hz, 1H, H_5), 3.76 (s, 3H, COOMe), 3.70 (ddd, $J = 5.4, 4, 1.3$ Hz, 1H, H_4), 2.63 (ddtd, $J = 18.3, 4.2, 2.7, 0.3$ Hz, 1H, H_6), 2.24 (ddt, $J = 18.4, 3.3, 1.5$ Hz, 1H, H_6'), 0.94 (s, 9H, Me_3Csi), 0.87 (s, 9H, Me_3Csi), δ 0.16 (s, 3H, MeSi), 0.14 (s, 3H, MeSi), 0.09 (s, 3H, MeSi), 0.07 (s, 3H, MeSi).

Figure S5: ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 167.22, 137.35, 128.51, 70.74, 68.23, 67.54, 51.80, 29.61, 25.79, 25.68, 18.14, 17.93, -4.63, -4.80, -4.90, -4.96.

Figure S6: HRMS Calculated $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{Si}_2$ $[M-H]^+$ 415.23415 | Found 415.23462

Figure S4: Compound 2
 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

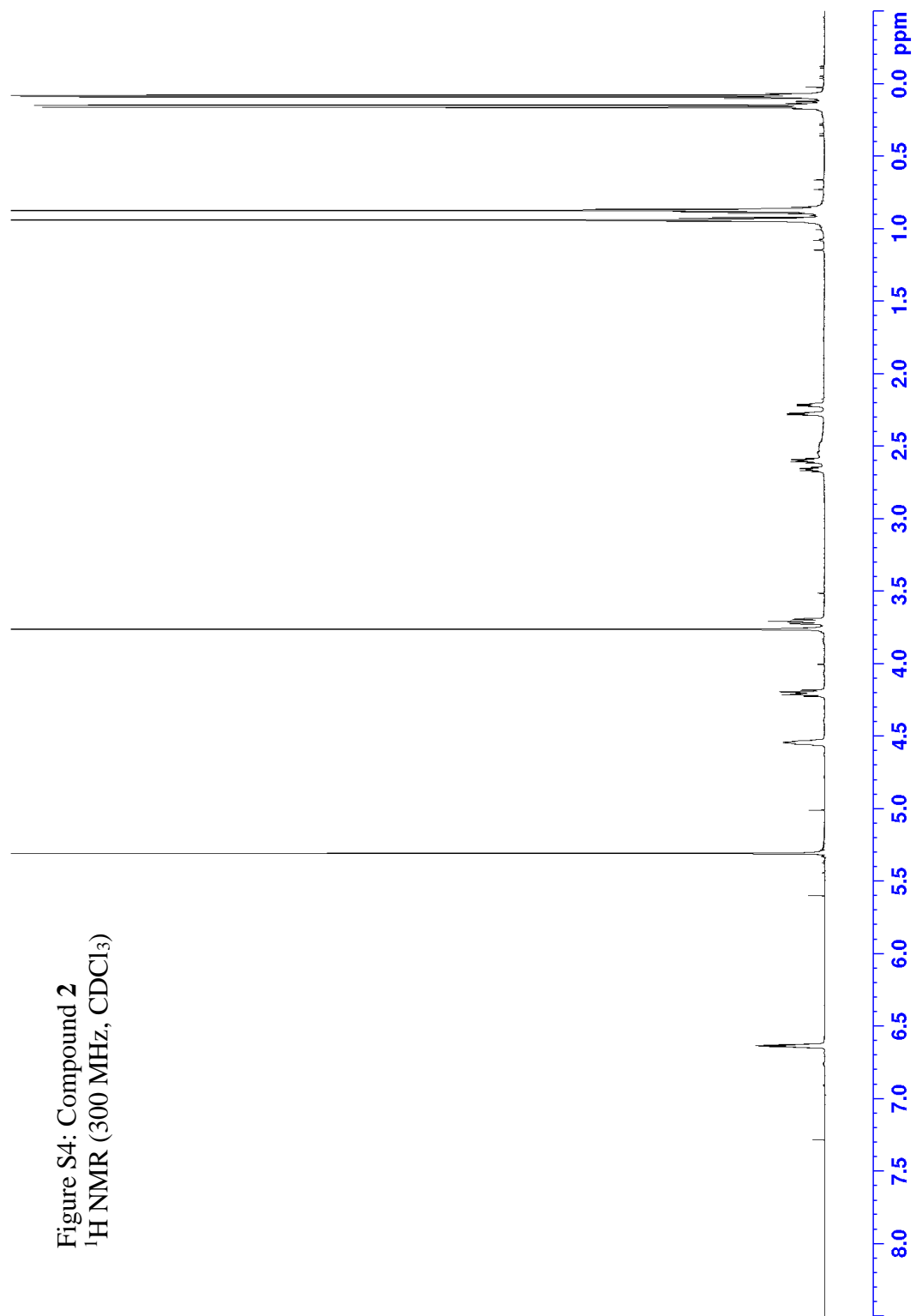


Figure S5: Compound 2
 ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3)

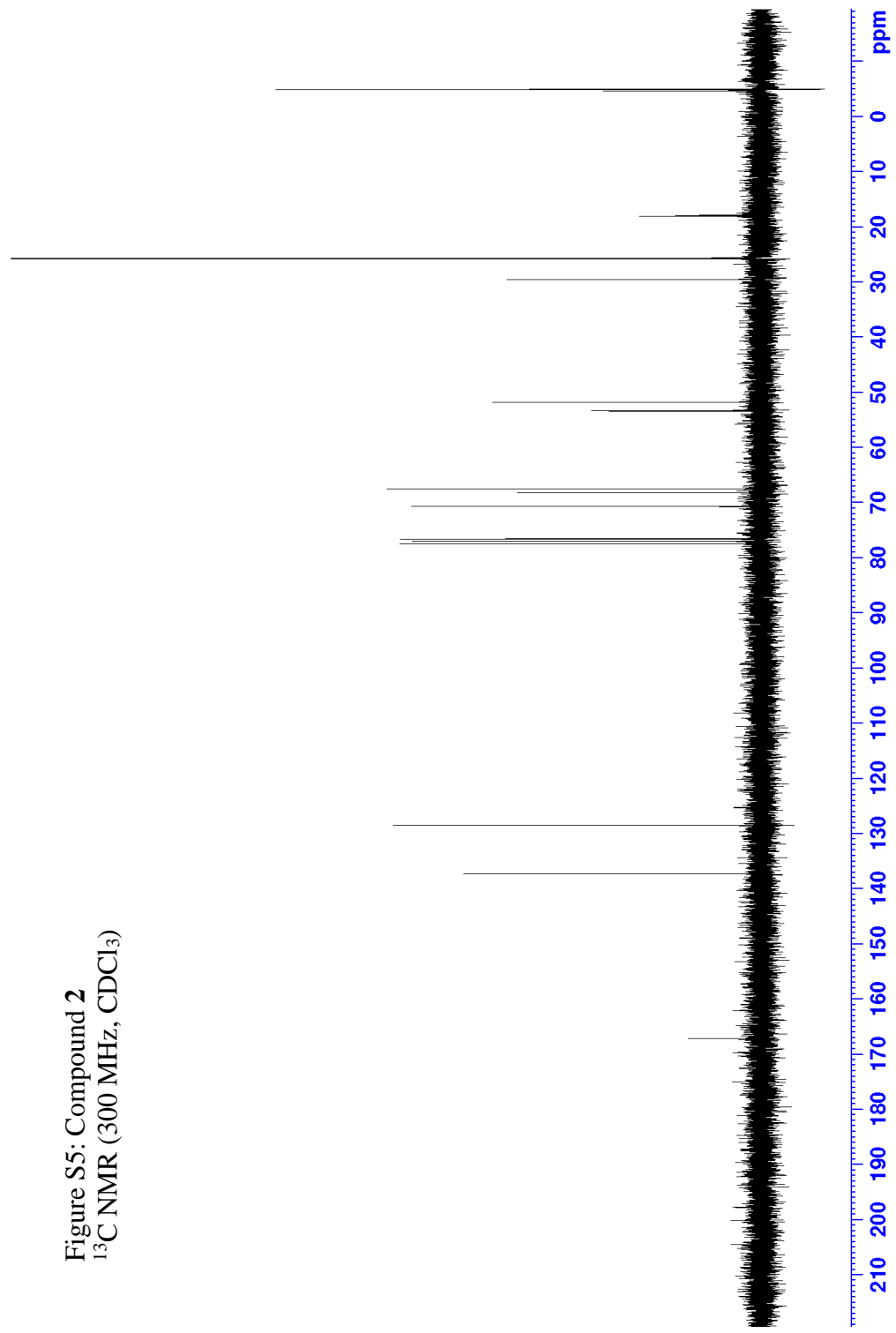
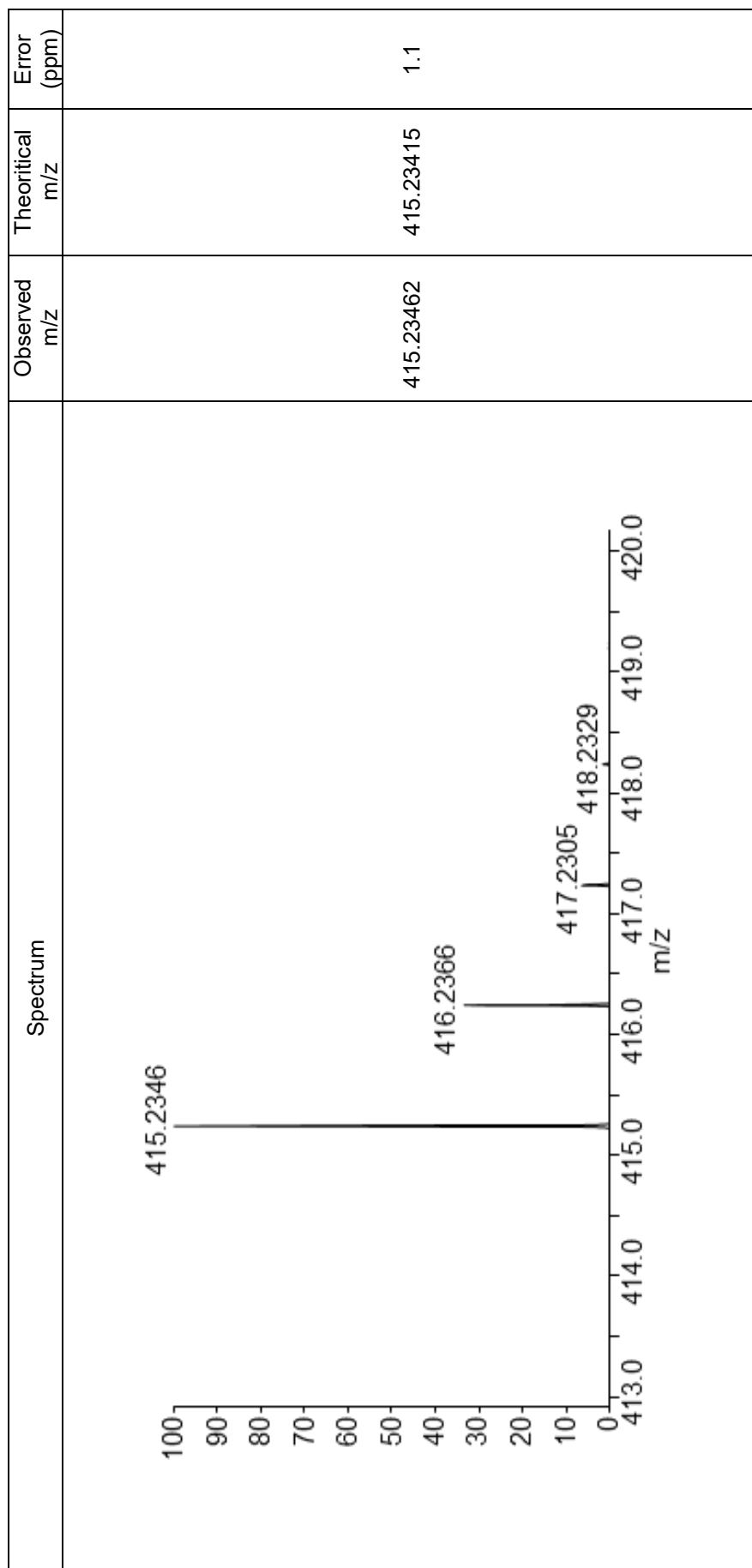


Figure S6: HRMS of compound 2



Synthesis of methyl (3R,5R)-3,5-bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-4-oxocyclohex-1-ene-1-carboxylate (3):

Dess-Martin Periodinane (14.5 mL, 4.35 mmol, 1.5 equiv) was added to **2** (1.2 g, 2.9 mmol, 1 equiv) in dichloromethane (40 mL). The solution was stirred at room temperature for two hours during which a white precipitate was gradually formed. Full product recovery was confirmed by TLC. The mixture was split into eppendorfs microtubes and centrifuged (1 min, 10000 rpm) at room temperature. The pellets containing the white precipitate were removed and the combined supernatants were purified via column chromatography over silica gel, using dichloromethane as eluent, to yield the final product as a colourless oil (542 mg, 1.3 mmol, 45 %).

Figure S7: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 6.74 (dt, $J = 3.3, 1.5$ Hz, 1H, H_2), 4.93 (ddd, $J = 3, 1.8, 1$ Hz, 1H, H_3), 4.4 (dd, $J = 5.7, 5.1$ Hz, H_5), 3.72 (s, 3H, COOMe), 2.9 (ddt, $J = 18, 5.7, 1.2$ Hz, 1H, H_6), 2.68 (ddd, $J = 18, 5, 1.8$ Hz, 1H, H_6'), 0.87 (s, 9H, Me_3Csi), 0.84 (s, 9H, Me_3Csi), 0.09 (s, 3H, MeSi), 0.07 (s, 3H, MeSi), 0.05 (s, 3H, MeSi), 0.03 (s, 3H, MeSi).

Figure S8: $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 206.50, 167.12, 139.95, 129.87, 73.46, 71.45, 53.02, 37.24, 26.57, 26.48, 19.21, 18.97, -3.87, -4.09, -4.33, -4.40.

Figure S9: **HRMS** Calculated $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{Si}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ 413.21849 | Found 413.21886

Figure S7: Compound **3**
 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

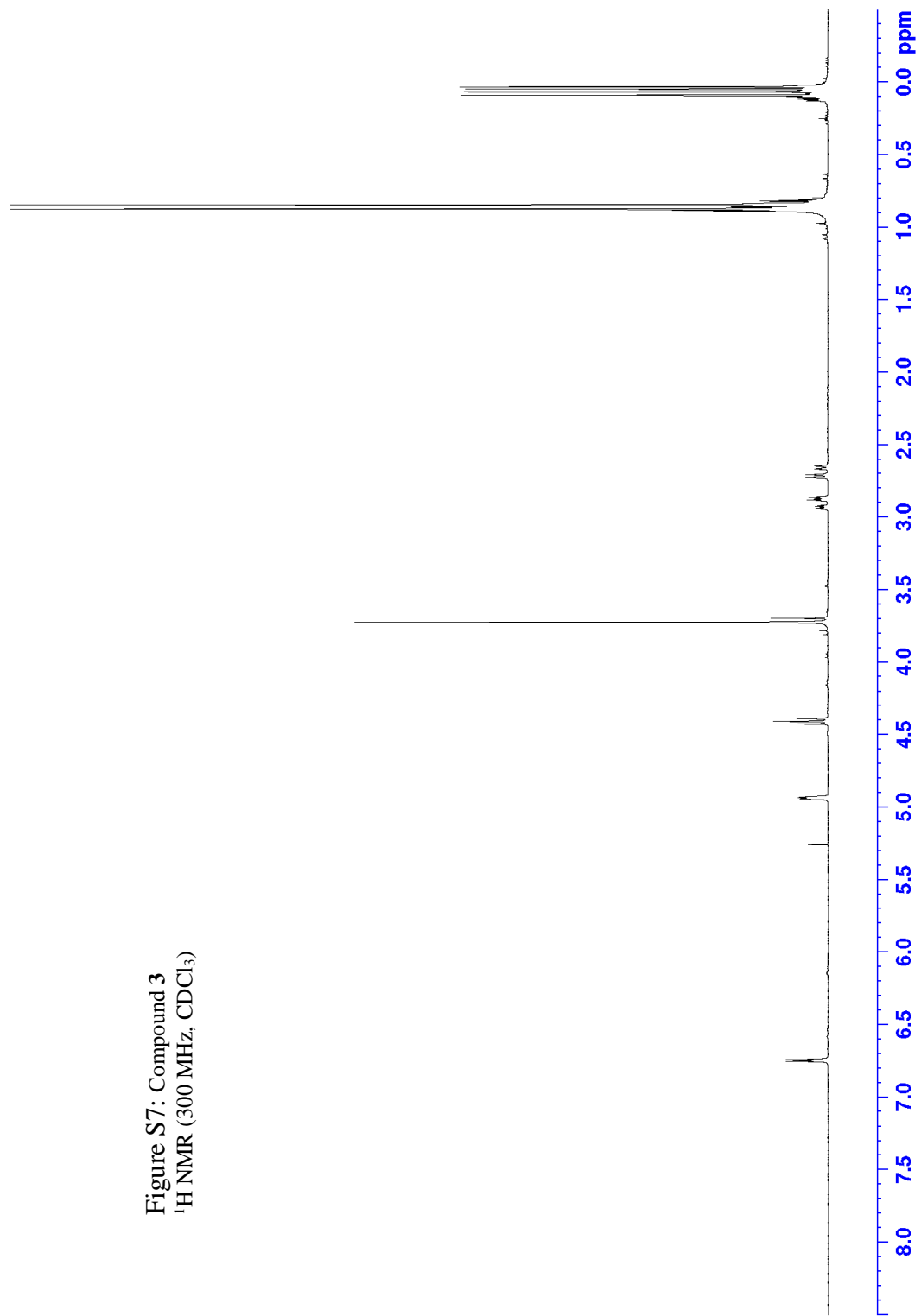


Figure S8: Compound **3**
 ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3)

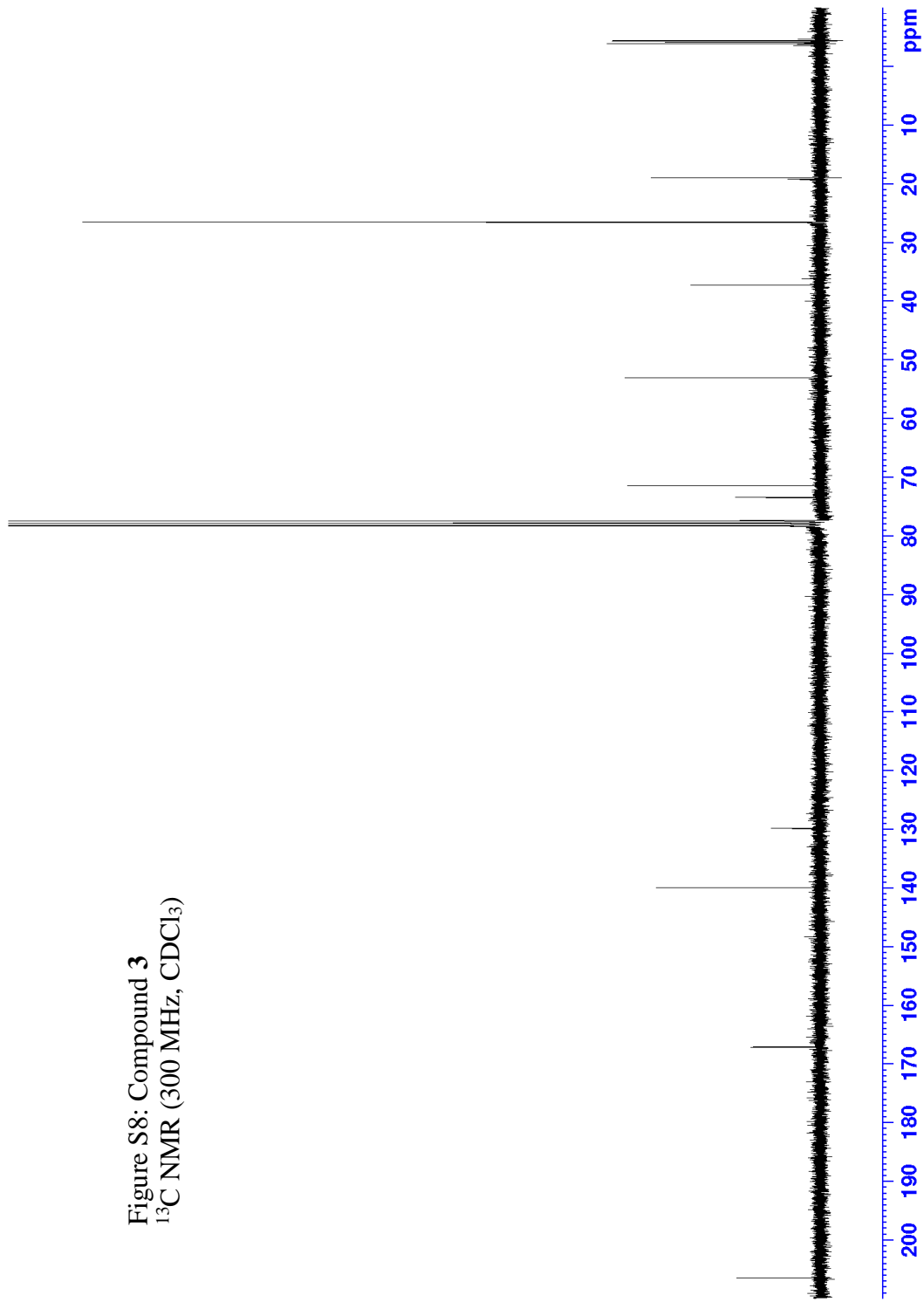
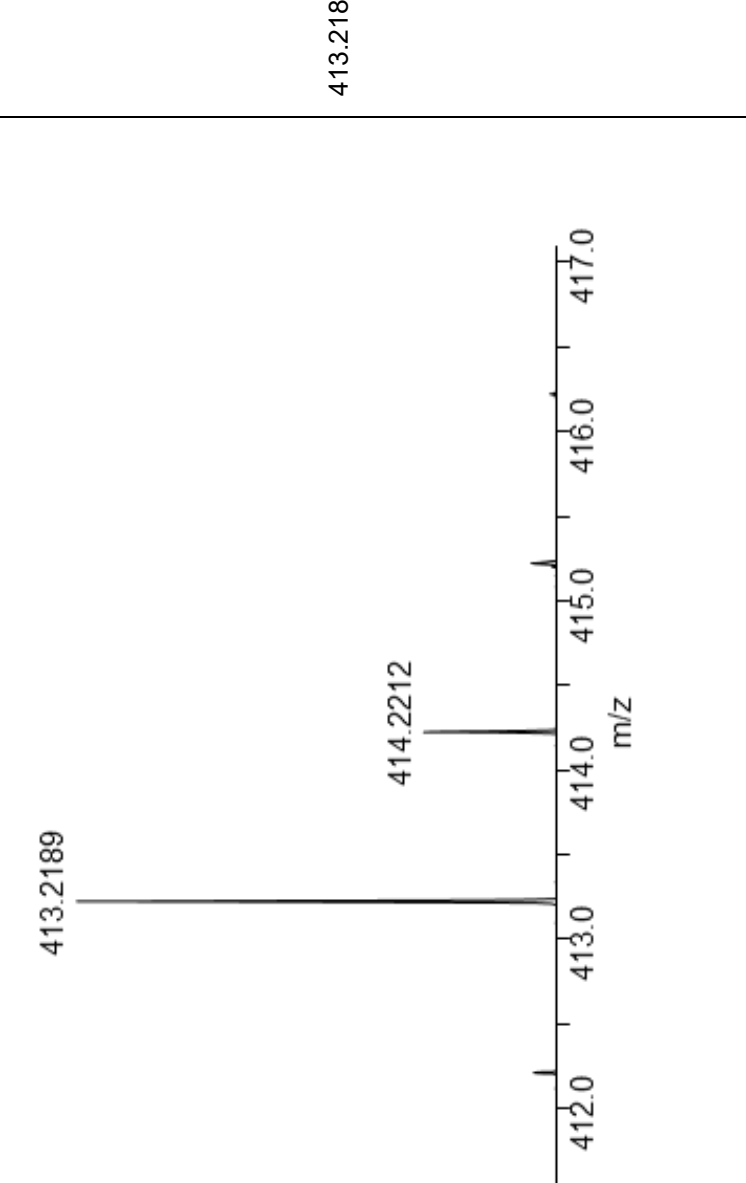


Figure S9: HRMS of compound **3**

| Spectrum | Observed m/z | Theoretical m/z | Error (ppm) |
|---|--------------|-----------------|-------------|
|  <p>The HRMS spectrum displays relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (412.0 to 417.0). The base peak is at m/z 413.2189. A second major peak is at m/z 414.2212. Minor peaks are visible at m/z 412.0 and 415.0.</p> | 413.21886 | 413.21849 | 0.9 |

Synthesis of methyl (3R,5R)-3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-4-[¹⁸O]oxocyclohex-1-ene-1-carboxylate (4):

The previously obtained ketone **3** (100mg, 0.24 mmol, 1 equiv) was suspended in dry THF (0.8 mL). Then, H₂¹⁸O (0.4 mL) and acetic acid-¹⁸O₂ (5 μL, 0.09 mmol), as a catalyst, were added and the resulting mixture was stirred for 3 days at room temperature. The solvent was removed by rotary evaporation. To avoid ¹⁸O/¹⁶O exchange during purification and to prevent the loss of oxygen-18 labelling, the crude compound **4** was used without further purification in the following steps.

Synthesis of C₄[¹⁸O] shikimate, (3R,4S,5R)-3,4[¹⁸O],5-trihydroxy-4-cyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (5):

To a solution of ¹⁸O labelled ketone **4** (100mg, 0.24 mmol, 1 equiv) from the previous step in THF (900 μL) and H₂O (100 μL), was introduced NaBH₄ (480 μL, 0.24 mmol, 1equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The solvent was evaporated and the residue was suspended in H₂O (2 mL) and THF (2μL). To this solution was added APTS (10 mg, 0.05 mmol) as a catalyst. The resulting mixture was stirred at 70°C for 4 days. The crude was purified by HPLC (the expected product is eluted at 13.6 min) to obtain the final product as a white solid (4.25 mg, 0.024 mmol). The yield for the last two steps is 10 %.

The ¹³C NMR spectrum of compound **5** shows two chemical shifts (71.30 and 71.32 ppm) of the carbon at position C4, corresponding to C4[¹⁸O]-shikimate and C4[¹⁶O]-shikimate respectively (superimposition x). It has been reported that the chemical shift of a carbon atom carrying an oxygen isotope can be slightly modified (46, 47).

Figure S10: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C) δ 6.81 (dtd, J = 3.8, 1.9, 0.6 Hz, 1H, H₂), 4.38 (m, 1H, H₃), 4.0 (dddd, J = 7.4, 5.6, 4.9, 0.5 Hz, 1H, H₅), 3.70 (dd, J = 7.2, 4.2 Hz, 1H, H₄), 2.71 (ddtd, J = 18.2, 4.9, 1.8, 0.3 Hz, 1H, H₆), 2.21 (ddt, J = 18.1, 5.5, 1.7 Hz, 1H, H₆′).

Figure S11: ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, 25 °C) δ 168.66, 137.46, 129.32, 71.32, 71.30, 67.02, 65.93, 30.23.

Figure S12: Overlay of ¹H NMR spectra (300 MHz, CD₃OD) of commercial Shikimate (red trace) and of Compound **5** (blue trace)

Figure S13: Overlay of ¹³C NMR spectra (300 MHz, CD₃OD) of commercial Shikimate (red trace) and Compound **5** (blue trace)

Figure S14: Zoom into the 70-72.5 ppm chemical shifts of the overlay of ^{13}C NMR spectra (300 MHz, CD_3OD) of commercial Shikimate (red trace) and Compound **5** (blue trace)

Figure S15: *HRMS of Compound 5, Calculated $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_4^{18}\text{O}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ 175.04870 | Found 175.04880*

High-resolution mass spectrometry analysis of the synthesised $\text{C}_4[^{18}\text{O}]$ -shikimate determined an Oxygen 18 labelling rate of approximately $63 \pm 3\%$.

Figure S16; *HRMS of commercial Shikimate, Calculated $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ 173.04445 | Found 173.04449*

Figure S17: **MS/MS** spectrum of *Compound 5*

Figure S18: Overlay of **MS/MS** spectra of *Compound 5 and of commercial Shikimate*

Figure S10: Compound **5**
 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD)

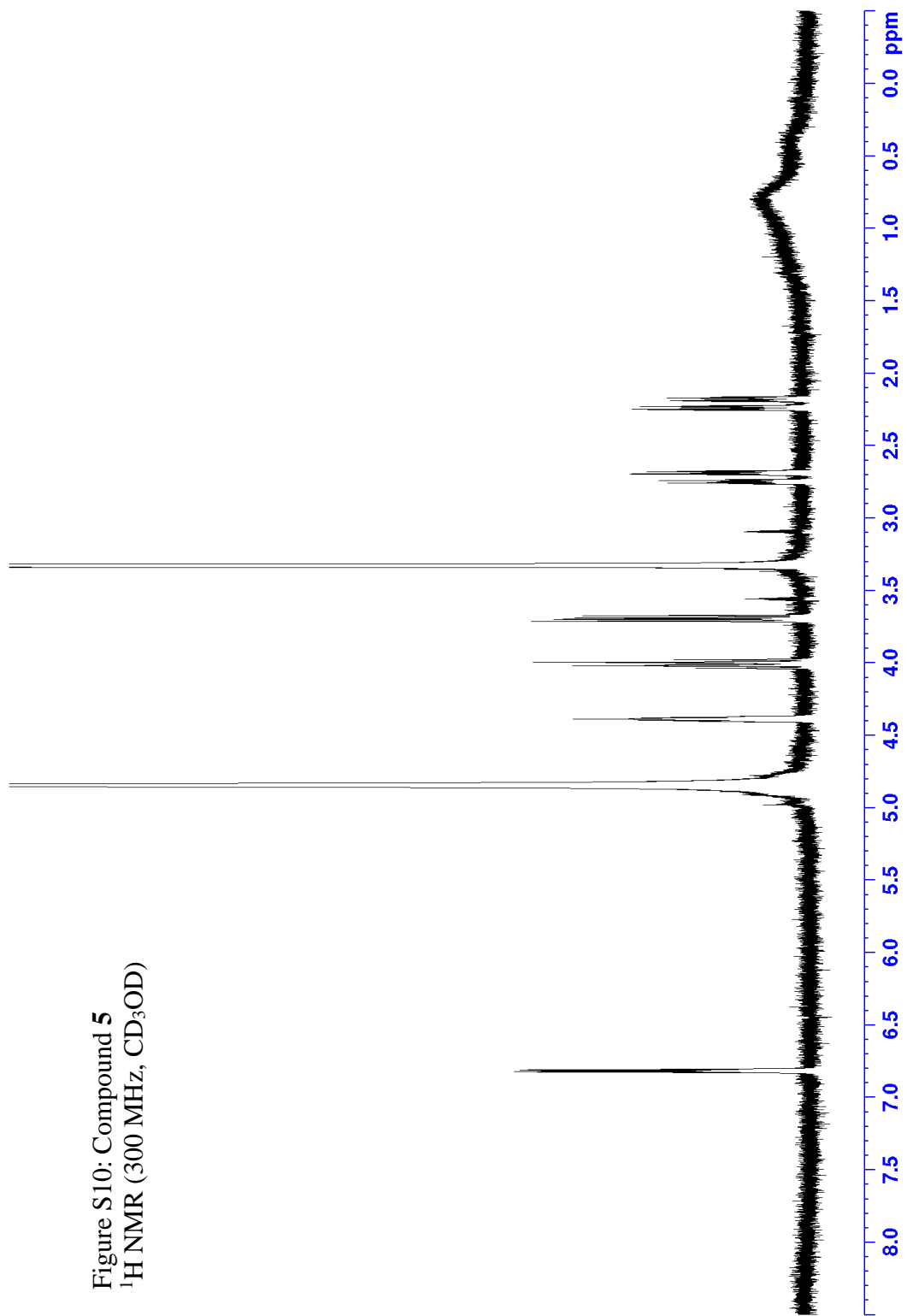


Figure S11: Compound **5**
 ^{13}C NMR (300 MHz, CD_3OD)

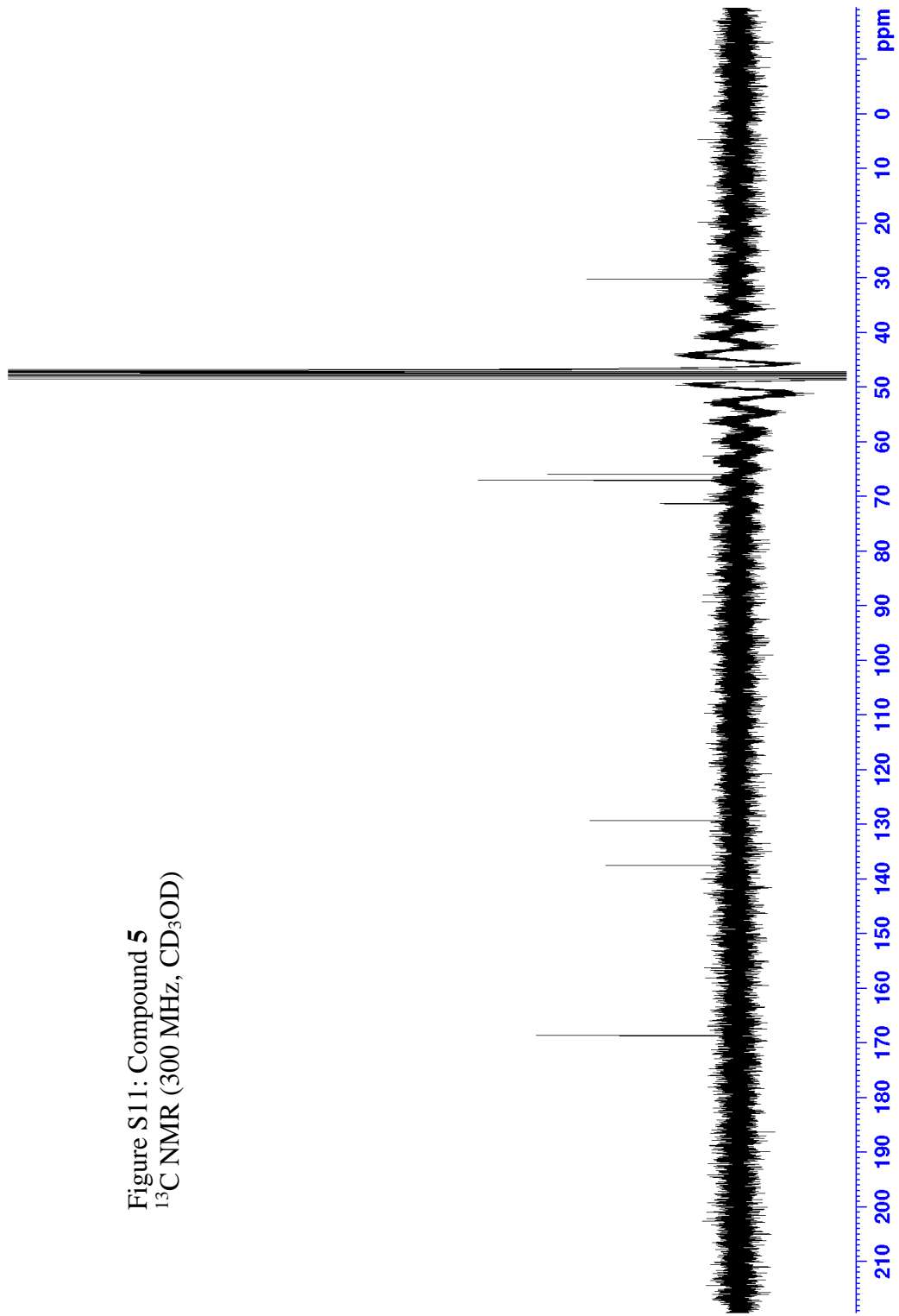
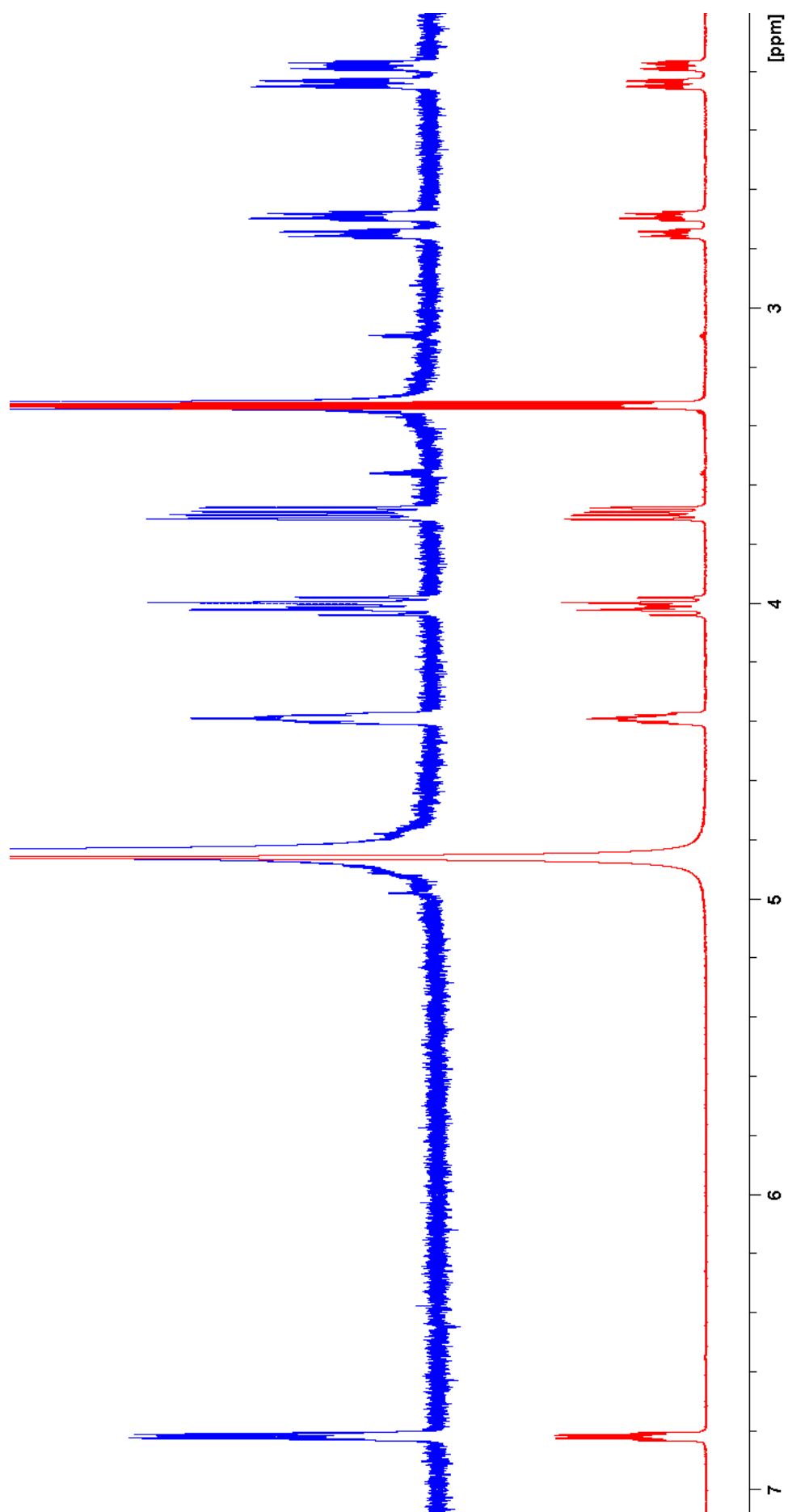


Figure S12: Overlay of ^1H NMR spectra of **compound 5** and shikimate commercial



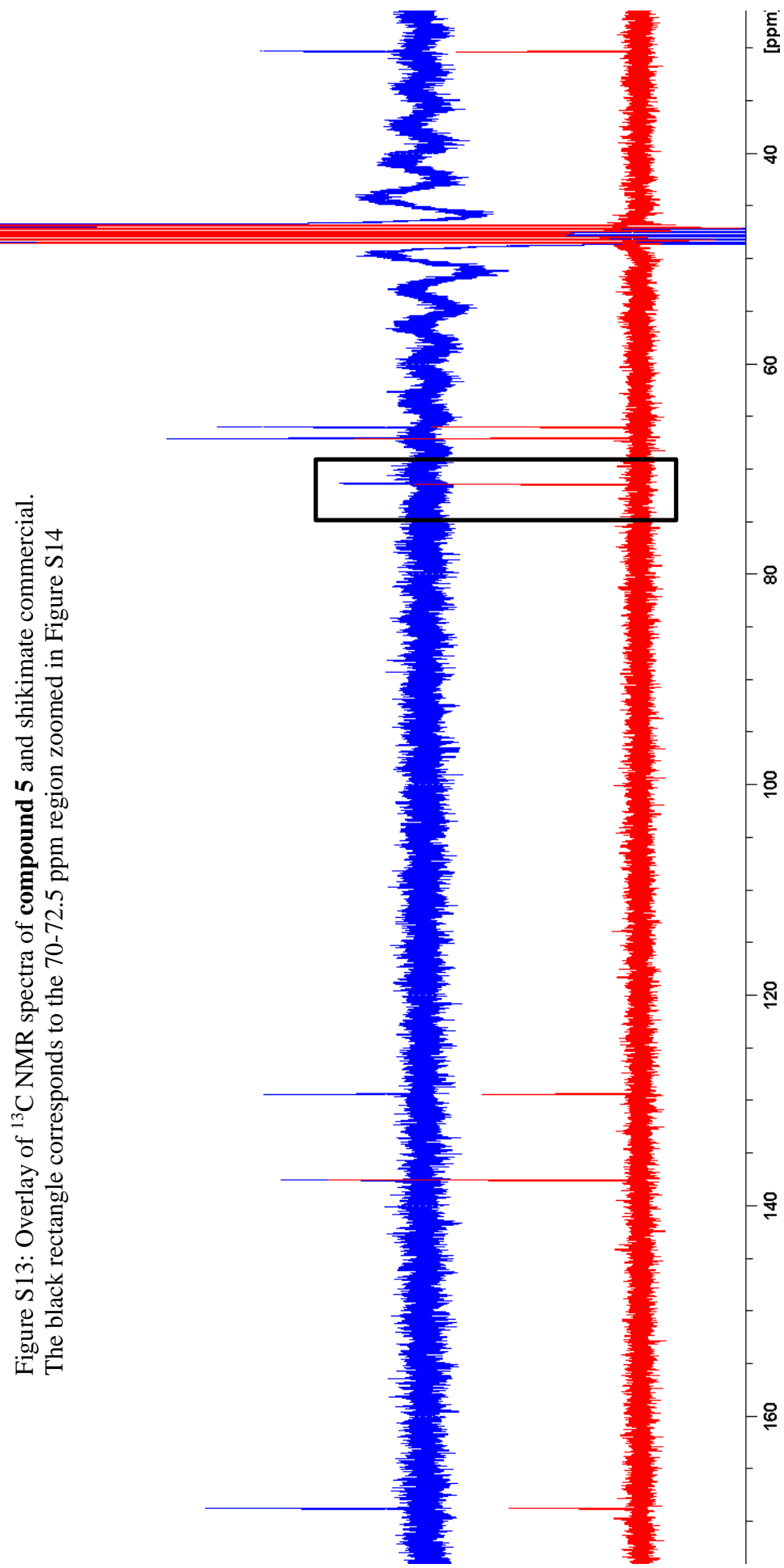


Figure S13: Overlay of ^{13}C NMR spectra of **compound 5** and shikimate commercial. The black rectangle corresponds to the 70-72.5 ppm region zoomed in Figure S14

Figure S14: zoom of figure S13

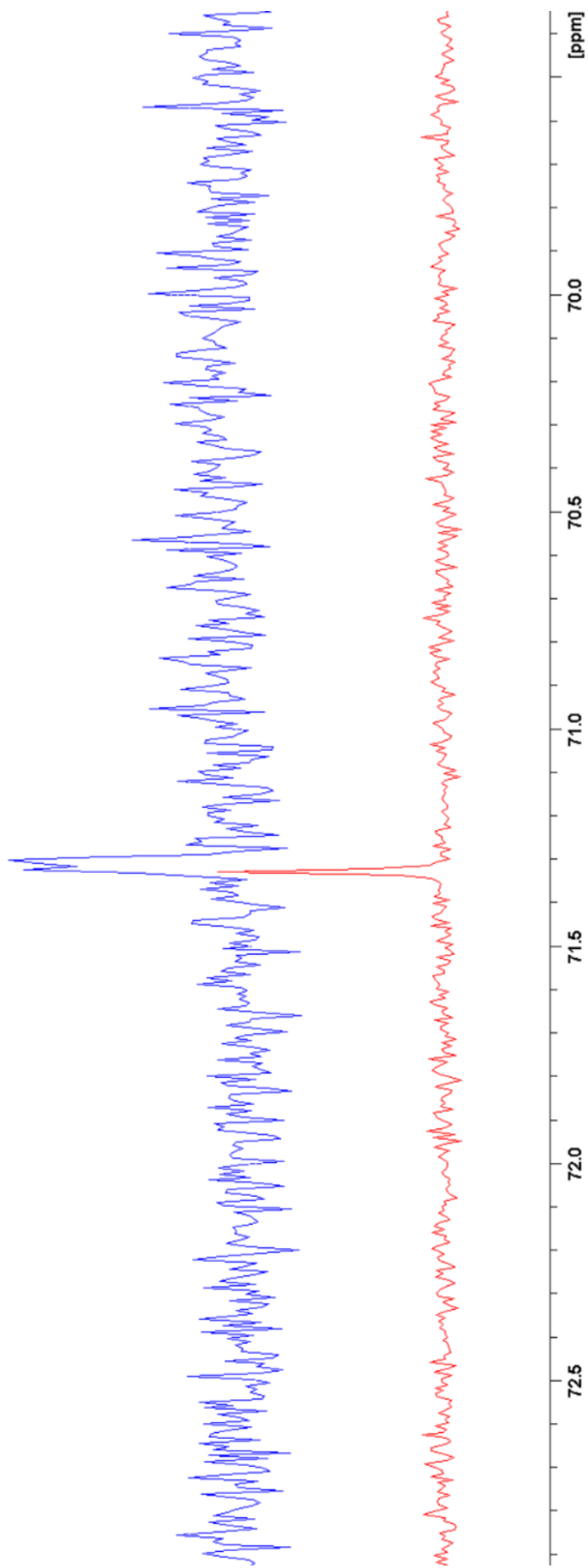


Figure S15: HRMS of compound **5**

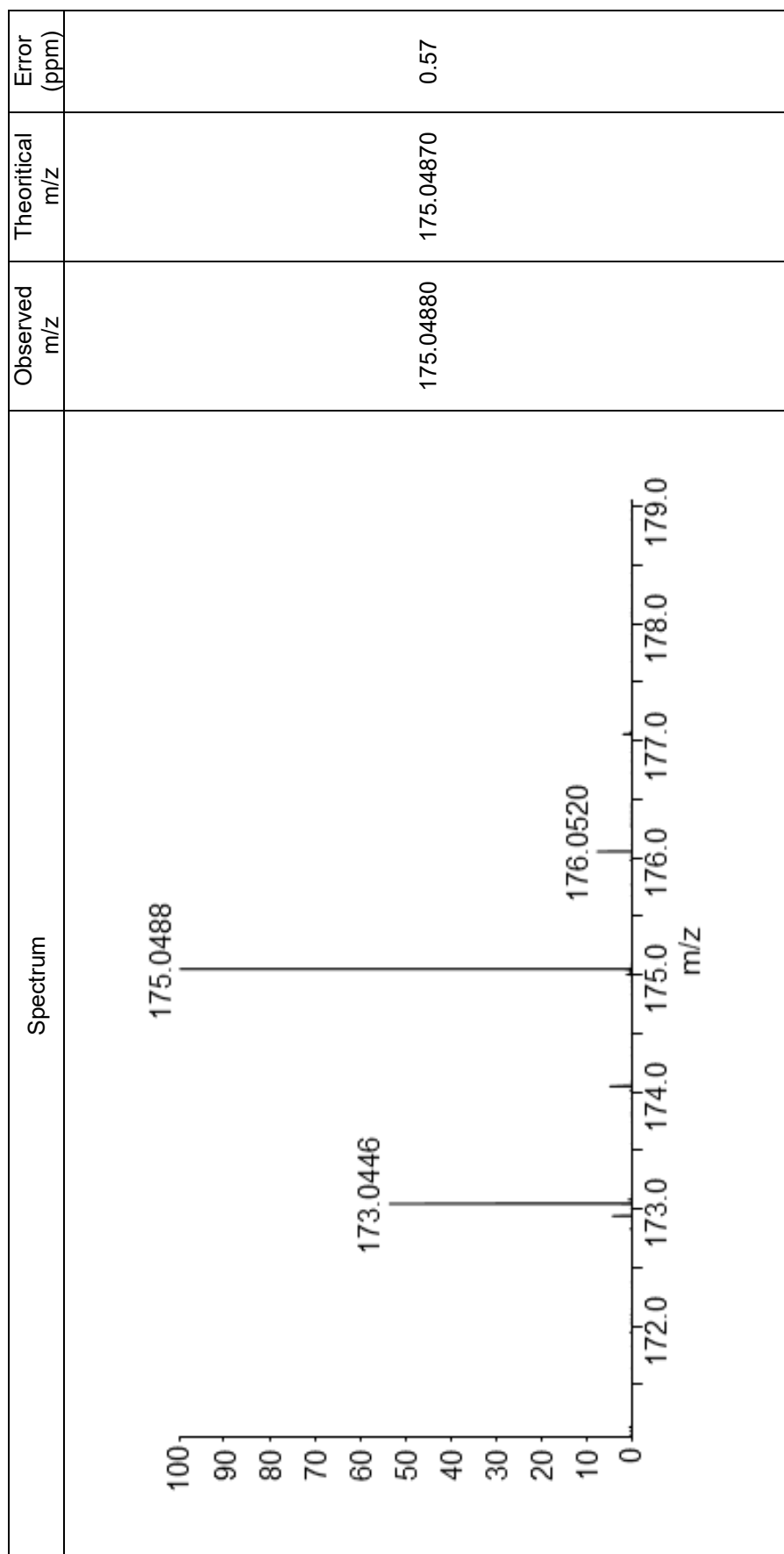


Figure S16: HRMS of commercial Shikimate

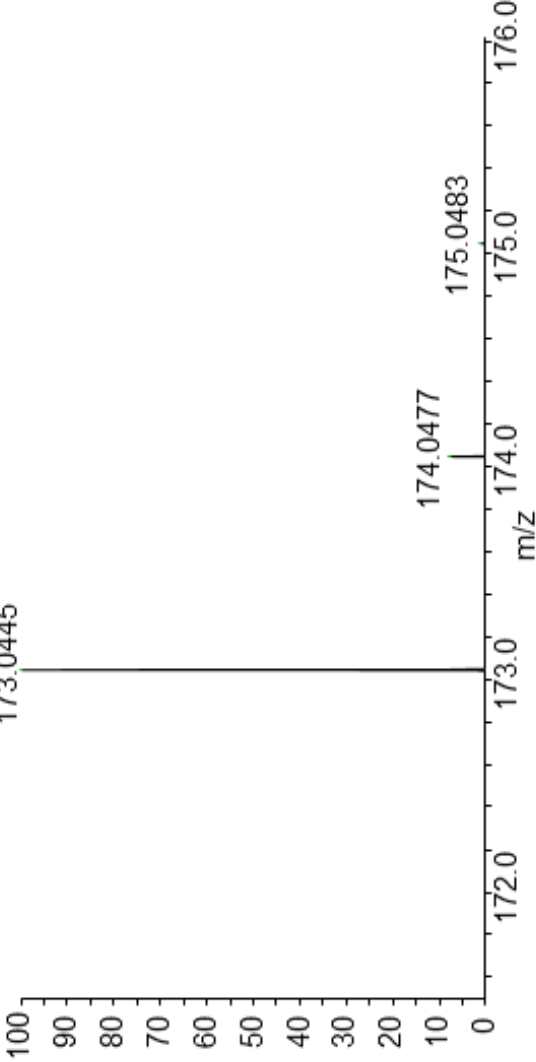
| Spectrum | Observed m/z | Theoretical m/z | Error (ppm) |
|--|--------------|-----------------|-------------|
|  <p>The mass spectrum displays relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (172.0 to 176.0). The base peak is at m/z 173.0445. Other labeled peaks include m/z 174.0477, 175.0483, and 176.0.</p> | 173.04449 | 173.04445 | 0.02 |

Figure S17: MS/MS of compound 5

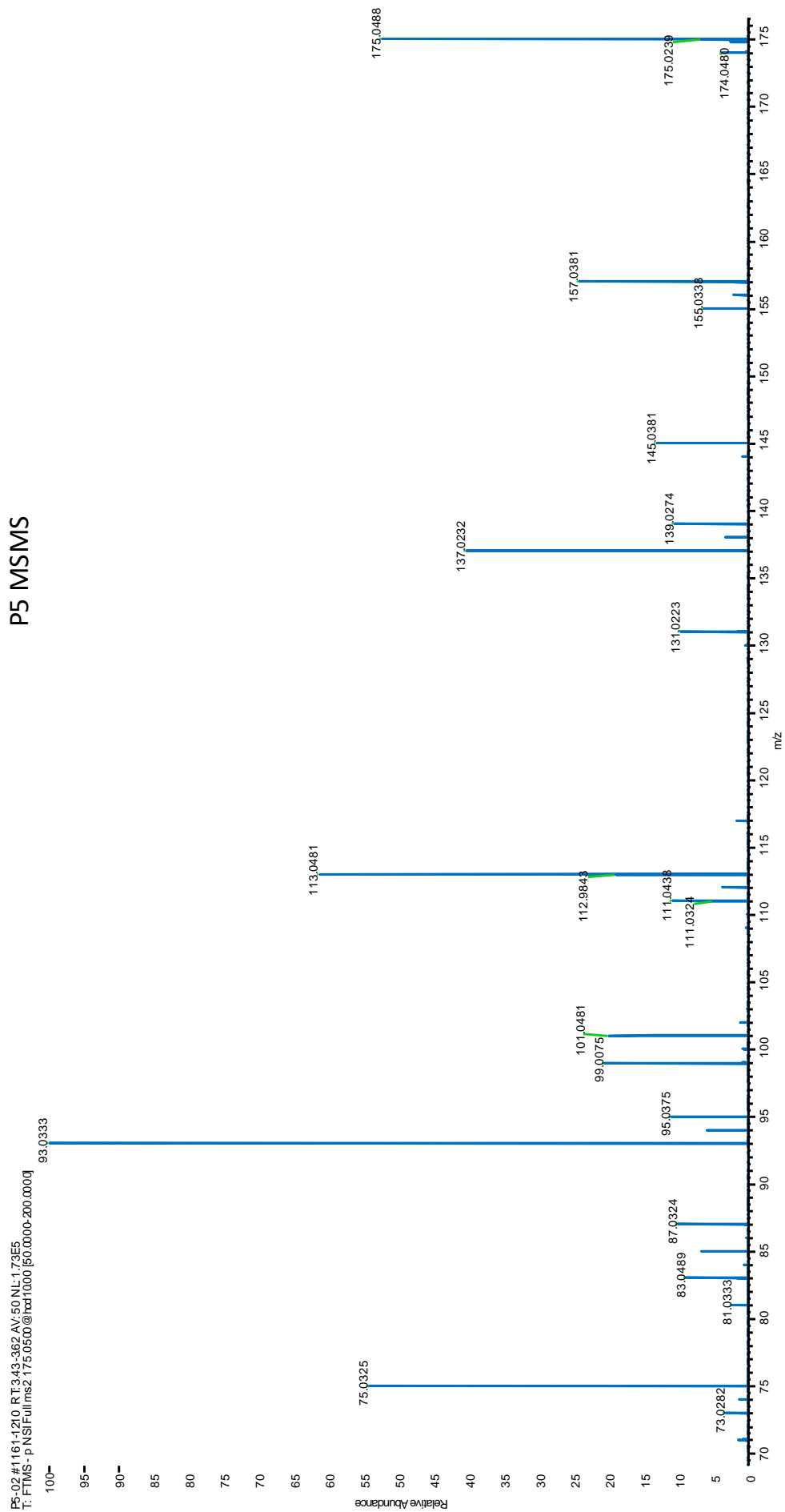
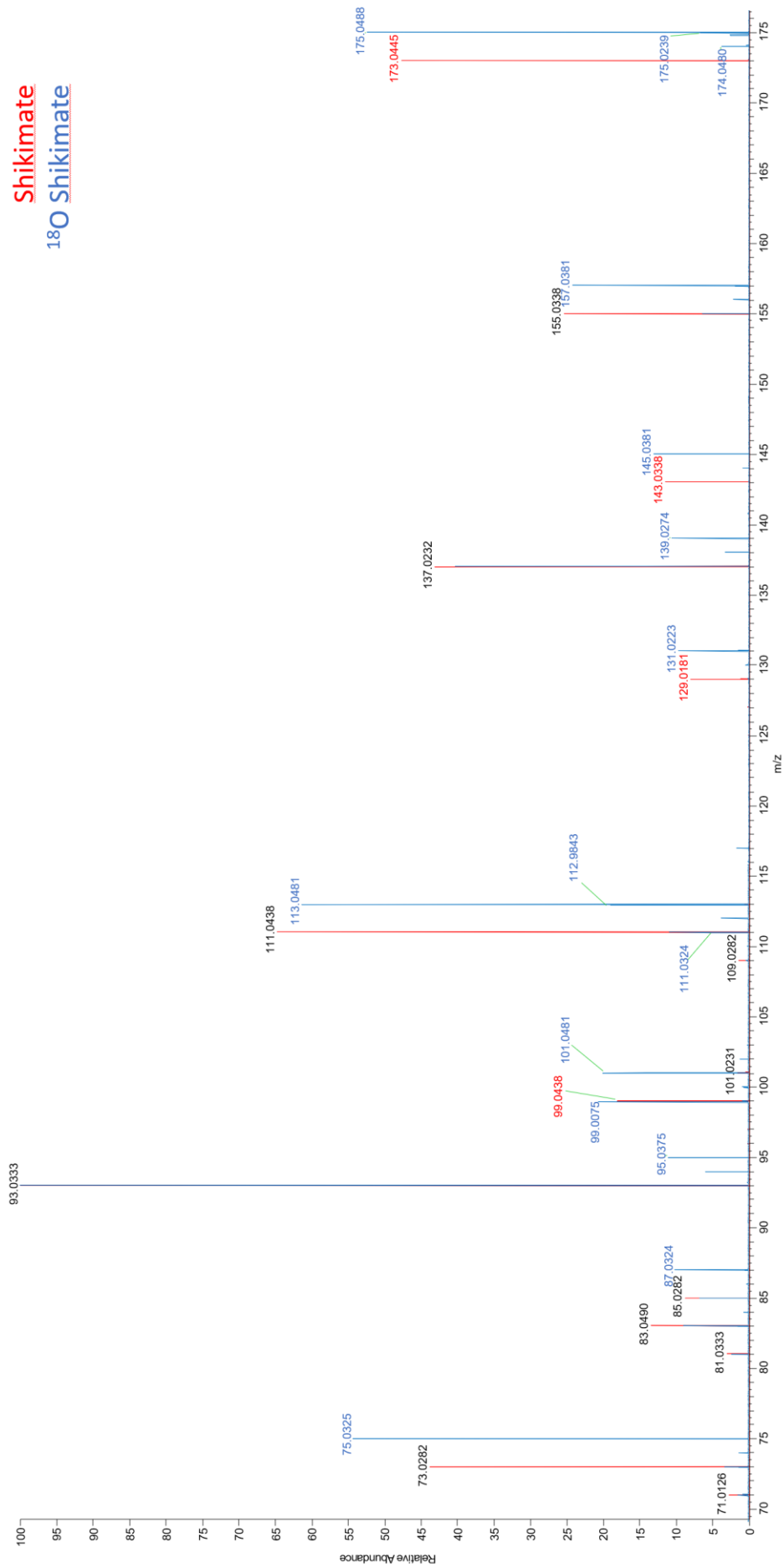


Figure S18: Overlay of commercial Shikimate (red) and C4[¹⁸O]-shikimate **5** (blue) HCD 10 spectra. Masses are labelled in red, blue or black depending if the mass is present in Shikimate, ¹⁸O Shikimate or both spectra respectively.



Discussion générale

Pendant ces travaux de thèse, nous nous sommes principalement intéressés aux trois réactions d'hydroxylation des voies O₂-dépendante et O₂-indépendante de la biosynthèse de l'UQ chez les protéobactéries selon des aspects biochimiques, évolutifs et physiologiques. De plus, nous avons caractérisé la voie O₂-dépendante de la biosynthèse de l'UQ chez une bactérie pathogène, *Francisella novicida*.

La voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ a été largement étudiée chez *E. coli* et elle est assez bien décrite dans la littérature. Cette voie multi-étape nécessite 12 protéines Ubi dont 7 (UbiE, UbiF, UbiG, UbiH, UbiI, UbiJ and UbiK) forment un complexe hydrosoluble d'environ 1 MDa dans lequel la protéine UbiJ joue un rôle essentiel de stabilisation (Hajj Chehade *et al.*, 2019). Certaines protéines Ubi sont des facteurs accessoires (UbiB, UbiJ and UbiK) et d'autres des enzymes (UbiA, UbiC à UbiI and UbiX) qui réalisent les modifications consécutives sur les intermédiaires, la plupart extrêmement hydrophobes (Abby *et al.*, 2020). Parmi ces modifications, nous avons porté un intérêt particulier aux trois réactions d'hydroxylation. En effet, chez *E. coli*, trois hydroxylases UbiI, UbiH et UbiF catalysent ces trois réactions. Ces trois hydroxylases sont des monooxygénases à flavine (Ubi-FMOs) qui utilisent l'O₂ comme donneur de groupement d'alcool pour hydroxyler chacune un carbone spécifique de cycle aromatique suggérant une régiosélectivité spécifique (Figure 28) (Pelosi *et al.*, 2016). UbiF est remplacée par une monooxygénase à centre bi-nucléaire de fer appelée Coq7 chez certaines bactéries telle que *P. aeruginosa* (Stenmark *et al.*, 2001; Pelosi *et al.*, 2016). Il existent deux autres Ubi-FMOs, UbiL et UbiM, qui sont principalement retrouvées dans les génomes des protéobactéries contenant moins de trois hydroxylases impliquées dans la biosynthèse de l'UQ (Ubi-hydroxylases). Par exemple *R. rubrum* possède deux Ubi-hydroxylases (UbiL et Coq7) et *N. meningitidis* en possède une (UbiM). UbiL de *R. rubrum* hydroxyle les deux positions C1 et C5 et sa protéine Coq7 catalyse l'hydroxylation en position C6 tandis que la protéine UbiM de *N. meningitidis* hydroxylent les trois positions (Pelosi *et al.*, 2016). Ces données montrent d'une part que la régiosélectivité d'UbiL_{Rf} et d'UbiM_{Nm} est plus large que celle des Ubi-FMOs d'*E. coli* et d'autre part que les protéobactéries ont développé un vaste répertoire d'hydroxylases pour synthétiser l'UQ.

De ce fait, dans la première partie de ces travaux de thèse, nous nous sommes interrogés sur l'évolution des Ubi-hydroxylases de la voie O₂-dépendante. Nous avons donc étudié leur évolution et tenté de comprendre l'acquisition de leur régiosélectivité. Pour faire cela, nous avons étudié des génomes de 2352 espèces d' α -, β - et γ -protéobactéries grâce à une approche bio-informatique. Cette étude *in silico* nous a permis d'identifier une variété de combinaison

d'Ubi-hydroxylases au sein des génomes étudiés. Nous avons constaté que les génomes avec trois Ubi-hydroxylases possédaient souvent deux combinaisons : UbiI/UbiH/UbiF ou UbiI/UbiH/Coq7, alors que les génomes avec deux Ubi-hydroxylases, possédaient souvent la combinaison UbiL/Coq7. De plus, nous avons identifié un nouveau clade Ubi-FMO que nous avons nommé UbiN et qui était quasi-exclusivement retrouvé en combinaison avec UbiL. A côté de ces combinaisons fréquentes, nous avons également constaté certaines combinaisons mineures. Par exemple dans certains génomes tel que *Liberibacter solanacearum*, la protéine UbiL a été trouvée comme étant l'unique Ubi-hydroxylase ou alors dans certains cas comme chez *X. campestris*, nous avons identifié 4 Ubi-hydroxylases, UbiI, UbiH, Coq7 et UbiM. Globalement, ces analyses *in silico* suggèraient qu'une Ubi-hydroxylase seule dans un génome serait capable d'assurer les trois hydroxylations de la voie, l'hypothèse étant que le 4-HB est le précurseur de l'UQ commun à l'ensemble des bactéries, ce qui implique trois hydroxylations pour obtenir l'UQ. Dans les génomes avec deux Ubi-hydroxylases, au moins une des deux enzymes serait capable d'hydroxyler deux positions et l'autre enzyme seulement une seule et finalement dans les génomes avec trois hydroxylases, chaque enzyme hydroxylerait une seule position. Cependant, il est également envisageable qu'une redondance fonctionnelle existe entre Ubi-hydroxylases ce qui permettrait à plusieurs protéines d'hydroxyler une même position. Afin d'étudier ces différentes hypothèses, nous nous sommes focalisés sur les combinaisons plus fréquentes et l'évolution de régiosélectivité chez 5 Ubi-FMOs (UbiI, UbiH, UbiF, UbiL et UbiN) et Coq7. Grâce aux analyses phylogénétiques et aux quelques données biochimiques déjà disponibles dans la littérature, nous avons formulé des prédictions sur la régiosélectivité de ces Ubi-hydroxylases et ensuite, nos analyses biochimiques d'une centaine de ces Ubi-Hydroxylases dans les mutants d'*E. coli* inactivés pour un, deux ou trois Ubi-FMOs ont permis de vérifier la plupart de ces prédictions (Figure 28). Dans l'ensemble, nos analyses phylogénétique et biochimiques ont permis de proposer le scénario évolutif suivant : L'ancêtre des protéobactéries capable de synthétiser l'UQ avait une enzyme de type UbiL qui hydroxylait les deux positions C1 et C5, et une Coq7 qui hydroxylait la position C6. Ces deux Ubi-hydroxylases ont été transmises verticalement mais ont subi des évolutions différentes dans les α -, β -, γ -protéobactéries. En effet, la protéine UbiL est retrouvée chez toutes les espèces d' α -protéobactérie, et dans l'ancêtre commun des Rhizobiales et des Rhodobacterales, une duplication du gène *ubiL* a conduit à l'apparition de la sous-clade UbiN et au gain de la fonction de Coq7 (hydroxylation de la position C6), ce qui a entraîné la perte de cette dernière au cours du processus évolutif. Chez l'ancêtre des β - et γ -protéobactéries, la protéine de type UbiL a été dupliquée et sous-fonctionnalisée en UbiH (hydroxylation en position C1) et UbiI

(hydroxylation en position C5). Puis, UbiI a été dupliquée dans l'ancêtre d'une sous-lignée de γ -protéobactéries, donnant naissance à UbiF qui a acquis une régiosélectivité C6, entraînant la perte de Coq7. Nos analyses biochimiques ont également montré que la majorité des protéines UbiF et UbiN testées ont non seulement gagné une nouvelle fonction (hydroxylation en position C6), mais ont également conservé une activité résiduelle de leurs ancêtres UbiI et UbiL (hydroxylation en position C5). Ce scénario évolutif des Ubi-hydroxylases propose trois événements de duplication associés à deux cas de néo-fonctionnalisation et un cas de sous-fonctionnalisation. Ceci a conduit à l'émergence de cinq sous-familles d'Ubi-FMOs (UbiI, UbiH, UbiF, UbiL et UbiN) avec des régiosélectivités distinctes et a abouti à deux pertes indépendantes de l'enzyme ancestrale Coq7. D'ailleurs, une explication plausible pour les lignées ayant perdu Coq7 est qu'elles étaient très dépendantes du fer pour leur croissance et/ou pour prospérer dans des environnements limités en fer. Le fer est une ressource limitante pour laquelle les bactéries sont en compétition (Morel and Price, 2003; Moore *et al.*, 2013; Kramer, Özkaya and Kümmerli, 2020), et diverses stratégies pour faire face à la limitation en fer ont été documentées, allant de la recherche active de fer (par exemple, via les sidérophores), à la limitation de la dépendance au fer. La perte de Coq7 pourrait appartenir à cette dernière catégorie. Par ailleurs, Nous avons également testé biochimiquement, la prédiction de la régiosélectivité de la protéine UbiL de *L. solanacearum*, et les UbiI, UbiH, Coq7 et UbiM de *X. campestris*. Ces résultats ont montré qu'UbiL de *L. solanacea* (Figure 28) et UbiM de *X. campestris* sont capable d'hydroxyler les trois positions sur le noyau des intermédiaires de l'UQ. De plus, les protéines UbiI, UbiH et Coq7 de *X. campestris* hydroxylerent respectivement les positions C5, C1 et C6. Ces données non publiées montrent que cette bactérie possède deux systèmes d'Ubi-hydroxylases fonctionnelles. Il est possible que cette présence simultanée de 2 systèmes d'hydroxylation représente un « intermédiaire évolutif » suite à l'acquisition d'UbiM par transfert horizontale et que la bactérie finira par perdre son système à trois hydroxylases. Nous pensons que ce scénario s'est produit dans d'autres espèces et des études sont en cours au laboratoire pour vérifier cette hypothèse. Des analyses plus détaillées sont nécessaires pour étudier l'évolution de la protéine UbiM ainsi que celle des protéines UbiL capables d'hydroxyler les 3 positions. L'ensemble de nos résultats démontrent globalement une homogénéité de régiosélectivité au sein des différents clades d'Ubi-hydroxylases, avec toutefois une variabilité subtile dans certaines espèces. La prochaine étape est donc d'étudier les mécanismes moléculaires qui conduisent à ces régiosélectivités. En effet, la position de l'atome de carbone à hydroxyler sur le substrat est probablement dictée par l'orientation de ce même substrat par rapport à la flavine-hydroperoxyde dans le site actif de l'enzyme (Crozier-

Reabe and Moran, 2012; Huijbers *et al.*, 2014). Nous pensons que des groupes d'acides aminés connus sous le nom de "secteur" (Halabi *et al.*, 2009) impose cette orientation. Ces derniers sont des acides aminés qui co-évoluent ensemble. Une analyse de la coévolution du clade UbiL et UbiN par les bio-informaticiens de notre équipe a permis d'identifier un réseau de résidus dispersés le long de la séquence mais connectés dans l'espace qui pourrait contrôler les variations de régiosélectivité de ces enzymes. L'étape suivante sera de tenter de modifier la régiosélectivité de ces FMOs en réalisant certaines mutations dans les acides aminés qui constituent ces secteurs.

Dans la deuxième partie de ces travaux de thèse, nous avons étudié les réactions d'hydroxylation en anaérobiose. En effet, *E. coli* synthétise l'UQ en absence de la molécule d'oxygène via une voie multi-étape qui partagent la plupart des protéines Ubi de la voie O₂-dépendante sauf les trois Ubi-FMOs (UbiI, H et F) et les deux protéines accessoires, UbiJ and UbiK (Figure 28) (Pelosi *et al.*, 2019). De plus, les trois protéines UbiT, UbiU et UbiV ont été identifiées par l'équipe comme étant essentielles uniquement pour la voie O₂-indépendante (Pelosi *et al.*, 2019). UbiT est une petite protéine de 174 acides aminés et une grande partie de sa séquence correspond à un domaine SCP2 connu pour fixer des lipides. Un domaine SCP2 est également retrouvé en partie N-terminale de la protéine UbiJ de la voie O₂-dépendante (Hajj Chehade *et al.*, 2019; Pelosi *et al.*, 2019). Les deux protéines UbiU et UbiV contiennent chacune un centre de [4Fe-4S] et forment un hétérodimère. Ces deux protéines appartiennent à la famille des peptidase U32 dont la fonction est inconnue (Pelosi *et al.*, 2019). De manière intéressante, en plus d'UbiU et d'UbiV, *E. coli* possède deux autres peptidases U32, RlhA et TrhP qui sont impliquées respectivement dans l'hydroxylation de l'ARNr 23S (Kimura *et al.*, 2017) et de certains ARNt (Lauhon, 2019; Sakai, Kimura and Suzuki, 2019). Ces données suggèrent que l'hétérodimère UbiU-V pourrait être impliqué dans les réactions d'hydroxylation de la voie O₂-indépendante.

Dans cette partie de nos travaux, nous avons étudié la fonction des trois protéines UbiU, UbiV et UbiT, leur régulation ainsi que le rôle physiologique de l'UQ synthétisée en anaérobiose chez *E. coli*. Nous avons montré que cette voie est essentielle pour la respiration sur nitrate en absence de DMK₈ et MK₈. Ces résultats sont en accord avec des précédents résultats obtenus par l'équipe montrant que la voie TUV-dépendante de biosynthèse de l'UQ est importante pour le métabolisme de *P. aeruginosa* utilisant la dénitrification (Vo *et al.*, 2020). D'autre part, nos expériences de compétition dans l'intestin des souris révèlent également une contribution mineure mais significative de la voie O₂-indépendante de l'UQ₈ pour la

colonisation de l'intestin par *E. coli*. Mise à part sa fonction dans la bioénergétique, l'UQ₈ synthétisée en anaérobiose chez *E. coli* pourrait également avoir une fonction antioxydante dans un environnement complexe tel que l'intestin. Ceci pourrait conférer un avantage à la bactérie, surtout dans le cas d'une inflammation de l'intestin au cours de laquelle les cellules intestinales produisent des espèces réactives de l'oxygène (Winter *et al.*, 2013; Chanin *et al.*, 2020; Hughes *et al.*, 2021). Des expériences adaptées sont nécessaires pour confirmer cette proposition. Nous avons également étudié l'expression des trois protéines, UbiT, UbiU et UbiV, chez *E. coli*. De manière générale, les gènes codant pour ces trois protéines sont au même locus chromosomique dans la plupart des bactéries produisant l'UQ (Pelosi *et al.*, 2019). Notre étude a montré que l'opéron *ubiUV* est activé par FNR en conditions microaérobies (0.1% d'O₂) et en conditions anaérobies strictes. En revanche, l'expression du gène *ubiT* est sous le contrôle de deux promoteurs. L'un des deux est régulé par FNR et permet l'expression simultanée d'*ubiT* avec *ubiUV* en conditions microaérobies (0.1% d'O₂) et en conditions anaérobies strictes tandis que le deuxième est constitutif et permet l'expression d'*ubiT* en conditions aérobies. En aérobiose et en surexprimant les protéines UbiU et UbiV, nous avons démontré que l'hétérodimère UbiU-V se substitue aux trois hydroxylases de la voie O₂-dépendante (UbiI, UbiH et UbiF) pour synthétiser de l'UQ, et cette activité est dépendante de la protéine UbiT. De plus, nos expériences avec l'O₂ marqué montrent que les hydroxylations catalysées dans ces conditions n'utilisent pas l'O₂ comme donneur de groupement hydroxyle. Ces résultats suggèrent que les centres [4Fe-4S] essentiels à l'activité d'UbiU et d'UbiV ne sont pas trop sensible à la présence d'O₂ et nous ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle l'hétérodimère UbiU-V ainsi que les deux autres peptidases U32 RlhA et ThrP appartiendraient à une nouvelle famille d'hydroxylases O₂-indépendante (Pelosi *et al.*, 2019). Dans la suite de ces travaux nous nous sommes interrogés sur le donneur de groupement hydroxyle utilisé par cette famille d'hydroxylase. En effet, à ce jour, les hydroxylases des systèmes biologiques sont connues pour utiliser soit de l'O₂ soit de l'H₂O comme donneurs de groupement hydroxyle. L'O₂ peut être activé par divers cofacteurs protéiques tels que les hèmes, les flavines et les centres métalliques non hémiques de fer ou de cuivre (Torres Pazmiño *et al.*, 2010) et l'H₂O est activée par les cofacteurs à molybdoptérine (Hille, 2005; Dermer and Fuchs, 2012). Cependant, l'hétérodimère UbiU-V ne partage aucune caractéristique avec les hydroxylases à molybdoptérine, les seules enzymes connues jusqu'à présent pour être impliquées dans des réactions d'hydroxylation en anaérobiose. De plus, notre équipe a démontré que la biosynthèse TUV-dépendante de l'UQ n'est pas affectée chez les mutants de *P. aeruginosa* incapables de synthétiser les cofacteurs à molybdoptérine (Vo *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent qu'H₂O n'est probablement pas le

cosubstrat de l'hétérodimère UbiU-V. Les précédentes données de l'équipe ont montré que plusieurs mutants *E. coli* avec des délétions englobant les gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (voie du shikimate) étaient déficients pour la biosynthèse de l'UQ₈ uniquement en conditions anaérobies (Pelosi *et al.*, 2019). Ces résultats suggéraient qu'un métabolite de cette voie pourrait être le donneur de groupement hydroxyle des réactions d'hydroxylation impliquées dans la biosynthèse de l'UQ₈. Nous avons donc cherché à vérifier cette hypothèse en étudiant tout d'abord plusieurs mutants délétés pour un ou deux gène (s) de la voie shikimate, puis en utilisant un métabolite marqué de cette voie. Au final, nous avons montré que le préphénate, un métabolite de la voie de shikimate, est le donneur de groupement d'alcool pour les réactions d'hydroxylation O₂-indépendante catalysées par UbiU-V (Figure 28). Ainsi, notre étude révèle la première molécule organique utilisée comme donneur d'hydroxyle dans des réactions biologiques et suggère que les protéines appartenant à la même famille qu'UbiU-V pourraient fonctionner de façon similaire. La suite de ces travaux a fait l'objet d'un nouveau financement collaboratif qui a pour but d'étudier le mécanisme moléculaire d'hydroxylation réalisé par les peptidases U32 dont UbiU-V.

Enfin, même si nos résultats ont révélé un rôle clé de la protéine UbiT pour la biosynthèse de l'UQ₈ lors de la transition de conditions anaérobies vers aérobies, la fonction exacte de cette protéine reste à élucider. Il semblerait qu'en conditions anaérobies, UbiT avec son domaine SCP2 remplacerait son homologue de la voie O₂-dépendante UbiJ. En effet, nous proposons que le domaine SCP2 d'UbiT pourrait lier la chaîne octaprényle des intermédiaires de l'UQ₈ afin que les autres enzymes de la voie, dont UbiU-V, catalysent les différentes modifications sur le noyau aromatique. Cela suggère la présence d'un complexe de la biosynthèse de l'UQ en conditions anaérobies chez *E. coli*. J'ai pu obtenir des résultats préliminaires en accord avec cette hypothèse, mais la caractérisation précise du complexe anaérobie reste à effectuer. Globalement, d'autres questions entourent encore le complexe Ubi aérobie. Sa structure et la stœchiométrie des protéines le constituant ne sont pas encore connues et des études sont actuellement en cours dans l'équipe pour résoudre ces questions. De plus, sachant que le complexe Ubi aérobie d'*E. coli* contient les trois Ubi-FMOs, nos résultats sur les hydroxylases des voies O₂-dépendante et O₂-indépendante soulève la question suivante : Existe-il une organisation supramoléculaire comme celle d'*E. coli*, chez les bactéries avec moins ou plus trois Ubi-hydroxylases O₂-dépendante ou en anaérobiose avec UbiU-V ? Si oui, comment le complexe est réorganisé en fonction de la diversité en Ubi-hydroxylases ? Ces questions seront intéressantes à étudier dans le futur.

Finalement durant ces travaux de thèse, nous nous sommes également intéressés à la voie de la biosynthèse de l'UQ chez *F. tularensis*, une bactérie hautement pathogène qui cause la tularémie chez l'Homme. L'UQ avait déjà été identifié chez cette bactérie (Hollis *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 2010), cependant sa voie de biosynthèse n'était pas caractérisée. Durant cette étude, nous avons utilisé l'espèce *F. novicida* qui est seulement un pathogène opportuniste chez l'Homme, et dont le génome possède 97% d'identité avec celui de *F. tularensis* (Kingry and Petersen, 2014). Nous avons démontré que la seule quinone isoprénoïde de *F. novicida* est l'UQ₈. Nos analyses d'homologie de séquences ont révélé les protéines Ubi impliquées dans la voie O₂-dépendante de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida*. La fonction des protéines identifiées chez *F. novicida* a été biochimiquement validée par complémentation hétérologue dans les mutants d'*E. coli* délétés pour les gènes d'intérêt. L'ensemble de ces analyses ont montré que la voie de biosynthèse de l'UQ chez cette bactérie se distingue de celle bien connue d'*E. coli* par la présence d'une protéine Coq7 au lieu d'UbiF et par l'absence des protéines UbiX et UbiD impliquées dans l'étape de décarboxylation (Figure 28). Nos données bio-informatiques montrent que le système UbiD/UbiX n'est pas strictement conservé chez les protéobactéries suggérant que d'autres enzymes sont impliquées dans cette réaction. De plus, chez *E. coli*, des souches simples mutantes $\Delta ubiX$ et $\Delta ubiD$ sont encore capables de synthétiser l'UQ₈ à un niveau d'environ 15% de la souche WT mais seulement en conditions aérobies (Pelosi *et al.*, 2019). Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche double mutante $\Delta ubiD \Delta ubiX$ (non publié). L'ensemble de ces résultats suggère la présence, chez *E. coli*, d'un système de décarboxylation alternatif au système UbiD/UbiX dépendant des conditions aérobies. Ce système alternatif pourrait-il être le même que celui qui catalyse l'étape de décarboxylation de la voie de biosynthèse de l'UQ₈ chez *F. novicida* ? Malheureusement, cette question reste à ce jour sans réponse mais des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe pointent la protéine ubiquitaire UbiB comme un candidat de choix à cette fonction. D'autre part, l'absence d'homologues des protéines Ubi de la voie O₂-indépendante chez *F. novicida* est en accord avec le caractère aérobie strict de cette bactérie. Enfin, nous avons également montré que l'inactivation génétique ou chimique de la voie de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida* entraînait un défaut de croissance de cette bactérie en milieu respiratoire, et les résultats obtenus lors de l'infection du modèle animal *Galleria mellonella* suggèrent fortement que la voie de biosynthèse de l'UQ chez *F. novicida* contribue à sa pathogénicité.

Les résultats de cette étude ainsi que d'autres études mettent en évidence que les voies O₂-dépendante et O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ contribuent à la pathogénicité de certaines bactéries (Aussel *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2023). En effet, les résultats obtenus par

l'équipe montrent que chez *Salmonella enterica*, les mutants des gènes *ubiE*, *ubiJ* et *ubiB* étaient tous altérés pour la prolifération intracellulaire dans les macrophages (Aussel *et al.*, 2014). D'autre part, l'équipe a montré que les protéines UbiU, UbiV et UbiT étaient importantes pour la respiration sur nitrate chez *P. aeruginosa* (Vo *et al.*, 2020). En considérant, des niveaux élevés de nitrate et de nitrite dans les crachats des patients atteints de la mucoviscidose (Linnane *et al.*, 1998), l'équipe a donc proposé que l'UQ synthétisée par UbiT, UbiU et UbiV pourraient avoir un rôle important dans l'infection pulmonaire des patients par *P. aeruginosa* (Vo *et al.*, 2020). De plus, une étude récente révèle la régulation positive des gènes *ubiT*, *ubiU* et *ubiV* par un petit ARN chez la bactérie *P. aeruginosa* en conditions anaérobies chez des individus atteints de mucoviscidose (Cao *et al.*, 2023). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les voies de biosynthèse de l'UQ chez des bactéries pathogènes pourrait être une nouvelle cible thérapeutique. Il faudrait synthétiser des molécules ciblant les enzymes qui n'ont pas d'homologues dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez les eucaryotes. Par exemple, un des objectifs de l'équipe sera de tester des analogues du préphénate et/ou du shikimate afin d'inhiber les réactions d'hydroxylation catalysées par l'hétérodimère UbiU-V en utilisant comme modèle biologique *P. aeruginosa*.

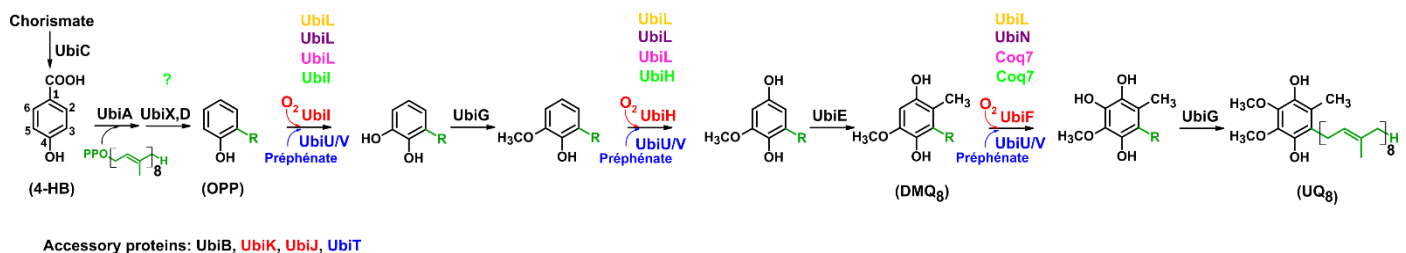


Figure 28. Modèle récapitulatif de la diversité des voies de biosynthèse de UQ chez les protéobactéries. Les enzymes en noir sont communes aux deux voies O₂-dépendante et O₂-indépendante chez *E. coli* et la voie O₂-dépendante chez *F. novicida* à l'exception des protéines UbiD/UbiX qui sont absentes chez *F. novicida*. Les protéines essentielles à la voie O₂-dépendante et le donneur de groupement hydroxyle de cette voie (O₂) et les protéines essentielles à la voie O₂-indépendante ainsi que le donneur de groupement hydroxyle de cette voie (préphénate) sont indiqués respectivement en rouge et en bleu pour *E. coli*. Les hydroxylases de la voie O₂-dépendante chez *F. novicida* (UbiI, UbiH et Coq7) ainsi que le point d'interrogation correspondant au système de décarboxylation inconnu, sont en vert clair. Les protéines accessoires UbiJ et UbiK en rouge sont commune à la voie de biosynthèse de l'UQ chez *E. coli* et *F. novicida*. Les différentes combinaisons de la protéine UbiL avec d'autres hydroxylases de la voie O₂-dépendante sont indiquées chez *Endosymbiont d'Acanthamoeba* sp. UWC8 (UbiL et Coq7, en rose), chez *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 (UbiL et UbiN, en violet) et chez *Liberibacter solanacearum* (UbiL, en orange). La numérotation des atomes de carbone du cycle phényle est indiquée pour le précurseur acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB). La chaîne octaprényle de l'UQ (en vert foncé) est représentée par R sur le carbone 3 des différents intermédiaires biosynthétiques et est composée de huit unités isoprénoides chez *E. coli* et *F. novicida*. OPP, 3-octaprénylphénol ; DMQ8, C6-déméthoxyubiquinone.

Références bibliographiques

- Abby, S.S. *et al.* (2020) 'Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1861(11), p. 148259. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148259>.
- Adachi, A. *et al.* (2003) 'Complementation of *Escherichia coli* *ubiF* mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm', *FEBS Letters*, 543(1–3), pp. 174–178. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00419-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00419-8).
- Adsit, F.G. *et al.* (2022) 'The emergence of the tetrathionate reductase operon in the *Escherichia coli*/*Shigella* pan-genome', *MicrobiologyOpen*, 11(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1333>.
- Agrawal, S. *et al.* (2017) 'A genome-wide screen in *Escherichia coli* reveals that ubiquinone is a key antioxidant for metabolism of long-chain fatty acids', *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), pp. 20086–20099. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806240>.
- Alexander, K. and Young, I. G. (1978) 'Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 17(22), pp. 4750–4755. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00615a024>.
- Alexander, K. and Young, Ian G. (1978) 'Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 17(22), pp. 4745–4750. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00615a023>.
- Allan, C.M. *et al.* (2015) 'Identification of Coq11, a New Coenzyme Q Biosynthetic Protein in the CoQ-Synthome in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), pp. 7517–7534. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633131>.
- Alvarez, A.F., Rodriguez, C. and Georgellis, D. (2013) 'Ubiquinone and Menaquinone Electron Carriers Represent the Yin and Yang in the Redox Regulation of the ArcB Sensor Kinase', *Journal of Bacteriology*, 195(13), pp. 3054–3061. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00406-13>.
- Arends, J. *et al.* (2016) 'In vivo trapping of FtsH substrates by label-free quantitative proteomics', *Proteomics*, 16, pp. 3161–3172.
- Arias-Cartín, R. *et al.* (2022) 'Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase', *Journal of Biological Chemistry*, 298(2), p. 101384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384>.
- Arias-Cartin, R. *et al.* (2023) 'Role of the *Escherichia coli* ubiquinone-synthesizing UbiUVT pathway in adaptation to changing respiratory conditions', *mBio*. Edited by M.W. Ribbe, pp. e03298-22. Available at: <https://doi.org/10.1128/mbio.03298-22>.
- Aussel *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), pp. 70–79. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01065-13>.
- Aussel, L. *et al.* (2014) 'Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(7), pp. 1004–1011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.015>.

- Awad, A.M. *et al.* (2018) ‘Coenzyme Q10 deficiencies: pathways in yeast and humans’, *Essays in Biochemistry*. Edited by C. Garone and M. Minczuk, 62(3), pp. 361–376. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20170106>.
- Awad, A.M. *et al.* (2020) ‘Intragenic suppressor mutations of the COQ8 protein kinase homolog restore coenzyme Q biosynthesis and function in *Saccharomyces cerevisiae*’, *PLOS ONE*. Edited by A.J. Lustig, 15(6), p. e0234192. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234192>.
- Baba, T. *et al.* (2006) ‘Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection’, *Molecular Systems Biology*, 2(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
- Bak, D.W. and Weerapana, E. (2023) ‘Monitoring Fe–S cluster occupancy across the *E. coli* proteome using chemoproteomics’, *Nature Chemical Biology*, 19(3), pp. 356–366. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01227-9>.
- Barkovich, R.J. *et al.* (1997) ‘Characterization of the COQ5 Gene from *Saccharomyces cerevisiae* EVIDENCE FOR A C-METHYLTRANSFERASE IN UBIQUINONE BIOSYNTHESIS’, *Journal of Biological Chemistry*, 272(14), pp. 9182–9188. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9182>.
- Baunach, M. and Hertweck, C. (2015) ‘Natural 1,3-Dipolar Cycloadditions’, *Angewandte Chemie International Edition*, 54(43), pp. 12550–12552. Available at: <https://doi.org/10.1002/anie.201507120>.
- Behan, R.K. and Lippard, S.J. (2010) ‘The Aging-Associated Enzyme CLK-1 Is a Member of the Carboxylate-Bridged Diiron Family of Proteins’, *Biochemistry*, 49(45), pp. 9679–9681. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi101475z>.
- Bentinger, M., Brismar, K. and Dallner, G. (2007) ‘The antioxidant role of coenzyme Q’, *Mitochondrion*, 7, pp. S41–S50. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006>.
- Bersuker, K. *et al.* (2019) ‘The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis’, *Nature*, 575(7784), pp. 688–692. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>.
- Bonnefoy, V. and Demoss, J.A. (1994) ‘Nitrate reductases in *Escherichia coli*’, *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, pp. 47–56. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00871632>.
- Borisov, V.B. *et al.* (2011) ‘The cytochrome bd respiratory oxygen reductases’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(11), pp. 1398–1413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.016>.
- Braasch-Turi, M.M., Koehn, J.T. and Crans, D.C. (2022) ‘Chemistry of Lipoquinones: Properties, Synthesis, and Membrane Location of Ubiquinones, Plastoquinones, and Menaquinones’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), p. 12856. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms232112856>.
- Bräuer, L. *et al.* (2008) ‘A Structural Model of the Membrane-Bound Aromatic Prenyltransferase UbiA from *E. coli*’, *CHEMBIOCHEM*, 9(6), pp. 982–992. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbic.200700575>.

- Bräuer, L., Brandt, W. and Wessjohann, L.A. (2004) ‘Modeling the E. coli 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (ubiA transferase) and characterization of potential active sites’, *Journal of Molecular Modeling*, 10(5–6), pp. 317–327. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00894-004-0197-6>.
- Britta Soballe and Robert K. Poole (1997) ‘Aerobic and anaerobic regulation of the *ubiCA* operon, encoding enzymes for the first two committed steps of ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*’, *FEBS Letters*, 414(2), pp. 373–376. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01041-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01041-7).
- Brondijk, T.H.C. *et al.* (2002) ‘Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation: Roles of NapF, G and H in ubiquinol oxidation in *E. coli*’, *Molecular Microbiology*, 44(1), pp. 245–255. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02875.x>.
- Brown, A.N. *et al.* (2022) ‘The ArcAB Two-Component System: Function in Metabolism, Redox Control, and Infection’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(2), pp. e00110–21. Available at: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00110-21>.
- Burgardt, N.I. *et al.* (2017) ‘A structural appraisal of sterol carrier protein 2’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(5), pp. 565–577. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.002>.
- Cao, P. *et al.* (2023) ‘A *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection’, *Nature*, 618(7964), pp. 358–364. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06111-7>.
- Cecchini, G. *et al.* (2002) ‘Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1–2), pp. 140–157. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00238-9).
- Cecchini, G. *et al.* (2003) ‘Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases’, *FEBS Letters*, 545(1), pp. 31–38. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00390-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00390-9).
- Cevallos, S.A. *et al.* (2019) ‘Increased Epithelial Oxygenation Links Colitis to an Expansion of Tumorigenic Bacteria’, *mBio*. Edited by S. Ehrhart, 10(5), pp. e02244–19. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.02244-19>.
- Chang, L. *et al.* (1999) ‘Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor’, *Molecular Microbiology*, 34(4), pp. 756–766. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01637.x>.
- Chanin, R.B. *et al.* (2020) ‘Epithelial-Derived Reactive Oxygen Species Enable AppBCX-Mediated Aerobic Respiration of *Escherichia coli* during Intestinal Inflammation’, *Cell Host & Microbe*, 28(6), pp. 780–788.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.005>.
- Chen, M. *et al.* (2013) ‘Identification of a Hotdog Fold Thioesterase Involved in the Biosynthesis of Menaquinone in *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 195(12), pp. 2768–2775. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00141-13>.

- Cheng, W. and Li, W. (2014) ‘Structural Insights into Ubiquinone Biosynthesis in Membranes’, *Science*, 343(6173), pp. 878–881. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1246774>.
- Chikina, A. and Matic Vignjevic, D. (2021) ‘At the right time in the right place: How do luminal gradients position the microbiota along the gut?’, *Cells & Development*, 168, p. 203712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203712>.
- Choi, J.-H. *et al.* (2009) ‘Synergistic effects of chromosomal ispB deletion and dxs overexpression on coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens* dps gene’, *Journal of Biotechnology*, 144(1), pp. 64–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.010>.
- Clark, D.P. (1989) ‘The fermentation pathways of *Escherichia coli*’, *FEMS Microbiology Letters*, 63(3), pp. 223–234. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03398.x>.
- Clarke, C.F., Williams, W. and Teruya, J.H. (1991) ‘Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene.’, *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), pp. 16636–16644. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55349-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55349-7).
- Collins, M.D. and Jones, D. (1981) ‘Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication’, *MICROBIOL. REV.*, 45.
- Cox, G. and Gibson, F. (1966) ‘The role of shikimic acid in the biosynthesis of vitamin K2’, *Biochemical Journal*, 100(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj1000001>.
- Cox, G.B. *et al.* (1969) ‘Biosynthesis of Ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: Location of Genes Affecting the Metabolism of 3-Octaprenyl-4-hydroxybenzoic Acid and 2-Octaprenylphenol’, *Journal of Bacteriology*, 99(2), pp. 450–458. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.99.2.450-458.1969>.
- Crack, J., Green, J. and Thomson, A.J. (2004) ‘Mechanism of Oxygen Sensing by the Bacterial Transcription Factor Fumarate-Nitrate Reduction (FNR)’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp. 9278–9286. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M309878200>.
- Crack, J.C. *et al.* (2007) ‘Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), pp. 2092–2097. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0609514104>.
- Crozier-Reabe, K. and Moran, G. (2012) ‘Form Follows Function: Structural and Catalytic Variation in the Class A Flavoprotein Monooxygenases’, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), pp. 15601–15639. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms131215601>.
- Daley, D.O. *et al.* (2005) ‘Global Topology Analysis of the *Escherichia coli* Inner Membrane Proteome’, *Science*, 308(5726), pp. 1321–1323. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1109730>.
- Degli Esposti, M. (2017) ‘A Journey across Genomes Uncovers the Origin of Ubiquinone in Cyanobacteria’, *Genome Biology and Evolution*, 9(11), pp. 3039–3053. Available at: <https://doi.org/10.1093/gbe/evx225>.

- Dermer, J. and Fuchs, G. (2012) ‘Molybdoenzyme That Catalyzes the Anaerobic Hydroxylation of a Tertiary Carbon Atom in the Side Chain of Cholesterol’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(44), pp. 36905–36916. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407304>.
- Deshwal, S. *et al.* (2023) ‘Mitochondria regulate intracellular coenzyme Q transport and ferroptotic resistance via STARD7’, *Nature Cell Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01071-y>.
- Döring, F. *et al.* (2007) ‘Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study’, *IUBMB Life*, 59(10), pp. 628–633. Available at: <https://doi.org/10.1080/15216540701545991>.
- Elling, F.J. *et al.* (2016) ‘Respiratory quinones in *A. rchaea*: phylogenetic distribution and application as biomarkers in the marine environment: Archaeal quinones in cultures and environment’, *Environmental Microbiology*, 18(2), pp. 692–707. Available at: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13086>.
- Eppink, M.H.M., Berkel, W.J.H.V. and Schreuder, H.A. (1997) ‘Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding’, *Protein Science*, 6(11), pp. 2454–2458. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.5560061119>.
- Esposito, R. *et al.* (2011) ‘Glucose Sensing by Time-Resolved Fluorescence of Sol-Gel Immobilized Glucose Oxidase’, *Sensors*, 11(4), pp. 3483–3497. Available at: <https://doi.org/10.3390/s110403483>.
- Esquilin-Lebron, K. *et al.* (2021) ‘Bacterial Approaches for Assembling Iron-Sulfur Proteins’, *mBio*. Edited by J. Yount, 12(6), pp. e02425-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.02425-21>.
- Ezraty, B. *et al.* (2013) ‘Fe-S Cluster Biosynthesis Controls Uptake of Aminoglycosides in a ROS-Less Death Pathway’, *Science*, 340(6140), pp. 1583–1587. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1238328>.
- Federowicz, S. *et al.* (2014) ‘Determining the Control Circuitry of Redox Metabolism at the Genome-Scale’, *PLoS Genetics*. Edited by W.F. Burkholder, 10(4), p. e1004264. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004264>.
- Fernández-del-Río, L. and Clarke, C.F. (2021) ‘Coenzyme Q Biosynthesis: An Update on the Origins of the Benzenoid Ring and Discovery of New Ring Precursors’, *Metabolites*, 11(6), p. 385. Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo11060385>.
- Floyd, K.A. *et al.* (2016) ‘The UbiI (VisC) Aerobic Ubiquinone Synthase Is Required for Expression of Type 1 Pili, Biofilm Formation, and Pathogenesis in Uropathogenic *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*. Edited by G.A. O’Toole, 198(19), pp. 2662–2672. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00030-16>.
- Fontecave, M. *et al.* (2008) ‘From Iron and Cysteine to Iron-Sulfur Clusters: the Biogenesis Protein Machineries’, *EcoSal Plus*. Edited by T.P. Begley, 3(1), p. ecosalplus.3.6.3.14. Available at: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.14>.

- Förster, A.H. and Gescher, J. (2014) 'Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>.
- Franza, T. and Gaudu, P. (2022) 'Quinones: more than electron shuttles', *Research in Microbiology*, 173(6–7), p. 103953. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103953>.
- Fujisaki, S., Nishino, T. and Katsuki, H. (1986) 'Isoprenoid Synthesis in Escherichia coli. Separation and Partial Purification of Four Enzymes Involved in the Synthesis¹', *The Journal of Biochemistry*, 99(5), pp. 1327–1337. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135600>.
- Galassi, V.V. and Arantes, G.M. (2015) 'Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(12), pp. 1560–1573. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.08.001>.
- Gallagher, D.T. *et al.* (2001) 'The crystal structure of chorismate lyase shows a new fold and a tightly retained product', *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 44(3), pp. 304–311. Available at: <https://doi.org/10.1002/prot.1095>.
- Gibert, I., Llagostera, M. and Barbé, J. (1988) 'Regulation of ubiG gene expression in Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 170(3), pp. 1346–1349. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1346-1349.1988>.
- Gin, P. and Clarke, C.F. (2005) 'Genetic Evidence for a Multi-subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase', *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), pp. 2676–2681. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M411527200>.
- Gómez-Díaz, C. *et al.* (1997) 'Antioxidant Ascorbate Is Stabilized by NADH-Coenzyme Q10 Reductase in the Plasma Membrane', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29, pp. 251–257.
- Green, J. *et al.* (1993) 'Properties of FNR proteins substituted at each of the five cysteine residues', *Molecular Microbiology*, 8(1), pp. 61–68. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01203.x>.
- 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', *Biochemical Journal*, 475(11), pp. 1885–1907. Available at: <https://doi.org/10.1042/BCJ20180257>.
- Gulmezian, M. *et al.* (2007) 'The role of UbiX in Escherichia coli coenzyme Q biosynthesis', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467(2), pp. 144–153. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.08.009>.
- Gunsalus, R.P. and Park, S.-J. (1994) 'Aerobic-anaerobic gene regulation in Escherichia coli: control by the ArcAB and Fnr regulons', *Research in Microbiology*, 145, pp. 437–450. Available at: [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90092-2).

- Gupta, S. *et al.* (2000) ‘Acetaldehyde dehydrogenase activity of the AdhE protein of *Escherichia coli* is inhibited by intermediates in ubiquinone synthesis’, *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), pp. 51–55. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08872.x>.
- Haberman, Y. *et al.* (2014) ‘Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature’, *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), pp. 3617–3633. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI75436>.
- Hachimi, Z.E., Samuel, O. and Azerad, R. (1974) ‘Biochemical study on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*: I. Specificity of para hydroxybenzoate polyprenyltransferase’, *Biochimie*, 56(9), pp. 1239–1247. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(74\)80017-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(74)80017-9).
- Hajj Chehade, M. *et al.* (2013) ‘*ubiL*, a New Gene in *Escherichia coli* Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-hydroxylation’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(27), pp. 20085–20092. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480368>.
- Hajj Chehade, M. *et al.* (2019) ‘A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid Ubiquinone’, *Cell Chemical Biology*, 26(4), pp. 482-492.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.001>.
- Hajra, D. *et al.* (2022) ‘Salmonella Typhimurium U32 peptidase, YdcP, promotes bacterial survival by conferring protection against in vitro and in vivo oxidative stress’, *Microbial Pathogenesis*, 173, p. 105862. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105862>.
- Halabi, N. *et al.* (2009) ‘Protein Sectors: Evolutionary Units of Three-Dimensional Structure’, *Cell*, 138(4), pp. 774–786. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.038>.
- Hargreaves, I., Heaton, R.A. and Mantle, D. (2020) ‘Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), p. 6695. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21186695>.
- Hatahet, F., Boyd, D. and Beckwith, J. (2014) ‘Disulfide bond formation in prokaryotes: History, diversity and design’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(8), pp. 1402–1414. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.014>.
- Hauß, T. *et al.* (2005) ‘Localization of coenzyme Q10 in the center of a deuterated lipid membrane by neutron diffraction’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1710(1), pp. 57–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.08.007>.
- He, C.H. *et al.* (2014) ‘Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), pp. 630–644. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.017>.
- Herrmann, K.M. and Weaver, L.M. (1999) ‘THE SHIKIMATE PATHWAY’, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), pp. 473–503. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- Hille, R. (2005) ‘Molybdenum-containing hydroxylases’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), pp. 107–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.012>.

- Hiraishi, A. (1999) 'Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(5), pp. 449–460. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87658-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87658-6).
- Holden, M.J. *et al.* (2002) 'Chorismate lyase: kinetics and engineering for stability', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(1), pp. 160–167. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00302-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00302-8).
- Holland, H.D. (2006) 'The oxygenation of the atmosphere and oceans', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), pp. 903–915. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1838>.
- Hollis, D.G. *et al.* (1989) 'Francisella philomiragia comb. nov. (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), pp. 1601–1608. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.27.7.1601-1608.1989>.
- Hosfield, D.J. *et al.* (2004) 'Structural Basis for Bisphosphonate-mediated Inhibition of Isoprenoid Biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp. 8526–8529. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C300511200>.
- Hoyo, J., Gaus, E. and Torrent-Burgués, J. (2017) 'Tuning ubiquinone position in biomimetic monolayer membranes', *The European Physical Journal E*, 40(6), p. 62. Available at: <https://doi.org/10.1140/epje/i2017-11552-2>.
- Hsieh, E.J. *et al.* (2007) 'Saccharomyces cerevisiae Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463(1), pp. 19–26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.016>.
- Hsu, A.Y. *et al.* (1996) 'Complementation of *coq3* Mutant Yeast by Mitochondrial Targeting of the *Escherichia coli* UbiG Polypeptide: Evidence That UbiG Catalyzes Both O-Methylation Steps in Ubiquinone Biosynthesis', *Biochemistry*, 35(30), pp. 9797–9806. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi9602932>.
- Huang, H. *et al.* (2014) 'Structure of a Membrane-Embedded Prenyltransferase Homologous to UBIAD1', *PLoS Biology*. Edited by R. Dutzler, 12(7), p. e1001911. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001911>.
- Huber, B. *et al.* (2010) 'Description of Francisella hispaniensis sp. nov., isolated from human blood, reclassification of Francisella novicida (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as Francisella tularensis subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus Francisella', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(8), pp. 1887–1896. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015941-0>.
- Hughes, E.R. *et al.* (2017) 'Microbial Respiration and Formate Oxidation as Metabolic Signatures of Inflammation-Associated Dysbiosis', *Cell Host & Microbe*, 21(2), pp. 208–219. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.005>.
- Hughes, E.R. *et al.* (2021) 'Reshaping of bacterial molecular hydrogen metabolism contributes to the outgrowth of commensal E. coli during gut inflammation', *eLife*, 10, p. e58609. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.58609>.

Huijbers, M.M.E. *et al.* (2014) ‘Flavin dependent monooxygenases’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, pp. 2–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005>.

Ireland, P.M. *et al.* (2019) ‘Global Analysis of Genes Essential for *Francisella tularensis* Schu S4 Growth *In Vitro* and for Fitness during Competitive Infection of Fischer 344 Rats’, *Journal of Bacteriology*. Edited by V.J. DiRita, 201(7), pp. e00630-18, /jb/201/7/JB.00630-18.atom. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00630-18>.

Jacewicz, A. *et al.* (2013) ‘Structural Insights into the UbiD Protein Family from the Crystal Structure of PA0254 from *Pseudomonas aeruginosa*’, *PLoS ONE*. Edited by P. Kursula, 8(5), p. e63161. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063161>.

Jasilionis, A. *et al.* (2012) ‘Gene expression and activity analysis of the first thermophilic U32 peptidase’, *Open Life Sciences*, 7(4), pp. 587–595. Available at: <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0047-y>.

Jiang, H.-X. *et al.* (2019) ‘Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide Shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18’, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(7), pp. 1025–1038. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02179-1>.

Johnson, D.C. *et al.* (2005) ‘STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS’, *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), pp. 247–281. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518>.

Jones, S.A. *et al.* (2007) ‘Respiration of *Escherichia coli* in the Mouse Intestine’, *Infection and Immunity*, 75(10), pp. 4891–4899. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00484-07>.

Jones, S.A. *et al.* (2011) ‘Anaerobic Respiration of *Escherichia coli* in the Mouse Intestine’, *Infection and Immunity*. Edited by F.C. Fang, 79(10), pp. 4218–4226. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.05395-11>.

Joyce, A.R. *et al.* (2006) ‘Experimental and Computational Assessment of Conditionally Essential Genes in *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 188(23), pp. 8259–8271. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00740-06>.

K Asai *et al.* (1994) ‘The identification of *Escherichia coli* ispB (cel) gene encoding the octaprenyl diphosphate synthase’, *Biochem Biophys Res Commun*, 202(1), pp. 340–345.

Kagan R.M. and Clarke S. (1994) ‘Widespread Occurrence of Three Sequence Motifs in Diverse S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases Suggests a Common Structure for These Enzymes’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2), pp. 417–427. Available at: <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1187>.

Kaila, V.R.I. and Wikström, M. (2021) ‘Architecture of bacterial respiratory chains’, *Nature Reviews Microbiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4>.

Kainou, T. *et al.* (2001) ‘Dimer Formation of Octaprenyl-diphosphate Synthase (IspB) Is Essential for Chain Length Determination of Ubiquinone’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 7876–7883. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M007472200>.

- Kang, Y. *et al.* (2005) 'Genome-Wide Expression Analysis Indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 Regulates a Large Number of Genes of Unknown Function', *Journal of Bacteriology*, 187(3), pp. 1135–1160. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1135-1160.2005>.
- Kato, T., Takahashi, N. and Kuramitsu, H.K. (1992) 'Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis* prtC gene, which expresses a novel collagenase activity', *Journal of Bacteriology*, 174(12), pp. 3889–3895. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.174.12.3889-3895.1992>.
- Kaurola, P. *et al.* (2016) 'Distribution and dynamics of quinones in the lipid bilayer mimicking the inner membrane of mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(9), pp. 2116–2122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.016>.
- Kavermann, H. *et al.* (2003) 'Identification and Characterization of *Helicobacter pylori* Genes Essential for Gastric Colonization', *Journal of Experimental Medicine*, 197(7), pp. 813–822. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20021531>.
- Kawamukai, M. (2016) 'Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), pp. 23–33. Available at: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1065172>.
- Kawamukai, M. (2018) 'Biosynthesis and applications of prenylquinones', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(6), pp. 963–977. Available at: <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1433020>.
- Kengo Suzuki *et al.* (1994) 'Evidence That *Escherichia coli* ubiA Product Is a Functional Homolog of Yeast COQ2, and the Regulation of ubiA Gene Expression', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), pp. 1814–1819. Available at: <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1814>.
- Khoroshilova, N. *et al.* (1997) 'Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), pp. 6087–6092. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6087>.
- Kimura, S. *et al.* (2017) 'Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation', *Nucleic Acids Research*, 45(22), pp. 12974–12986. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx969>.
- Kingry, L.C. and Petersen, J.M. (2014) 'Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00035>.
- Kopec, J., Schnell, R. and Schneider, G. (2011) 'Structure of PA4019, a putative aromatic acid decarboxylase from *Pseudomonas aeruginosa*', *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(10), pp. 1184–1188. Available at: <https://doi.org/10.1107/S174430911102923X>.
- Kotlowski, R. *et al.* (2007) 'High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease', *Gut*, 56(5), pp. 669–675. Available at: <https://doi.org/10.1136/gut.2006.099796>.

- Kramer, J., Özkaya, Ö. and Kümmerli, R. (2020) ‘Bacterial siderophores in community and host interactions’, *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), pp. 152–163. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.
- Krogfelt, K.A., Cohen, P.S. and Conway, T. (2004) ‘The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine’, *EcoSal Plus*, 1(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.3.1.2>.
- Kwon, O., Druce-Hoffman, M. and Meganathan, R. (2005) ‘Regulation of the Ubiquinone (Coenzyme Q) Biosynthetic Genes *ubiCA* in *Escherichia coli*’, *Current Microbiology*, 50(4), pp. 180–189. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4417-1>.
- Kwon, O., Kotsakis, A. and Meganathan, R. (2000) ‘Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the *ubiF* gene’, *FEMS Microbiology Letters*, 186(2), pp. 157–161. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09097.x>.
- Laredj, L.N., Licitra, F. and Puccio, H.M. (2014) ‘The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease’, *Biochimie*, 100, pp. 78–87. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.006>.
- Latimer, S. *et al.* (2021) ‘A dedicated flavin-dependent monooxygenase catalyzes the hydroxylation of demethoxyubiquinone into ubiquinone (coenzyme Q) in *Arabidopsis*’, *Journal of Biological Chemistry*, 297(5), p. 101283. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101283>.
- Lauhon, C.T. (2019) ‘Identification and Characterization of Genes Required for 5-Hydroxyuridine Synthesis in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* tRNA’, *Journal of Bacteriology*. Edited by T.M. Henkin, 201(20), pp. e00433-19, /jb/201/20/JB.00433-19.atom. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00433-19>.
- Launay, R. *et al.* (2022) ‘Towards Molecular Understanding of the Functional Role of UbiJ-UbiK2 Complex in Ubiquinone Biosynthesis by Multiscale Molecular Modelling Studies’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), p. 10323. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms231810323>.
- Laventie, B.-J. *et al.* (2019) ‘A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*’, *Cell Host & Microbe*, 25(1), pp. 140-152.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.008>.
- Lazazzera, B.A. *et al.* (1996) ‘DNA Binding and Dimerization of the Fe–S-containing FNR Protein from *Escherichia coli* Are Regulated by Oxygen’, *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), pp. 2762–2768. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2762>.
- 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’, *Journal of Bacteriology*, 179(5), pp. 1748–1754. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.179.5.1748-1754.1997>.
- Leonard, C.J., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1998) ‘Novel Families of Putative Protein Kinases in Bacteria and Archaea: Evolution of the “Eukaryotic” Protein Kinase Superfamily’, *Genome Research*, 8(10), pp. 1038–1047. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.8.10.1038>.

- Leppik, R.A., Young, I.G. and Gibson, F. (1976) ‘Membrane-associated reactions in ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 436(4), pp. 800–810. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90407-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90407-7).
- Lin, F. *et al.* (2015) ‘Isofunctional Enzymes PAD1 and UbiX Catalyze Formation of a Novel Cofactor Required by Ferulic Acid Decarboxylase and 4-Hydroxy-3-polyprenylbenzoic Acid Decarboxylase’, *ACS Chemical Biology*, 10(4), pp. 1137–1144. Available at: <https://doi.org/10.1021/cb5008103>.
- Linnane, S.J. *et al.* (1998) ‘Total Sputum Nitrate plus Nitrite Is Raised during Acute Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(1), pp. 207–212. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9707096>.
- Lohman, D.C. *et al.* (2014) ‘Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1413128111>.
- 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’, *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), pp. 11937–11950. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789164>.
- Lupp, C. *et al.* (2007) ‘Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae’, *Cell Host & Microbe*, 2(2), pp. 119–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>.
- M., N.M.U. *et al.* (2007) ‘Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3’, *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), pp. 18254–18264. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200>.
- Macinga, D.R. *et al.* (1998) ‘Identification and Characterization of aarF, a Locus Required for Production of Ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for Expression of 2J-N-Acetyltransferase in *P. stuartii*’, *J. BACTERIOL.*, 180.
- Magalon, A. and Alberge, F. (2016) ‘Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(3), pp. 198–213. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.015>.
- Manichanh, C. (2006) ‘Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach’, *Gut*, 55(2), pp. 205–211. Available at: <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>.
- Marbois, B. *et al.* (2005) ‘Coq3 and Coq4 Define a Polypeptide Complex in Yeast Mitochondria for the Biosynthesis of Coenzyme Q’, *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), pp. 20231–20238. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501315200>.
- Marbois, B. *et al.* (2010) ‘para-Aminobenzoic Acid Is a Precursor in Coenzyme Q6 Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), pp. 27827–27838. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151894>.

- Marshall, S.A. *et al.* (2017) ‘Oxidative Maturation and Structural Characterization of Prenylated FMN Binding by UbiD, a Decarboxylase Involved in Bacterial Ubiquinone Biosynthesis’, *Journal of Biological Chemistry*, 292(11), pp. 4623–4637. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762732>.
- Marshall, S.A. *et al.* (2019) ‘The UbiX flavin prenyltransferase reaction mechanism resembles class I terpene cyclase chemistry’, *Nature Communications*, 10(1), p. 2357. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10220-1>.
- Martijn, J. *et al.* (2018) ‘Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria’, *Nature*, 557(7703), pp. 101–105. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0059-5>.
- Martínez, I. *et al.* (2019) ‘Coenzyme Q production by metabolic engineered *Escherichia coli* strains in defined medium’, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(7), pp. 1143–1149. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02111-y>.
- Mascotti, M.L. *et al.* (2016) ‘Chopping and Changing: the Evolution of the Flavin-dependent Monooxygenases’, *Journal of Molecular Biology*, 428(15), pp. 3131–3146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>.
- Mc Gann, P. *et al.* (2012) ‘Complete Sequence of a Novel 178-Kilobase Plasmid Carrying *bla*_{NDM-1} in a *Providencia stuartii* Strain Isolated in Afghanistan’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), pp. 1673–1679. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.05604-11>.
- Meganathan, R. (2001a) ‘Biosynthesis of menaquinone (vitamin K₂) and ubiquinone (coenzyme Q): A perspective on enzymatic mechanisms’, in *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 173–218. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(01\)61006-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(01)61006-9).
- Meganathan, R. (2001b) ‘Ubiquinone biosynthesis in microorganisms’, *FEMS Microbiology Letters*, 203(2), pp. 131–139. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10831.x>.
- Meganathan, R. and Kwon, O. (2009) ‘Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K₂) and Ubiquinone (Coenzyme Q)’, *EcoSal Plus*. Edited by T.J. Begley, 3(2), p. ecosalplus.3.6.3.3. Available at: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.3>.
- Melzer, M. and Heide, L. (1994) ‘Characterization of Polyprenyldiphosphate: 4-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase from *Escherichia coli*’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1212(1), pp. 93–102. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90193-7).
- Mettu, S. *et al.* (2021) ‘Perspective on Constructing Cellulose-Hydrogel-Based Gut-Like Bioreactors for Growth and Delivery of Multiple-Strain Probiotic Bacteria’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), pp. 4946–4959. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00468>.
- Mirsepasi-Lauridsen, H.C. *et al.* (2018) ‘Disease-Specific Enteric Microbiome Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease’, *Frontiers in Medicine*, 5, p. 304. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00304>.

- Mladěnka, P. *et al.* (2022) ‘Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity’, *Nutrition Reviews*, 80(4), pp. 677–698. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab061>.
- Möbius, K. *et al.* (2010) ‘Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), pp. 10436–10441. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000956107>.
- Moore, C.M. *et al.* (2013) ‘Processes and patterns of oceanic nutrient limitation’, *Nature Geoscience*, 6(9), pp. 701–710. Available at: <https://doi.org/10.1038/ngeo1765>.
- Moore, L.J. and Kiley, P.J. (2001) ‘Characterization of the Dimerization Domain in the FNR Transcription Factor’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), pp. 45744–45750. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M106569200>.
- Morel, F.M.M. and Price, N.M. (2003) ‘The Biogeochemical Cycles of Trace Metals in the Oceans’, *Science*, 300(5621), pp. 944–947. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1083545>.
- Muñoz-Gómez, S.A. *et al.* (2022) ‘Site-and-branch-heterogeneous analyses of an expanded dataset favour mitochondria as sister to known Alphaproteobacteria’, *Nature Ecology & Evolution*, 6(3), pp. 253–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01638-2>.
- Nagalingam, N.A., Kao, J.Y. and Young, V.B. (2011) ‘Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis’, *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(4), pp. 917–926. Available at: <https://doi.org/10.1002/ibd.21462>.
- Nagel, R., Schmidt, A. and Peters, R.J. (2019) ‘Isoprenyl diphosphate synthases: the chain length determining step in terpene biosynthesis’, *Planta*, 249(1), pp. 9–20. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3052-1>.
- 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), pp. 619–624. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.29363>.
- Nichols, B.P. and Green, J.M. (1992) ‘Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *ubiC* and purification of chorismate lyase’, *Journal of Bacteriology*, 174(16), pp. 5309–5316. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5309-5316.1992>.
- Nitzschke, A. and 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*. Edited by J.H. Weiner, 13(4), p. e0194699. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194699>.
- Nørager, S. *et al.* (2002) ‘*E. coli* Dihydroorotate Dehydrogenase Reveals Structural and Functional Distinctions between Different Classes of Dihydroorotate Dehydrogenases’, *Structure*, 10(9), pp. 1211–1223. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00831-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00831-6).
- Noriega, C.E. *et al.* (2010) ‘Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX–NarL and NarQ–NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12’, *Mol Microbiol*, 75(2), pp. 394–412. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06987>.

- Nowicka, B. and Kruk, J. (2010) ‘Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(9), pp. 1587–1605. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.007>.
- Odell, L.J. *et al.* (1999) ‘Survey for collagenase gene prtC in Porphyromonas gingivalis and Porphyromonas endodontalis isolated from endodontic infections’, *Journal of Endodontics*, 25(8), pp. 555–558. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80379-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80379-3).
- Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2011) ‘Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis’, *Journal of Bacteriology*, 193(10), pp. 2587–2597. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01468-10>.
- Okada, K. *et al.* (1997) ‘The ispB gene encoding octaprenyl diphosphate synthase is essential for growth of Escherichia coli’, *Journal of Bacteriology*, 179(9), pp. 3058–3060. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.3058-3060.1997>.
- Okamura, M.Y., Isaacson, R.A. and Feher, G. (1975) ‘Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of Rhodospseudomonas spheroides.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), pp. 3491–3495. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3491>.
- Ollagnier-de Choudens, S. *et al.* (2000) ‘Iron-Sulfur Center of Biotin Synthase and Lipoyl Synthase’, *Biochemistry*, 39(14), pp. 4165–4173. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi992090u>.
- Oyston, P.C.F., Sjöstedt, A. and Titball, R.W. (2004) ‘Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis’, *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), pp. 967–978. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1045>.
- Ozeir, M. *et al.* (2011) ‘Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency’, *Chemistry & Biology*, 18(9), pp. 1134–1142. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.07.008>.
- Ozeir, M. *et al.* (2015) ‘Coq6 Is Responsible for the C4-deamination Reaction in Coenzyme Q Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), pp. 24140–24151. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.675744>.
- Papucci, L. *et al.* (2003) ‘Coenzyme Q10 Prevents Apoptosis by Inhibiting Mitochondrial Depolarization Independently of Its Free Radical Scavenging Property’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), pp. 28220–28228. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M302297200>.
- Payet, L.-A. *et al.* (2016) ‘Mechanistic Details of Early Steps in Coenzyme Q Biosynthesis Pathway in Yeast’, *Cell Chemical Biology*, 23(10), pp. 1241–1250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.08.008>.
- Payne, K.A.P. *et al.* (2015) ‘New cofactor supports α,β -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition’, *Nature*, 522(7557), pp. 497–501. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14560>.
- Pelosi, L. *et al.* (2016) ‘Evolution of Ubiquinone Biosynthesis: Multiple Proteobacterial Enzymes with Various Regioselectivities To Catalyze Three Contiguous Aromatic

- Hydroxylation Reactions’, *mSystems*. Edited by P.C. Dorrestein, 1(4), pp. e00091-16, /msys/1/4/e00091-16.atom. Available at: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00091-16>.
- Pelosi, L. *et al.* (2019) ‘Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway’, 10(4), p. 21.
- Pereira, F.C. and Berry, D. (2017) ‘Microbial nutrient niches in the gut: Microbial nutrient niches in the gut’, *Environmental Microbiology*, 19(4), pp. 1366–1378. Available at: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13659>.
- Pierrel, F. *et al.* (2010) ‘Involvement of Mitochondrial Ferredoxin and Para-Aminobenzoic Acid in Yeast Coenzyme Q Biosynthesis’, *Chemistry & Biology*, 17(5), pp. 449–459. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.014>.
- Pierrel, F. *et al.* (2022) ‘Recent advances in the metabolic pathways and microbial production of coenzyme Q’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(4), p. 58. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03242-3>.
- Pittard, J. and Yang, J. (2008) ‘Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids’, *EcoSal Plus*, 3(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.8>.
- Poon, W.W. *et al.* (2000) ‘Identification of *Escherichia coli ubiB*, a Gene Required for the First Monooxygenase Step in Ubiquinone Biosynthesis’, *Journal of Bacteriology*, 182(18), pp. 5139–5146. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5139-5146.2000>.
- Price, E.E., Román-Rodríguez, F. and Boyd, J.M. (2021) ‘Bacterial approaches to sensing and responding to respiration and respiration metabolites’, *Molecular Microbiology*, 116(4), pp. 1009–1021. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14795>.
- Py, B. and Barras, F. (2010) ‘Building Fe–S proteins: bacterial strategies’, *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), pp. 436–446. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2356>.
- Ravcheev, D.A. and Thiele, I. (2016) ‘Genomic Analysis of the Human Gut Microbiome Suggests Novel Enzymes Involved in Quinone Biosynthesis’, *Frontiers in Microbiology*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00128>.
- 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 Research*, 46(D1), pp. D624–D632. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. and Bateman, A. (2012) ‘MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors’, *Nucleic Acids Research*, 40(D1), pp. D343–D350. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr987>.
- Reidenbach, A.G. *et al.* (2018) ‘Conserved Lipid and Small-Molecule Modulation of COQ8 Reveals Regulation of the Ancient Kinase-like UbiB Family’, *Cell Chemical Biology*, 25(2), pp. 154–165.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.11.001>.
- Rendon, J. *et al.* (2015) ‘Demethylmenaquinol is a substrate of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI) and forms a stable semiquinone intermediate at the NarGHI quinol oxidation site’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(8), pp. 739–747. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.001>.

- Rich, P.R. (1984) 'Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 768(1), pp. 53–79. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(84\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0304-4173(84)90007-7).
- Robinson, K.P. *et al.* (2021) 'Defining intermediates and redundancies in coenzyme Q precursor biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 296, p. 100643. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100643>.
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A. and Kamikawa, R. (2017) 'The Origin and Diversification of Mitochondria', *Current Biology*, 27(21), pp. R1177–R1192. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>.
- Rohmer, M. *et al.* (1993) 'Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate', *Biochemical Journal*, 295(2), pp. 517–524. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2950517>.
- Rohmer, M. and Rohmer, M. (1999) 'The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants†', *Natural Product Reports*, 16(5), pp. 565–574. Available at: <https://doi.org/10.1039/a709175c>.
- Sakai, Y., Kimura, S. and Suzuki, T. (2019) 'Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability', *Nature Communications*, 10(1), p. 2858. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10750-8>.
- Salinas, G., Langelaan, D.N. and Shepherd, J.N. (2020) 'Rhodoquinone in bacteria and animals: Two distinct pathways for biosynthesis of this key electron transporter used in anaerobic bioenergetics', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1861(11), p. 148278. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148278>.
- Salmon, K. *et al.* (2003) 'Global Gene Expression Profiling in Escherichia coli K12', *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp. 29837–29855. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M213060200>.
- Schacherl, M. *et al.* (2015) 'The first crystal structure of the peptidase domain of the U32 peptidase family', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 71(12), pp. 2505–2512. Available at: <https://doi.org/10.1107/S1399004715019549>.
- Schluckebier, G. *et al.* (1995) 'Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases', *Journal of Molecular Biology*, 247(1), pp. 16–20. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0117>.
- Schoepp-Cothenet, B. *et al.* (2009) 'Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), pp. 8549–8554. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0813173106>.
- Schoepp-Cothenet, B. *et al.* (2013) 'On the universal core of bioenergetics', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), pp. 79–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.005>.
- Schulz, V. *et al.* (2023) 'Functional spectrum and specificity of mitochondrial ferredoxins FDX1 and FDX2', *Nature Chemical Biology*, 19(2), pp. 206–217. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01159-4>.

Sévin, D.C. and Sauer, U. (2014) ‘Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*’, *Nature Chemical Biology*, 10(4), pp. 266–272. Available at: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1437>.

Sharma, P. *et al.* (2012) ‘On the function of the various quinone species in *Escherichia coli*: The role of DMK in the electron transfer chains of *E. coli*’, *FEBS Journal*, 279(18), pp. 3364–3373. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08608.x>.

Sharrocks, A.D., Green, J. and Guest, J.R. (1990) ‘In vivo and in vitro mutants of FNR the anaerobic transcriptional regulator of *E. coli*’, *FEBS Letters*, 270(1–2), pp. 119–122. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81248-M](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81248-M).

Siebert, M., Severin, K. and Heide, L. (1994) ‘Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase’, *Microbiology*, (140), pp. 897–904.

Simon, J., van Spanning, R.J.M. and Richardson, D.J. (2008) ‘The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(12), pp. 1480–1490. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.008>.

Sjostedt, A. (2007) ‘Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105(1), pp. 1–29. Available at: <https://doi.org/10.1196/annals.1409.009>.

Smith, N. *et al.* (2006) ‘Structural analysis of ligand binding and catalysis in chorismate lyase’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(1), pp. 72–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.026>.

Søballe, B. and Poole, R.K. (1999) ‘Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management’, *Microbiology*, 145(8), pp. 1817–1830. Available at: <https://doi.org/10.1099/13500872-145-8-1817>.

Spees, A.M. *et al.* (2013) ‘Streptomycin-Induced Inflammation Enhances *Escherichia coli* Gut Colonization Through Nitrate Respiration’, *mBio*. Edited by S. Maloy, 4(4), pp. e00430-13. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00430-13>.

Spiga, L. and Winter, S.E. (2019) ‘Using Enteric Pathogens to Probe the Gut Microbiota’, *Trends in Microbiology*, 27(3), pp. 243–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.11.007>.

Stefely, J.A. *et al.* (2015) ‘Mitochondrial ADCK3 Employs an Atypical Protein Kinase-like Fold to Enable Coenzyme Q Biosynthesis’, *Molecular Cell*, 57(1), pp. 83–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.002>.

Stefely, J.A. *et al.* (2016) ‘Cerebellar Ataxia and Coenzyme Q Deficiency through Loss of Unorthodox Kinase Activity’, *Molecular Cell*, 63(4), pp. 608–620. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.030>.

Stefely, J.A. and Pagliarini, D.J. (2017) ‘Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis’, *Trends in Biochemical Sciences*, 42(10), pp. 824–843. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.008>.

- Stenmark, P. *et al.* (2001) 'A New Member of the Family of Di-iron carboxylase proteins Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 33297–33300. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C100346200>.
- Stewart, V., Chen, L.-L. and Wu, H. (2003) 'Response to culture aeration mediated by the nitrate and nitrite sensor NarQ of *Escherichia coli* K-12: NarQ senses aeration', *Molecular Microbiology*, 50(4), pp. 1391–1399. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03776.x>.
- Stroobant, P., Young, I.G. and Gibson, F. (1972) 'Mutants of *Escherichia coli* K-12 Blocked in the Final Reaction of Ubiquinone Biosynthesis: Characterization and Genetic Analysis', *Journal of Bacteriology*, 109(1), pp. 134–139. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.109.1.134-139.1972>.
- Subramanian, K. *et al.* (2019) 'Coenzyme Q biosynthetic proteins assemble in a substrate-dependent manner into domains at ER–mitochondria contacts', *Journal of Cell Biology*, 218(4), pp. 1353–1369. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201808044>.
- Sultan, S. *et al.* (2021) 'Metabolic Influences of Gut Microbiota Dysbiosis on Inflammatory Bowel Disease', *Frontiers in Physiology*, 12, p. 715506. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.715506>.
- Sutton, V.R. *et al.* (2004) 'Kinetic Analysis of the Oxidative Conversion of the [4Fe-4S]²⁺ Cluster of FNR to a [2Fe-2S]²⁺ Cluster', *Journal of Bacteriology*, 186(23), pp. 8018–8025. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8018-8025.2004>.
- Taber, H.W. *et al.* (1987) 'Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics', *MICROBIOL. REV.*, 51.
- Taylor, S.J. *et al.* (2022) 'Colonocyte-derived lactate promotes *E. coli* fitness in the context of inflammation-associated gut microbiota dysbiosis', *Microbiome*, 10(1), p. 200. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01389-7>.
- Tempelhagen, L. *et al.* (2020) 'Cultivation at high osmotic pressure confers ubiquinone 8–independent protection of respiration on *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 295(4), pp. 981–993. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011549>.
- Teran-Melo, J.L. *et al.* (2018) 'Routes of phosphoryl group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor histidine kinase ArcB', *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), pp. 13214–13223. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003910>.
- Torres Pazmiño, D.E. *et al.* (2010) 'Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications', *Journal of Biotechnology*, 146(1–2), pp. 9–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.021>.
- Tran, U.C. *et al.* (2006) 'Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 Mutants by Mitochondrial Targeting of the *Escherichia coli* UbiF Polypeptide: TWO FUNCTIONS OF YEAST COQ7 POLYPEPTIDE IN COENZYME Q BIOSYNTHESIS', *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), pp. 16401–16409. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M513267200>.

- Tran, U.C. and Clarke, C.F. (2007) 'Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes', *Mitochondrion*, 7, pp. S62–S71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.03.007>.
- Tseng, C.P., Albrecht, J. and Gunsalus, R.P. (1996) 'Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 178(4), pp. 1094–1098. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1094-1098.1996>.
- Uden, G. and Bongaerts, J. (1997) 'Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(3), pp. 217–234. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00034-0).
- Uden, G. and Schirawski, J. (1997) 'The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions', *Molecular Microbiology*, 25, pp. 205–210. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4731841>.
- Uden, G., Steinmetz, P.A. and Degreif-dünnwald, P. (2014) 'The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics', *EcoSal Plus*, 2(2), p. ecosalplus.3.2.4. Available at: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.2.4>.
- Upadhyay, A. *et al.* (2018) 'Mycobacterial MenJ: An Oxidoreductase Involved in Menaquinone Biosynthesis', *ACS Chemical Biology*, 13(9), pp. 2498–2507. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00402>.
- Vo, C.-D.-T. *et al.* (2020) 'The O₂-independent pathway of ubiquinone biosynthesis is essential for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*', *Journal of Biological Chemistry*, 295(27), pp. 9021–9032. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013748>.
- Wallace, B.J. and Young, I.G. (1977a) 'Aerobic respiration in mutants of *Escherichia coli* accumulating quinone analogues of ubiquinone', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 461(1), pp. 75–83. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90070-6).
- Wallace, B.J. and Young, I.G. (1977b) 'Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a ubiA– menA– double quinone mutant', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 461(1), pp. 84–100. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90071-8).
- Wang, Y. and Hekimi, S. (2019) 'The Complexity of Making Ubiquinone', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(12), pp. 929–943. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.009>.
- Wessjohann, L. and Sontag, B. (1996) 'Prenylation of Benzoic Acid Derivatives Catalyzed by a Transferase from *Escherichia coli* Overproduction: Method Development and Substrate Specificity', *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(15), pp. 1697–1699. Available at: <https://doi.org/10.1002/anie.199616971>.
- White, M.D. *et al.* (2015) 'UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis', *Nature*, 522(7557), pp. 502–506. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14559>.

- Winter, S.E. *et al.* (2013) ‘Host-Derived Nitrate Boosts Growth of *E. coli* in the Inflamed Gut’, *Science*, 339(6120), pp. 708–711. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1232467>.
- Wissenbach, U., Kröger, A. and Uden, G. (1990) ‘The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*’, *Archives of Microbiology*, 154(1). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00249179>.
- Wissenbach, U., Ternes, D. and Uden, G. (1992) ‘An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration’, *Archives of Microbiology*, 158(1), pp. 68–73. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00249068>.
- Wissig, J. *et al.* (2019) ‘Molecular Microbiology - 2019 - Wissig - CyaC a redox-regulated adenylate cyclase of *Sinorhizobium meliloti* with a quinone.pdf’, *Mol Microbiol*, 112(1), pp. 16–28. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14251>.
- Wu, G. *et al.* (1992) ‘Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants affected in aerobic respiration: the cloning and nucleotide sequence of *ubiG*: Identification of an S-adenosylmethionine-binding motif in protein, RNA, and small-molecule methyltransferases’, *Journal of General Microbiology*, 138(10), pp. 2101–2112. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-138-10-2101>.
- Wu, M.T., Carlson, S.A. and Meyerholz, D.K. (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’, *Microbial Pathogenesis*, 33(6), pp. 279–287. Available at: <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0535>.
- Xie, L.X. *et al.* (2015) ‘Resveratrol and *para*-coumarate serve as ring precursors for coenzyme Q biosynthesis’, *Journal of Lipid Research*, 56(4), pp. 909–919. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M057919>.
- Xing, L. *et al.* (2011) ‘Crystallization and preliminary crystallographic studies of UbiG, an *O*-methyltransferase from *Escherichia coli*’, *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(6), pp. 727–729. Available at: <https://doi.org/10.1107/S1744309111014278>.
- Xiong, N. *et al.* (2011) ‘Expression of a collagenase that enables blood–brain barrier penetration for *Salmonella* implicated in bovine encephalopathies’, *Microbial Pathogenesis*, 51(3), pp. 230–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.04.008>.
- Xu, J.-J. *et al.* (2021) ‘A unique flavoenzyme operates in ubiquinone biosynthesis in photosynthesis-related eukaryotes’, *Science Advances*, 7(50), p. eabl3594. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl3594>.
- Xu, J.-J. *et al.* (2022) ‘How plants synthesize coenzyme Q’, *Plant Communications*, 3(5), p. 100341. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100341>.
- Xu, W. *et al.* (2014) ‘Improving coenzyme Q8 production in *Escherichia coli* employing multiple strategies’, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(8), pp. 1297–1303. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1458-8>.

- Yen, H.-C. *et al.* (2016) ‘Disruption of the human COQ5-containing protein complex is associated with diminished coenzyme Q10 levels under two different conditions of mitochondrial energy deficiency’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(9), pp. 1864–1876. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.005>.
- Young, I.G. *et al.* (1971) ‘Characterization and Genetic Analysis of Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12 Accumulating the Ubiquinone Precursors 2-Octaprenyl-6-Methoxy-1,4-Benzoquinone and 2-Octaprenyl-3-Methyl-6-Methoxy-1,4-Benzoquinone’, *Journal of Bacteriology*, 105(3), pp. 769–778. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.105.3.769-778.1971>.
- Young, I.G. *et al.* (1972) ‘Biochemical and Genetic Studies on Ubiquinone Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: 4-Hydroxybenzoate Octaprenyltransferase’, *Journal of Bacteriology*, 110(1), pp. 18–25. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.110.1.18-25.1972>.
- Young, I.G. *et al.* (1973) ‘Pathway for Ubiquinone Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Gene-Enzyme Relationships and Intermediates’, *Journal of Bacteriology*, 114(1), pp. 42–52. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.114.1.42-52.1973>.
- Zeng, H. *et al.* (1998) ‘Low Ubiquinone Content in *Escherichia coli* Causes Thiol Hypersensitivity’, *Journal of Bacteriology*, 180(14), pp. 3681–3685. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3681-3685.1998>.
- Zhang, H. and Javor, G.T. (2003) ‘Regulation of the isofunctional genes *ubiD* and *ubiX* of the ubiquinone biosynthetic pathway of *Escherichia coli*’, *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), pp. 67–72. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00343-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00343-4).
- Zheng, L., Kelly, C.J. and Colgan, S.P. (2015) ‘Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia’, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(6), pp. C350–C360. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00191.2015>.
- Zhou, L. *et al.* (2013) ‘The diffusible factor synthase XanB2 is a bifunctional chorismatase that links the shikimate pathway to ubiquinone and xanthomonadins biosynthetic pathways: XanB2 is a bifunctional chorismatase’, *Molecular Microbiology*, 87(1), pp. 80–93. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12084>.
- Zhou, L. *et al.* (2019) ‘Biosynthesis of Coenzyme Q in the Phytopathogen *Xanthomonas campestris* via a Yeast-Like Pathway’, *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 32(2), pp. 217–226. Available at: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0183-R>.
- Zhu, Y. *et al.* (2015) ‘Structural and biochemical studies reveal UbiG/Coq3 as a class of novel membrane-binding proteins’, *Biochemical Journal*, 470(1), pp. 105–114. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20150329>.
- Zhu, Y. *et al.* (2016) ‘Structural insights into the methyl donor recognition model of a novel membrane-binding protein UbiG’, *Scientific Reports*, 6(1), p. 23147. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep23147>.
- Zogaj, X. and Klose, K.E. (2011) ‘Genetic Manipulation of *Francisella Tularensis*’, *Frontiers in Microbiology*, 1. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00142>.

L'ubiquinone (UQ) est un lipide redox qui intervient dans le transfert d'électrons et de protons dans les chaînes respiratoires des eucaryotes et des protéobactéries. Il joue un rôle clé dans la bioénergétique de ces organismes et sa voie de biosynthèse a été largement étudiée chez *Escherichia coli*. Cette bactérie anaérobie facultative synthétise l'UQ en aérobiose via une voie O₂-dépendante et en anaérobiose via une voie O₂-indépendante. Ces deux voies multi-étapes font intervenir différentes enzymes et protéines accessoires. Certaines sont communes aux deux voies (UbiA à UbiE, UbiG et UbiX) alors que d'autres sont impliquées uniquement dans la voie O₂-dépendante (UbiI, UbiH, UbiF, UbiJ et UbiK) ou dans la voie O₂-indépendante (UbiT à UbiV). Chacune des deux voies comporte trois réactions d'hydroxylation sur des atomes de carbone contigus du cycle aromatique des intermédiaires de l'UQ. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux réactions d'hydroxylation des deux voies chez les protéobactéries, d'un point de vue biochimique, évolutif et physiologique. D'autre part, nous avons également abordé le rôle de l'UQ dans la pathogénicité de la bactérie *Francisella novicida*. En conditions aérobies, les trois réactions d'hydroxylation sont catalysées par des monooxygénases à flavine (FMOs) ou à fer (Coq7) qui utilisent le dioxygène (O₂) comme source de groupement hydroxyle. Il a été montré que diverses combinaisons d'hydroxylases étaient utilisées par les bactéries. Par exemple, *E. coli* utilise trois FMOs, (UbiI, H et F) alors que *Rhodospirillum rubrum* emploie UbiL (FMO) et Coq7, et que *Neisseria meningitidis* n'a qu'une seule enzyme, UbiM (FMO). Ces résultats ont suggéré une régiosélectivité (capacité à hydroxyler un carbone spécifique du cycle aromatique) variée pour les hydroxylases O₂-dépendante, notamment pour les FMOs. Nous avons donc exploré l'évolution de la régiosélectivité des FMOs impliquées dans la biosynthèse de l'UQ (Ubi-FMOs) en analysant les génomes de 2352 espèces d' α -, β - et γ -protéobactéries. Nos analyses phylogénétiques et biochimiques ont mis en évidence l'existence d'une nouvelle FMO (UbiN) et ont révélé que les Ubi-FMOs se sont diversifiées via trois événements de duplication associés à un cas de sous-fonctionnalisation et à deux cas de néofonctionnalisation liés à une perte de Coq7. Par ailleurs, l'équipe a montré l'implication des protéines UbiT, U, V dans la voie O₂-indépendante de biosynthèse de l'UQ. Cependant, l'identité des hydroxylases et du donneur de groupement hydroxyle pour les réactions d'hydroxylation O₂-indépendantes restaient à élucider. Grâce à des expériences *in vivo*, nous avons montré que l'hétérodimère UbiU-V est capable d'hydroxyler les trois atomes de carbone des intermédiaires de l'UQ et que l'activité d'UbiU-V dépend d'un métabolite de la voie du shikimate, vraisemblablement le préphénate. Des expériences de marquage ont démontré que ce métabolite est la source de groupement hydroxyle utilisé dans la voie anaérobie de biosynthèse de l'UQ. Ces résultats révèlent la première molécule organique utilisée comme donneur d'hydroxyle dans des réactions biologiques et suggèrent que les protéines appartenant à la même famille qu'UbiU-V pourraient fonctionner de façon similaire. Par ailleurs, des analyses génétiques et physiologiques ont montré que l'expression d'UbiU-V est régulée par FNR, un régulateur transcriptionnel sensible à l'O₂, et qu'UbiU-V procurent un léger avantage à *E. coli* pour coloniser l'intestin de souris, une de ses niches écologiques. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent qu'UbiTUV participent à la stratégie utilisée par *E. coli* pour s'adapter aux conditions respiratoires dans des environnements versatiles tel que l'intestin. Enfin, nous avons caractérisé la voie de biosynthèse de l'UQ chez la bactérie *F. novicida*. À l'aide du modèle *Galleria mellonella*, nous avons pu montrer pour la première fois que l'UQ contribue à la pathogénicité de cette bactérie.

Ubiquinone (UQ) is a redox lipid involved in electrons and protons transfer in the respiratory chains of eukaryotes and proteobacteria. UQ plays a central role in the bioenergetics of these organisms. The UQ biosynthesis pathway has been extensively studied in *Escherichia coli*. This facultative anaerobic bacterium synthesizes UQ aerobically via an O₂-dependent pathway and anaerobically via an O₂-independent pathway. These two multi-step pathways involve various enzymes and accessory proteins. Some are common to both pathways (UbiA to UbiE, UbiG and UbiX), while others are involved only in the O₂-dependent pathway (UbiI, UbiH, UbiF, UbiJ and UbiK) or in the O₂-independent pathway (UbiT to UbiV). Each of the two pathways involves three hydroxylation reactions on contiguous carbon atoms of the aromatic ring of the UQ intermediates. During this thesis work, we were interested in the hydroxylation reactions of the two pathways in proteobacteria, from a biochemical, evolutionary and physiological point of view. Moreover, we also studied the role of UQ in the pathogenicity of *Francisella novicida* bacteria. Under aerobic conditions, all three hydroxylation reactions are catalyzed by flavin (FMOs) or iron (Coq7) monooxygenases, which use oxygen (O₂) as a source of hydroxyl groups. Various combinations of hydroxylases have been shown to be used by bacteria. For example, *E. coli* uses three FMOs, (UbiI, H and F) while *Rhodospirillum rubrum* employs UbiL (FMO) and Coq7, and *Neisseria meningitidis* has just one enzyme, UbiM (FMO). These results suggested a varied regioselectivity (ability to hydroxylate a specific carbon of the aromatic ring) for O₂-dependent hydroxylases, particularly for FMOs. We therefore explored the evolution of the regioselectivity of FMOs involved in UQ biosynthesis (Ubi-FMOs) by analyzing the genomes of 2352 species of α -, β - and γ -proteobacteria. Our phylogenetic and biochemical analyses highlighted the existence of a new FMO (UbiN) and revealed that Ubi-FMOs diversified via three duplication events associated with one case of sub-functionalization and two cases of neo-functionalization linked to a loss of Coq7. The team also demonstrated the involvement of the UbiT, U, V proteins in the O₂-independent pathway of UQ biosynthesis. However, the identity of the hydroxylases and the hydroxyl group donor for O₂-independent hydroxylation reactions remained to be elucidated. Through *in vivo* experiments, we have shown that the UbiU-V heterodimer is capable of hydroxylating all three carbon atoms of UQ intermediates, and that UbiU-V activity depends on a metabolite of the shikimate pathway, presumably prephenate. Labelling experiments demonstrated that this metabolite is the source of the hydroxyl group used in the O₂-independent hydroxylation reactions of UQ biosynthesis. These results reveal the first organic molecule to be used as a hydroxyl donor in biological reactions and suggest that proteins belonging to the same family as UbiU-V could function in a similar way. In addition, genetic and physiological analyses showed that expression of UbiU-V is regulated by FNR, an O₂-sensitive transcriptional regulator, and that UbiU-V provide a slight advantage to *E. coli* for colonizing the mouse intestine, one of its ecological niches. Overall, our results reveal that UbiTUV participate in the strategy used by *E. coli* to adapt to respiratory conditions in versatile environments such as the gut. Finally, we characterized the UQ biosynthetic pathway in the bacterium *F. novicida*. Using *Galleria mellonella* as a model, we were able to show for the first time that UQ contributes to the pathogenicity of this bacterium.