

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Gradué Biologie Santé de Lille (n°446)

Thèse de doctorat

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement le 25 mars 2026 par

Majda HACHMI

**Caractérisation fonctionnelle d'un système d'acquisition du
cuivre dédié aux cytochromes oxydases à hème-cuivre chez
*Bordetella pertussis***

Devant le jury composé de :

Pr. Benoit FOLIGNE Professeur de l'Université de Lille	Président
Dr. Isabelle SCHALK Directrice de Recherche CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteuse
Dr. Soufian OUCHANE Directeur de Recherche CNRS, Paris-Saclay	Rapporteur
Dr. Nathalie DAUTIN Chargée de Recherche CNRS, Université Paris Cité	Examinatrice
Pr. Jean-Yves MATROULE Professeur de l'Université de Namur	Examineur
Dr. Françoise JACOB-DUBUISSON Directrice de Recherche CNRS, Institut Pasteur de Lille	Directrice de Thèse
Dr. Rudy ANTOINE Chargé de Recherche Inserm, Institut Pasteur de Lille	Invité

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse n'aurait pas été possible sans l'encadrement, le soutien et l'aide de nombreuses personnes, auxquelles je souhaite adresser mes plus sincères remerciements.

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Françoise. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse, ainsi que durant mes stages de master. Ta passion pour la recherche a été pour moi une véritable source d'inspiration. Ta bienveillance et ta confiance m'ont permis de gagner en assurance et de progresser dans mon parcours. Merci pour ta disponibilité constante, pour nos nombreuses réunions, pour ton soutien face aux difficultés et pour avoir su encourager chaque avancée. J'ai beaucoup apprécié les expériences que nous avons menées ensemble, elles ont été des moments particulièrement riches en apprentissages. C'est un immense honneur pour moi d'avoir été ta dernière doctorante.

Je remercie également Rudy pour son aide et son soutien tout au long de cette thèse, notamment lors des réunions et des CSI. Merci pour ton implication et pour ta contribution à l'avancement de ce projet.

Je remercie les membres du comité de suivi de thèse, Ruben Hartkoorn et Jean-François Collet, pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail. Vos conseils et vos remarques ont été précieux pour orienter et enrichir ce projet.

Je remercie Christine Pierrot, ma marraine de thèse, pour nos échanges et ses encouragements tout au long de ces années.

Je remercie nos collaborateurs, en particulier Pascal Arnoux, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Ce fut une expérience très enrichissante de découvrir et de travailler au CEA. Merci pour ta disponibilité et ta bienveillance. Je remercie également Manon Mirgoux et René Wintjens pour leur aide précieuse, leur réactivité et leur engagement.

Je remercie Nathalie Mielcarek de m'avoir accueillie au sein de l'équipe. Je remercie également Philippe, Alain, Romain, Loïc, Carine et Stéphane pour leur aide et leurs remarques constructives lors des réunions et des répétitions de présentations.

Merci à Anne-Sophie pour sa gentillesse, sa bienveillance, ses conseils et son aide précieuse lors des expériences.

Merci à Gauthier et Alex, les deux doctorants qui m'ont précédée sur ce projet, pour les connaissances qu'ils m'ont transmises.

Un grand merci à Sophie et Stéphanie pour tout le travail accompli au laboratoire, tant sur le plan scientifique qu'organisationnel, facilitant grandement notre quotidien.

Je remercie Marine, Mélanie, Bérénice, Hala, Cyril, Eik, Sophie, Camille, Kamel, ainsi que toutes les personnes du P3 que j'ai sollicitées ces derniers temps. Merci pour votre aide et votre patience.

Un merci tout particulier à Dacine, ma binôme du quotidien. Travailler avec toi a été une expérience précieuse. Nos discussions, nos pauses, nos moments de détente et de soutien en dehors du labo ont largement contribué à rendre cette thèse plus agréable. Bon courage pour la fin de ta thèse, et je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci aussi à Guillaume pour sa gentillesse, je te souhaite également beaucoup de réussite pour la suite.

Je remercie Laura, Esther et Oriane, avec qui j'ai partagé une partie de ce parcours doctoral. Nous avons traversé ensemble différentes étapes de nos thèses, partagé des moments de travail, mais aussi de nombreuses activités et instants de convivialité qui ont marqué ces années. Chacune a ensuite poursuivi son chemin, mais ces souvenirs communs resteront précieux. Je vous souhaite à toutes une très belle continuation, tant sur le plan professionnel que personnel.

Après mon bureau et le P2, l'endroit où j'ai passé le plus de temps durant ma thèse a sans doute été la salle des post-doctorants, un lieu d'échanges et de soutien où j'ai vécu de nombreux moments agréables.

Je remercie chaleureusement Zainab pour son écoute, son aide précieuse et son soutien constant tout au long de ces années. Sa présence, sa bienveillance, les nombreux moments de rire partagés, ainsi que nos longues discussions ont grandement contribué à rendre cette expérience de thèse plus agréable. Merci également à Henri pour sa gentillesse et pour ses magnifiques portoirs réalisés pour le laboratoire.

Merci à Line pour son énergie positive et pour l'ambiance conviviale qu'elle a su instaurer au laboratoire, ainsi que pour son aide, ses conseils et son talent certain pour me « cramer » à la moindre bêtise au labo. Merci également pour les moments partagés en dehors du labo. Je garde de très bons souvenirs de ces années de thèse, marquées par de nombreux moments de rire et d'échanges passés à tes côtés. Je te souhaite une excellente continuation dans ton nouveau laboratoire.

Je remercie aussi Kamila, Elena, Rim, Baptiste, Morgane et Maud pour leur gentillesse, ainsi que pour l'ambiance conviviale et les moments partagés au quotidien.

Au-delà de l'équipe RMB, je remercie Cyrine, Dima, Hind, Aicha, Jonathan et Vien pour leur gentillesse.

Un immense merci à Ghida, une rencontre précieuse. D'abord stagiaire de M2 au laboratoire, notre amitié s'est construite au fil du temps. Merci pour ton soutien constant, ton intérêt sincère pour mon travail et ta présence.

Je remercie enfin celles et ceux qui m'ont accompagnée depuis le Maroc tout au long de ces années, malgré la distance. Merci à Saber pour son soutien constant, son écoute et son aide

précieuse pour alléger les moments de stress. Merci à Oumaima pour ses mots bienveillants et ses encouragements. Merci à mes amis Kaoutar, Hind, Sara, Anissa, Haitam et Amine pour avoir su préserver ce lien précieux au fil du temps.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à ma famille, qui a été un pilier essentiel tout au long de ce parcours.

Merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel depuis toujours, pour leur confiance, leurs encouragements et leur écoute, même lorsque mon travail leur semblait complexe. Votre présence a été déterminante.

Merci à Ilham, Chaimae, ainsi qu'à mes frères Mourad, Adil, Hamza et Simo, pour votre amour, vos encouragements et votre présence malgré la distance. Merci à mon neveu Louqmane, dont les messages et vidéos ont illuminé de nombreuses journées. Merci également à ma cousine Mounia pour ses encouragements.

Enfin, je dédie ce travail à la mémoire de mes grands-parents, qui nous ont quittés durant ces années de thèse.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Abréviations	10
Liste des tableaux	11
Liste des figures	11
Introduction	14
Chapitre I : Le cuivre chez les bactéries	14
1. La biologie du cuivre et ses propriétés chimiques	14
2. Le cuivre dans l'interaction hôte-pathogène	15
3. Essentialité et toxicité du cuivre chez les procaryotes	17
3.1. Essentialité : Cuproprotéome des procaryotes	17
3.2. Toxicité du cuivre	20
4. Homéostasie du cuivre chez les bactéries Gram-négatives	22
Chapitre II : Importation des métaux chez les bactéries Gram-négatives	24
1. Transport non spécifique par les porines à travers la membrane externe	24
2. Transport spécifique à travers la membrane externe par les transporteurs TonB-dépendants	25
2.1. Structure des transporteurs TonB-dépendants et mode de fonctionnement	25
2.2. Diversité fonctionnelle des transporteurs TonB-dépendants	28
2.3. Régulation de synthèse des transporteurs TonB-dépendants	30
2.4. Transport des métaux sous forme libre	32
2.5. Transport des métaux après extraction à partir de protéines de l'hôte	34
2.6. Importation des métaux grâce à des effecteurs de systèmes de sécrétion	36
2.7. Importation des métaux grâce à des métallobactines	37
2.7.1. Les voies de biosynthèse des métallobactines	37
2.8. Facteurs contrôlant la complexation des métaux par des métallobactines	39
3. Transport des métaux à travers la membrane interne : cas du fer	41
3.1. Mécanismes de dissociation du fer de son sidérophore	41
Chapitre III : Acquisition du cuivre chez les bactéries Gram-négatives	43
1. NosA : un transporteur TonB-dépendant de cuivre identifié chez <i>Pseudomonas stutzeri</i>	43
2. Les bactéries méthanotrophes et le cuivre : la méthane monooxygénase (pMMO)	44
2.1. La méthano bactéine chez les méthanotrophes	45
2.2. Transport du complexe Cu-méthano bactéine chez les méthanotrophes	47
3. PcuB : un TBDT induit par la carence en cuivre chez <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	49
4. Transport du cuivre chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50

4.1.	OprC.....	50
4.2.	CrtA : Copper-responsive transporter A	52
5.	Transport du cuivre par FyuA, un TBDT du complexe Fer-Yersiniabactine	54
6.	Transport du cuivre à travers la membrane interne des bactéries à Gram négatif.....	56
Chapitre IV : <i>Bordetella pertussis</i>		58
1.	<i>Bordetella pertussis</i> : Modèle d'étude	58
2.	Traitement et vaccination contre <i>B. pertussis</i>	59
3.	Pouvoir pathogène de <i>B. pertussis</i>	61
3.1.	Facteurs de virulence.....	61
3.2.	Régulation de la virulence.....	61
3.3.	Le cuivre chez <i>B. pertussis</i>	62
4.	Transport des métaux chez <i>B. pertussis</i>	63
4.1.	Transport de fer	63
4.2.	Répertoire des transporteurs TonB-dépendants de <i>B. pertussis</i>	65
4.3.	Autres métallophores produits par <i>B. pertussis</i>	67
Chapitre V : Assemblage du cuivre dans les cytochromes oxydases à hème-cuivre.....		69
1.	Respiration chez <i>B. pertussis</i>	69
2.	Les HCOs de <i>B. pertussis</i>	71
2.1.	La cytochrome c oxydase de type aa3	71
2.2.	La cytochrome bo ubiquinol oxydase	71
3.	Assemblage des cofacteurs à cuivre dans les HCOs.....	72
3.1.	Assemblage du Cu _B	72
3.2.	Assemblage du centre Cu _A	76
4.	Mécanismes de réduction du cuivre	78
5.	Réductases de la famille PePSY-TM	78
6.	Objectifs de la thèse	81
Résultats		83
I.	Caractérisation de CrtA ^{Bp} (BfrG) chez <i>B. pertussis</i> , le prototype d'une nouvelle famille de TBDT à cuivre.....	83
1.	Identification de la famille de BfrG par analyse de similarité de séquence	83
2.	Transport du cuivre par CrtA ^{Bp}	85
2.1.	Etude de phénotype de croissance du mutant Bp- Δ crtA.....	85
2.2.	Lien entre CrtA ^{Bp} et les HCOs chez <i>B. pertussis</i>	87
2.3.	CrtA ^{Bp} transporte le cuivre oxydé.....	90
2.4.	Spécificité du phénotype de croissance de Bp- Δ crtA Δ cydAB	92
2.5.	Rôle de CrtA <i>in vivo</i>	94

3.	Caractérisation structurale de CrtA ^{Bp}	95
3.1.	Identification d'un site conservé par radiocristallographie	95
3.2.	Interaction de CrtA ^{Bp} avec le cuivre par l'intermédiaire d'une histidine	98
4.	Recherche du ligand de CrtA ^{Bp}	101
4.1.	Métallophores produits par <i>B. pertussis</i>	101
4.2.	CruR : une lipoprotéine codée par l'opéron de <i>crtA</i>	104
4.3.	Recherche <i>in silico</i> de métallophores associé à la famille CrtA.....	106
4.4.	Recherche de composés organiques capable d'interagir avec CrtA ^{Bp}	106
4.5.	Recherche du ligand de CrtA ^{Bp} par suivi de croissance en carence en cuivre.....	109
4.6.	Criblage <i>in silico</i> de ligands de CrtA ^{Bp}	115
5.	Article N°1: A new family of TonB-dependent copper transporters linked to respiratory oxidase function.....	116
II.	Rôle de CrpH dans l'assemblage des oxydases à hème-cuivre chez <i>B. pertussis</i>	131
1.	Etude du mutant de CrpH (BP2921) chez <i>B. pertussis</i>	131
1.1.	Phénotype de croissance du mutant Bp- Δ <i>crpH</i>	131
1.2.	Étude du transcriptome de <i>B. pertussis</i> en culture statique.....	134
2.	Impact de la délétion de <i>crpH</i> sur la respiration en culture statique.....	137
2.1.	Évaluation du niveau d'ATP dans les souches WT et Bp- Δ <i>crpH</i>	137
2.2.	Lien entre CrpH et la respiration via les oxydases à hème-cuivre.....	138
2.3.	Analyse quantitative de l'activité aa3-Cox chez <i>B. pertussis</i> par le test TMPD.....	140
2.4.	Effet de l'absence de CrpH sur la composition de la chaîne respiratoire	142
3.	Contribution de CrpH à la colonisation du tractus respiratoire murin.....	143
4.	Fonction moléculaire de CrpH en lien avec le cuivre	145
4.1.	Production de CrpH recombinante chez <i>E. coli</i>	145
4.2.	Relation entre CrpH et l'importation du cuivre chez <i>B. pertussis</i>	147
5.	CrpH : un acteur potentiel de la réduction du cuivre chez <i>B. pertussis</i>	148
5.1.	Importance des histidines conservées dans la fonction de CrpH.....	148
5.2.	Redondance partielle entre CrpH et la réductase de cuivre CcoG	149
5.3.	Effet d'addition d'agent réducteur sur le phénotype du mutant Bp- Δ <i>crpH</i>	152
5.4.	Rôle des chaperonnes à cuivre PCu _A C et Scol en culture statique	153
6.	Article N°2: CrpH of <i>Bordetella pertussis</i> , a prototypic PepSY _{TM} protein supporting heme-copper oxidoreductase function.....	154
	Discussion	168
	Conclusions et perspectives	180
	Matériel et Méthodes	182
	Bibliographie	192

Abréviations

aa3-Cox : Cytochrome c oxydase de type aa₃
AF3 : Alphafold3
Azu : Azurine
BCS : Bathocuproine disulfonate
EDDS : Ethylènediamine disuccinate
EPR : Résonance paramagnétique électronique
GSH : Glutathion
HCOs : Oxydases à hème-cuivre
ICP-MS : Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif
IS : Séquence d'insertion
Mbn : Méthanobactine
MCO : Oxydase à multi-cuivre
NRPS : Synthétase de peptide non-ribosomique
NTA : Acide nitrilotriacétique
ORA : Over-Representation Analysis (analyse de sur-représentation)
PKS : Polycétide synthétase
pMMO : Méthane monooxygénase membranaire (particulaire)
RiPP : Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide
ROS : Espèces réactives d'oxygène
sMMO : Méthane monooxygénase cytoplasmique (soluble)
SS : Milieu Stainer-Scholte
SSN : Sequence Similarity Network
SU-I : Sous unité I
SU-II : Sous-unité II
TBDT : Transporteur TonB-dépendant
TCEP : (tris(2-carboxyéthyl) phosphine
Tf : Transferrine
TMPD : N, N, N', N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine
Trien : Triéthylènetétramine
Vags : Virulence-activated genes
Vrgs : Virulence-repressed genes
Ybt : Yersiniabactine

Liste des tableaux

Tableau I Propriétés clés de Cu (I) et Cu (II).....	15
Tableau II Diversité fonctionnelle des TBDTs chez les bactéries à Gram négatif.....	29
Tableau III. Liste des TBDTs présents chez <i>B. pertussis</i>	66
Tableau IV. Métabolites présents dans les fluides des voies respiratoires humaines.	68
Tableau V. Conservation dans la famille CrtA des six résidus du site de liaison identifié.	96
Tableau VI Expression des gènes chez <i>B. pertussis</i> cultivée avec 20 mM MgSO ₄	103
Tableau VII Stabilité thermique de CrtA ^{Bp} purifié : forme apo, avec Cu(II), et avec Cu(II) + ligand.	108
Tableau VIII. Gènes de la respiration sous-exprimés en condition statique chez Bp- Δ crpH.	135

Liste des figures

Figure 1. Mécanismes de toxicité du cuivre intracellulaire	20
Figure 2. Schéma des systèmes participant à l'homéostasie du cuivre chez <i>E. coli</i>	23
Figure 3. Aspects structurels d'OmpC, une porine d' <i>E. coli</i> (PDB ID 2J1N)	24
Figure 4. Structure cristalline de la protéine FhuA d' <i>E. coli</i> (PDB ID 1FCP).....	26
Figure 5. Représentation structurelle d'un TBDT en interaction avec le complexe TonB-ExbB-ExbD. .	27
Figure 6. Modèle de régulation de <i>bfrG</i> par l'uORF <i>cruR</i>	32
Figure 7. Exemples de TBDTs transportant des métaux sous forme libre	33
Figure 8. Mécanisme d'acquisition du fer à partir de la transferrine.....	35
Figure 9. Structure cryo-EM du complexe TdfH-calprotectine (PDB ID 4XJK).....	36
Figure 10. Exemples représentatifs des classes de sidérophores.	39
Figure 11. Les géométries de coordination préférées de quelques ions métalliques divalents.	40
Figure 12. Structure cristalline du monomère de la pMMO de <i>Methylococcus capsulatus Bath</i> et de <i>Methylosinus trichosporium OB3b</i>	45
Figure 13. Structures cristallisées de Cu(I)-Mbn de <i>M. trichosporium OB3b</i> avec le cuivre représenté par une sphère argentée.....	46
Figure 14. Vue d'ensemble de l'homéostasie du cuivre chez <i>M. trichosporium OB3b</i>	48
Figure 15. Modèle proposé du transport de Cu(II) médié par le système T6SS-H2 chez <i>P. aeruginosa</i>	51
Figure 16. Caractéristiques structurales d'OprC, le TBDT de cuivre chez <i>P. aeruginosa</i>	52
Figure 17. Modélisation des complexes métalliques de la yersiniabactine avec Fe(III) et Cu(II)	55
Figure 18. Transport du Cu(II) à travers la membrane interne d' <i>E. coli</i> par le transporteur YebZ.....	57
Figure 19. Infection de l'épithélium bronchique humain par <i>B. pertussis</i>	59
Figure 20. Structure moléculaire de l'alcaligine.	64
Figure 21. Systèmes connus d'importation de fer chez <i>B. pertussis</i>	65
Figure 22. Représentation schématique d'une chaîne respiratoire bactérienne branchée. L'espèce choisie comme exemple est <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	69
Figure 23. Structures des oxydases hème-cuivre aa ₃ -Cox (PDB ID 3HB3) et bo ₃ -Qox (PDB ID 1FFT) impliquées dans la respiration aérobie.....	72
Figure 24. Centres métalliques rédox Cu _A et Cu _B de aa ₃ -Cox de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	73
Figure 25. Canal d'accès au centre Cu _B de la cytochrome c oxydase de <i>Paracoccus denitrificans</i>	74
Figure 26. Modèle de transfert du cuivre vers la SU-I (Cox1) de la Cox-aa ₃ par CtaG (Cox11)	75

Figure 27. Schéma de la biosynthèse du centre Cu _A et de son insertion dans la sous-unité II (CoxB) de la cytochrome c oxydase de <i>B. diazoefficiens</i> .	77
Figure 28. Structure de FoxB, une réductase du Fe(III) lié à la ferrioxamine B chez <i>P. aeruginosa</i>	79
Figure 29. Analyse de similarité de séquence de la superfamille TBDT	84
Figure 30. Croissance de BPSM (WT) et Bp- Δ crtA en milieu SS en conditions de culture agitée.	85
Figure 31. Croissance de BPSM et Bp- Δ crtA en culture statique en excès (50 μ M CuSO ₄) ou en limitation en cuivre (50 μ M BCS)	86
Figure 32. Nature des cytochromes oxydases terminales présentes chez les bactéries ayant un orthologue de CrtA.	87
Figure 33. Croissance de <i>B. pertussis</i> sauvage et des mutants de délétion des cytochromes oxydases.	88
Figure 34. Etude du rôle de CrtA dans l'importation du cuivre par suivi de croissance de Bp- Δ cydAB et Bp- Δ crtA Δ cydAB.	89
Figure 35. Croissance de Bp- Δ cydAB et Bp- Δ crtA Δ cydAB en absence d'ascorbate	90
Figure 36. Effet des concentrations d'ascorbate et de BCS sur la phase de latence de la courbe de croissance des mutants de délétion de cydAB.	91
Figure 37. Analyse par RT-qPCR de l'expression de bp2921	92
Figure 38. Complémentation du phénotype de croissance de Bp- Δ crtA Δ cydAB	93
Figure 39. Etude de l'importance de CrtA ^{Bp} dans un modèle d'infection murin	95
Figure 40. Structure aux rayons X de CrtA ^{Bp} avec une molécule de citrate dans la cavité	96
Figure 41. Importance du site conservé pour l'importation du cuivre	97
Figure 42. Importance du résidu Glu337 dans l'importation du cuivre par CrtA	98
Figure 43. Confirmation de l'interaction de CrtA ^{Bp} avec Cu(II) par spectroscopie EPR	99
Figure 44. Spectres HYSCORE montrant les signaux d'interaction de CrtA ^{MM} et CrtA ^{H358} avec Cu(II).	100
Figure 45. Présence d'un site constitué d'une méthionine et de trois histidines à la surface externe de CrtA ^{Bp} , formant un site non pertinent de coordination.	101
Figure 46. L'alcaligine et la bufferine ne sont pas nécessaires à l'acquisition du cuivre par CrtA chez <i>B. pertussis</i> .	104
Figure 47. Effet du blocage d'exportation de CruR sur la croissance de la souche déletée pour cydAB.	105
Figure 48. Effet de chélateurs de Cu(II) sur la croissance de Bp- Δ cydAB et Bp- Δ crtA Δ cydAB en limitation en cuivre.	110
Figure 49. Modèle AlphaFold3 représentatif de l'interaction de CrtA ^{Bp} avec le complexe Cu-Trien...	111
Figure 50. Effet du Trien sur la croissance du mutant Bp- Δ cydAB en condition de limitation en cuivre.	112
Figure 51. Dosage de la concentration du cuivre intracellulaire chez <i>B. pertussis</i> sauvage et Bp- Δ crtA par ICP-AES.	114
Figure 52. Dosage de la concentration du cuivre intracellulaire par ICP-AES chez <i>B. pertussis</i> sauvage et Bp- Δ crtA précaencées en cuivre.	115
Figure 53. Modèle tridimensionnel de la protéine Bp2921 (CrpH) généré à l'aide d'AlphaFold3	131
Figure 54. Phénotype de croissance du mutant Bp- Δ crpH	132
Figure 55. Essais de complémentation du phénotype de croissance de Bp- Δ crpH	133
Figure 56. Volcano plot montrant les gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Bp- Δ crpH en culture statique par rapport à la culture agitée	135
Figure 57. Analyse d'enrichissement fonctionnel (ORA) des gènes sous- ou sur-exprimés spécifiquement chez Bp- Δ crpH	136
Figure 58. Niveaux d'ATP de <i>B. pertussis</i> WT et Bp- Δ crpH.	137
Figure 59. Croissance de Bp-KOcydAB et Bp- Δ crpHKOcydAB en culture statique	139

Figure 60. Croissance de BPSM (WT) et de souches mutantes dérivées de BPSM en culture statique et en culture agitée.....	140
Figure 61. Activité aa3-Cox dans la souche sauvage et le mutant Bp- Δ crpH.....	141
Figure 62. Identification des cytochromes oxydases terminales dans les membranes de <i>B. pertussis</i>	143
Figure 63. Rôle de CrpH dans un modèle d'infection murin.....	144
Figure 64. Confirmation de l'importance de CrpH <i>in vivo</i>	145
Figure 65. Analyse de l'expression recombinante et native de CrpH chez <i>E. coli</i> (A) et <i>B. pertussis</i> (B) par immunoblot.....	147
Figure 66. Croissance de <i>B. pertussis</i> sauvage et des mutants Bp- Δ crpH et Bp- Δ crtA	148
Figure 67. Importance des résidus His200 et 444 pour la fonction de CrpH	149
Figure 68. Redondance partielle entre la réductase de cuivre CcoG et la protéine CrpH.	151
Figure 69. Impact de l'ascorbate ou du glutathion sur la croissance de la souche WT et du mutant Bp- Δ crpH.....	152
Figure 70 Croissance de la souche WT et de mutants de chaperons du cuivre.....	154

Introduction

Chapitre I : Le cuivre chez les bactéries

1. La biologie du cuivre et ses propriétés chimiques

Aux premiers stades de l'évolution de la biosphère terrestre, l'atmosphère était caractérisée par une faible teneur en oxygène moléculaire (O_2). Dans ces conditions, le fer se trouvait sous sa forme ferreuse Fe(II) soluble. Dès cette époque Fe(II) a joué un rôle central dans les processus métaboliques de nombreux microorganismes en tant que cofacteur enzymatique et transporteur d'électrons. Après l'apparition des cyanobactéries, et grâce à leur capacité à réaliser la photosynthèse, le pourcentage d' O_2 a progressivement augmenté, ce qui a conduit à l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) insoluble. Le fer est devenu peu disponible pour les microorganismes, qui ont dû développer des stratégies spécifiques pour l'obtenir. A l'opposé, suite à l'oxydation du Cu(I) en Cu(II), le cuivre est devenu très soluble et été recruté comme un nouveau cofacteur métallique par le monde vivant. L'augmentation de la biodisponibilité du cuivre a conduit à l'évolution de plusieurs enzymes utilisant le cuivre (Solioz, 2018). Le cuivre peut en effet exister sous deux états d'oxydation, Cu(I), la forme réduite, et Cu(II), la forme oxydée. Le potentiel rédox de ce couple lui permet de participer efficacement à des transferts d'électrons et d'agir comme cofacteur catalytique dans diverses enzymes.

De plus, le cuivre présente une très forte affinité pour les molécules organiques, avec lesquelles il forme des complexes très stables (Irving & Williams, 1953). Ces derniers auteurs ont classé les métaux de transition divalents selon la stabilité thermodynamique des complexes formés, et le cuivre est tout en haut de cette liste. Dans les cuproprotéines, le cuivre établit des interactions avec des acides aminés particuliers tel que la cystéine, la méthionine et l'histidine (Pearson, 1968; Rubino & Franz, 2012). Cependant, le nombre de résidus impliqués dans la coordination change en fonction de la forme du cuivre et du type de cuproprotéine. Dans les protéines qui utilisent le cuivre comme cofacteur, le site de liaison a une affinité forte pour le cuivre avec un nombre de coordination élevé, afin d'éviter la perte du cuivre lors des réactions d'oxydoréduction. En revanche, le site de liaison au cuivre des protéines chaperons ou transporteurs se caractérise par une affinité et un nombre de

coordination plus faibles (Rubino & Franz, 2012). Le tableau I (Zuily et al., 2023) résume les propriétés chimiques des deux formes de cuivre, Cu(I) et Cu(II).

Tableau I Propriétés clés de Cu (I) et Cu (II).

	Cu(I)	Cu(II)
Stabilité en milieu oxygéné	Instable, s'oxyde facilement	Stable
Stabilité dans l'eau	Insoluble et Instable, (disproportionation) Stabilisé par des ligands	Soluble et Stable
Nature acides et bases durs et mous (Pearson, 1968)	Acide mou (liaison avec bases molles)	Acide intermédiaire (liaison avec bases intermédiaires)
Ligands préférés	Thiolates (Cystéine) > Thioéthers (Méthionine) > Amines > Oxygène	Imidazole (Histidine), Amine > Oxygène
Géométrie préférée	Linéaire, trigonal, tétraédrique	Plan carré + ligands axiaux faibles
Nombre de coordination (Fu et al., 2014)	Faible nombre de coordination (2-4)	Nombre de coordination élevé (4-6)
Interaction avec thiols	Stabilisation par l'interaction avec les thiols	Réduction possible en Cu(I) par l'interaction avec les thiols

2. Le cuivre dans l'interaction hôte-pathogène

Dans le corps humain, le cuivre provient principalement de la nutrition. Il est absorbé au niveau du tractus intestinal mais ne reste jamais sous forme libre. Après son exportation des entérocytes vers le sang, il est immédiatement complexé par l'albumine et la transcupréine (alpha-2-macroglobulin), qui vont le transporter au foie pour qu'il soit complexé à la céruloplasmine. Le complexe cuivre-céruloplasmine est remis par la suite en circulation dans

le sang pour la distribution du cuivre aux tissus après reconnaissance du complexe par des récepteurs spécifiques (Linder, 2013).

La céruloplasmine représente le plus grand réservoir du cuivre dans le plasma (95%). C'est une ferroxidase qui permet d'oxyder le Fe(II) en Fe(III) grâce à la présence de six à huit atomes de cuivre, dont la moitié sont sous forme Cu(II) et l'autre moitié sous forme Cu(I) (Sharonov & Govorova, 1990). Elle est souvent utilisée comme biomarqueur pour évaluer le niveau du cuivre dans le corps et diagnostiquer des maladies liées à des troubles de métabolisme du cuivre (Reilly, 2008). En cas d'excès, le cuivre sera complexé également par la métallothionine, une protéine intracellulaire de faible poids moléculaire riche en cystéine, capable de complexer plusieurs métaux et présente dans presque tous les organes (Yang et al., 2024). Dans le sérum, il existe également une fraction du cuivre complexé à des acides aminés, principalement l'histidine, suivie de la glutamine, la thréonine, la cystéine et autres. Des complexes mixtes sont aussi retrouvés avec un ion de cuivre complexé par une histidine et un deuxième acide aminé. Il a été suggéré que ces complexes jouent un rôle dans le transport de cuivre (Mlakar et al., 2017; Neumann & Sass-Kortsak, 1967).

Le corps humain est un environnement très pauvre en métaux disponibles. Il s'agit d'une stratégie de défense de l'hôte pour empêcher l'infection par des pathogènes, qu'on appelle immunité nutritionnelle. Le fer par exemple est majoritairement lié à l'hème qui est à son tour complexé à l'hémoglobine dans les érythrocytes. En cas de lyse des érythrocytes, l'hème est rapidement complexé par des hémoprotéines, comme l'hémopexine. Le Fe(III) est aussi complexé par des protéines de l'hôte comme la transferrine et la lactoferrine.

De façon similaire, certaines protéines sécrétées par les cellules immunitaires ou d'autres cellules sont capables de complexer les métaux pour limiter leur disponibilité, notamment, la calgranuline C pour Zn(II) et Cu(II), la calprotectine pour Zn(II), Mn(II), Ni(II) et Fe(III), et la psoriasine pour Zn(II) (Hood & Skaar, 2012; Murdoch & Skaar, 2022). Un grand nombre de bactéries produisent des sidérophores pour acquérir le fer complexé par les protéines de l'hôte. En réponse à cela, l'hôte produit la lipocaline-2, qui séquestre certains complexes sidérophore-fer et limite ainsi leur accessibilité pour les pathogènes (Borregaard & Cowland, 2006).

Les bactéries intracellulaires subissent également une pression de carence en métaux. Le fer est complexé par une protéine de stockage appelée ferritine ou lié à des métalloprotéines, comme pour d'autres métaux. Pour les bactéries internalisées dans les phagosomes des macrophages, un transporteur appelé NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) situé à la membrane du phagosome réduit la disponibilité en Fe(III), Mn(II) et Mg(II) en les exportant vers le cytoplasme (Wessling-Resnick, 2015).

Les propriétés toxiques des métaux peuvent être également utilisées contre les microbes comme stratégie de défense par les cellules immunitaires. Le Cu et le Zn sont les exemples les plus connus. Ces deux métaux vont être pompés en excès dans le phagosome par des transporteurs spécifiques, ce qui cause des dégâts aux pathogènes phagocytés (Murdoch & Skaar, 2022; Sheldon & Skaar, 2019).

3. Essentialité et toxicité du cuivre chez les procaryotes

3.1. Essentialité : Cuproprotéome des procaryotes

Le cuproprotéome regroupe toutes les protéines dont l'activité biologique dépend du cuivre. Les transporteurs, les chaperons et les protéines de stockage du cuivre ne font pas partie du cuproprotéome. Comme l'oxygénation de l'atmosphère a augmenté la biodisponibilité du cuivre, la majorité du cuproprotéome des procaryotes est associée au métabolisme de l'O₂ (Ridge et al., 2008). Dans cette partie nous nous focaliserons sur certaines cuproprotéines, avec leur importance et le rôle du cuivre pour leur activité.

3.1.1. La superfamille des oxydases à hème-cuivre (HCO)

La chaîne respiratoire aérobie des bactéries se compose de plusieurs complexes numérotés de I à V. Le complexe I (NADH déshydrogénase) et le complexe II (succinate déshydrogénase) catalysent respectivement l'oxydation du NADH et du succinate en réduisant des quinones en quinols. Le complexe III (cytochrome bc₁) oxyde ensuite le quinol pour réduire un cytochrome c, tandis que le complexe IV (oxydase terminale) oxyde le cytochrome c réduit pour réduire l'O₂ en H₂O. Enfin, le complexe V (ATP synthase) produit de l'ATP en exploitant le gradient électrochimique généré entre le périplasme et le cytoplasme lors du transfert des électrons (Kaila & Wikström, 2021).

Chez les procaryotes, la chaîne respiratoire est dite "branchée" car elle peut utiliser différentes oxydases terminales selon les conditions de croissance. La majorité de ces oxydases appartiennent à la superfamille des oxydases à hème-cuivre (HCO). Cette superfamille se caractérise par la présence dans la sous-unité I (SU-I) d'un hème à bas spin et d'un site actif binucléaire constitué d'un hème à haut spin et d'un ion de cuivre, le centre Cu_B, au niveau duquel se fait la réduction de l'O₂ en H₂O.

Dans la superfamille des HCOs, les oxydases diffèrent selon le donneur d'électron, le nombre de sous-unités et les types d'hèmes. Les deux principaux donneurs d'électrons sont les quinols et les cytochromes c (Pereira et al., 2001). Les cytochrome c oxydases représentent les cuproprotéines les plus fréquemment utilisées par les procaryotes (Ridge et al., 2008). Elles ont la particularité d'avoir un deuxième site rédox actif au niveau de la sous-unité II (SU-II), le centre Cu_A, constitué de deux ions de cuivre. Le centre Cu_A permet de transférer les électrons du cytochrome c vers le Cu_B. Les quinol-oxydases possèdent seulement le site de la SU-I avec Cu_B (Iwata et al., 1995; Pereira et al., 2001).

3.1.2. Les oxydases à multi-cuivres

Les oxydases à multi-cuivres sont des cuproprotéines qui partagent avec les HCOs la capacité de réduire l'O₂ en H₂O en oxydant une variété de substrats. Elles se caractérisent par un centre actif constitué de quatre cuivres organisés en trois sites. Le site cuivre de type 1 (T1) est impliqué dans le transfert d'électrons après l'oxydation du substrat. Les sites T2 et T3 sont associés et forment un cluster trinucéaire au niveau duquel se fait la réduction de l'O₂ en H₂O (Banci et al., 2002; Quintanar et al., 2007). En fonction du type de substrat donneur d'électron, on distingue trois sous-familles : les laccases, les métallo-oxydases et les ascorbate-oxydases. La dernière sous-famille est uniquement présente chez les champignons et les plantes (Hoegger et al., 2006).

Les laccases se trouvent chez les champignons et les plantes, mais aussi chez les bactéries. Elles ont beaucoup d'applications environnementales et industrielles car elles catalysent l'oxydation de différents composés dans une large gamme de pHs et de températures (Guan et al., 2018). En ce qui concerne les métallo-oxydases, elles utilisent un métal divalent comme donneur d'électron, un exemple très connu chez les mammifères est

la céruloplasmine, une ferroxidase (Zaitseva et al., 1996). Chez les bactéries Gram-négatives, l'oxydase à multi-cuivres périplasmique CueO se caractérise par la présence d'une région riche en méthionines qui assure la spécificité pour le Cu(I) et facilite son accès au site T1. Elle est connue pour être impliquée dans la défense contre l'excès du cuivre en catalysant l'oxydation directe du Cu(I) en Cu(II) moins toxique (Grass & Rensing, 2001).

3.1.3. Les amine-oxydases à cuivre

Les amine-oxydases à cuivre sont des enzymes retrouvées chez plusieurs organismes aérobies incluant les procaryotes. Chez ces derniers, elles sont localisées dans le périplasma, sous forme d'homodimères avec un site actif très conservé. Dans chaque sous-unité on trouve un atome de Cu(II) et une tyrosine conservée, qui en présence d'O₂ subit des modifications post-traductionnelles pour former le topaquinone (TPQ), un cofacteur organique. Ce sont des enzymes qui catalysent la désamination oxydative de diverses amines aliphatiques primaires. Le mécanisme se déroule en deux phases : une phase réductive où l'amine est convertie en aldéhyde en réduisant le cofacteur TPQ, et une phase oxydative où le Cu(II) médie le transfert d'électrons du TPQ réduit vers l'O₂, conduisant à la production d'H₂O₂, d'ammoniac et à la régénération du TPQ oxydé (Gaule et al., 2018; Halcrow et al., 2000; Wilmot, 2003).

3.1.4. Les superoxydes dismutases à cuivre-zinc

Les superoxydes dismutases à cuivre-zinc (Cu,Zn-SODs) sont des métalloenzymes largement répandues chez les procaryotes, solubles dans le périplasma ou associées à la membrane. Elles jouent un rôle essentiel dans la défense contre le stress oxydant causé par des anions superoxyde (O₂⁻), générés au niveau périplasmique par la chaîne respiratoire ou provenant de l'environnement extracellulaire après diffusion à travers les porines (S. Korshunov & Imlay, 2006). Les anions superoxyde ne peuvent pas traverser la membrane cytoplasmique (Korshunov & Imlay, 2002), et c'est pour cette raison que les Cu,Zn-SODs périplasmiques ne protègent pas contre le stress oxydant généré dans le cytoplasme. Ainsi, la plupart des bactéries possèdent, en complément, une superoxyde dismutase à manganèse ou à fer localisée dans le cytoplasme, sans redondance fonctionnelle entre ces deux types de SODs (Battistoni, 2003; Gort et al., 1999). Les Cu,Zn-SODs sont des homodimères, dont chaque sous-unité possède un site actif conservé composé d'un atome de cuivre et d'un atome de zinc.

L'enzyme catalyse la dismutation de l' O_2^- en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. D'abord, le Cu(II) est réduit par l' O_2^- , générant une molécule d'oxygène, et ensuite un autre anion superoxyde réagit avec le Cu(I) en présence de protons pour former du peroxyde d'hydrogène, tout en régénérant l'état oxydé du cuivre. Le zinc joue un rôle crucial dans la stabilisation structurale du site actif et l'orientation correcte du substrat (Bannister et al., 1987; Desideri & Falconi, 2003).

3.2. Toxicité du cuivre

Le cuivre est un élément clé dans différents processus biologiques, cependant ses propriétés chimiques le rendent très toxique en excès. De ce fait, il a été utilisé depuis longtemps comme agent antimicrobien dans différents domaines (Ramos-Zúñiga et al., 2023). Cette toxicité n'est pas corrélée à la quantité du cuivre, mais à sa biodisponibilité pour les organismes vivants, ainsi qu'à sa forme. En effet, la réactivité chimique du cuivre est modulée par son environnement de coordination dans un complexe avec un ligand (Zuily et al., 2023). Dans cette partie, les principaux mécanismes de toxicité du cuivre seront abordés. Ces mécanismes sont résumés dans la Figure 1.

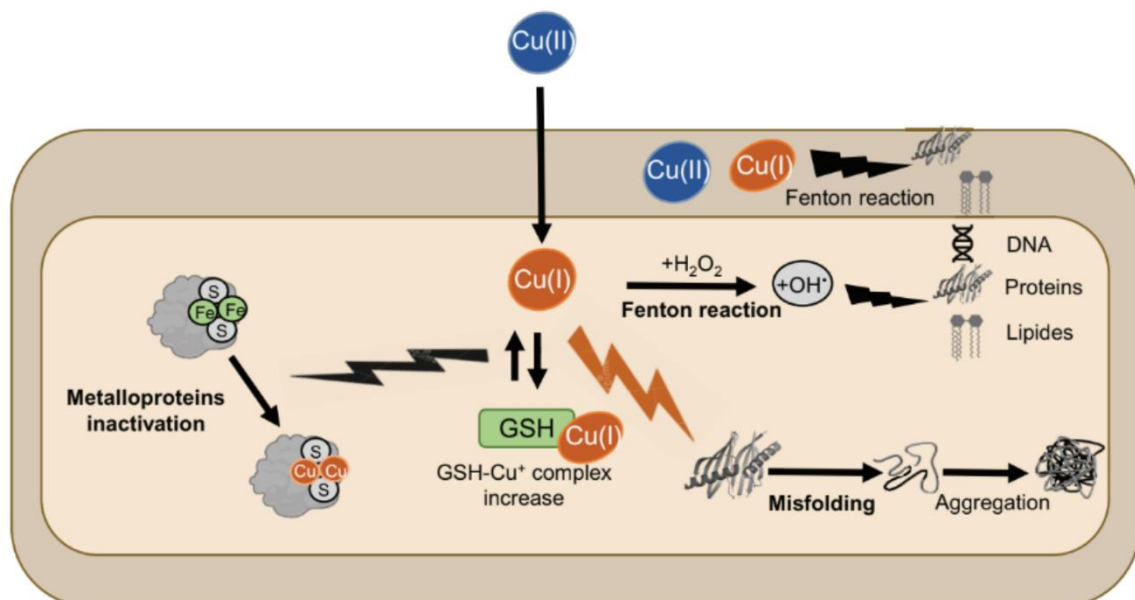


Figure 1. Mécanismes de toxicité du cuivre intracellulaire. Le cuivre en conditions aérobies est présent sous forme Cu(I) ou Cu(II) dans le périplasme, mais le Cu(II) est rapidement réduit en Cu(I) dans le cytoplasme. Le Cu(I) peut générer des radicaux hydroxyles toxiques, altérer directement les protéines ou perturber les sites des métaux dans les métalloprotéines. Le cuivre lié au glutathion peut aussi perturber l'assemblage des métalloprotéines (Zuily et al., 2023).

3.2.1. Toxicité liée au stress oxydant

En conditions aérobies, le cuivre peut se retrouver dans le périplasma sous forme de Cu(I) ou Cu(II), et dans l'environnement réducteur du cytoplasme sous forme de Cu(I). Dans les deux compartiments, le Cu(I) peut catalyser la réaction de Fenton conduisant à la formation des radicaux hydroxyles réactifs à partir du peroxyde d'hydrogène (Halliwell & Gutteridge, 1984). Les radicaux hydroxyles peuvent ensuite participer à la réaction d'Haber-Weiss, conduisant à la production d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment l'O₂⁻ (anion superoxyde) (Solioz, 2019).

Le cuivre peut contribuer indirectement au stress oxydant. En oxydant le glutathion (GSH), il épuise le pool de GSH réduit, ce qui cause une diminution de la régénération des protéines impliquées dans la résistance au stress oxydant comme la glutarédoxine (Cabiscol et al., 2000). Cela conduit également à une stabilisation de la forme Cu(I) sous forme de complexes GS - Cu(I) - SG (Solioz, 2018). Le Cu(I) peut détruire les clusters Fer-soufre (Fe-S), causant la libération du fer dans le milieu, ce qui va générer davantage de ROS par la réaction de Fenton. Les ROS générés vont causer des dégâts irréversibles sur différents constituants cellulaires, ADN, protéines et lipides (Dupont et al., 2011; Zuily et al., 2023).

3.2.2. Toxicité indépendante du stress oxydant

Pendant longtemps, la toxicité du cuivre était considérée comme principalement liée à la production des ROS. Cependant, la sensibilité des bactéries au cuivre en conditions anaérobies et l'absence de réponse cellulaire antioxydante ont suggéré qu'il existe d'autres mécanismes de toxicité qui sont indépendants du stress oxydant.

Il a été montré que la cause primaire de la toxicité du cuivre *in vivo* est sa capacité à causer la mismétallation d'enzymes essentielles, particulièrement celles à cluster Fe-S. Ce mécanisme est indépendant de l'oxygénation du milieu. Le Cu(I) est capable de déplacer les atomes de fer dans les clusters Fe-S en coordonnant leurs ligands thiolates grâce à sa forte affinité (Macomber & Imlay, 2009). De plus, le cuivre peut se lier à des atomes d'azote, de soufre et d'oxygène dans les protéines, ce qui cause différents dégâts. Dans le cytoplasme, lorsqu'il est à forte concentration, le Cu(I) peut former des interactions avec les cystéines et les histidines

des protéines, causant leur agrégation et la perte de leur fonction (Zuily et al., 2022). Grâce à sa thiophilicité, le Cu(I) peut catalyser la formation de ponts disulfures en se liant à des cystéines (Hiniker et al., 2005), ce qui peut affecter la biogénèse de protéines importantes pour le métabolisme cellulaire.

4. Homéostasie du cuivre chez les bactéries Gram-négatives

L'excès de cuivre étant toxique, sa concentration intracellulaire doit être strictement contrôlée. Les bactéries ont mis en œuvre différentes stratégies pour prévenir l'accumulation du cuivre et contrôler son homéostasie, incluant des protéines de régulation transcriptionnelle, des systèmes d'exportation ou encore des métallo-chaperons et des petites molécules de stockage. Dans cette partie, nous détaillerons quelques systèmes décrits chez *Escherichia coli* et qui sont résumés dans la Figure 2.

L'augmentation de la concentration de cuivre dans le périplasma active un système de régulation à deux composants, CusSR, où le senseur kinase CusS détecte le cuivre périplasmique et active le régulateur transcriptionnel CusR par phosphorylation (Rademacher & Masepohl, 2012). CusR phosphorylé va activer l'expression de CusABC, membre de la famille RND (Resistance Nodulation cell Division), qui exporte le cuivre vers l'extérieur. Ce cuivre est récupéré directement du périplasma ou délivré par CusF, une protéine chaperon périplasmique. Le système CusABC permettrait également d'exporter le Cu(I) directement du cytoplasme vers l'environnement extracellulaire. Il fonctionne en utilisant l'énergie proton-motrice provenant de la membrane interne (Kim et al., 2011; Solioz, 2019).

En présence d'un excès de cuivre cytoplasmique, un deuxième régulateur transcriptionnel s'active, le régulateur CueR (Rademacher & Masepohl, 2012). Une fois lié au cuivre, CueR va activer l'expression de CopA, une ATPase du type P1B-1 de la membrane interne. CopA reçoit le Cu(I) délivré par CopZ, une protéine chaperon cytosolique, et l'exporte vers le périplasma. L'expression du CueO va également être activée. En présence d'oxygène cette oxydase à multi-cuivre périplasmique catalyse l'oxydation du Cu(I) en Cu(II) moins toxique (Grass & Rensing, 2001; Solioz, 2019).

Un autre moyen de prévenir la toxicité causée par un excès de cuivre est d'utiliser des protéines de stockage, rôle qui peut aussi être rempli par certains chaperons (Rivera-Millot et

al., 2021). Certaines bactéries Gram-négatives, notamment les méthanotrophes, expriment des protéines Csp (Copper storage protein) localisées dans le périplasma ou dans le cytosol. Ces protéines tétramériques présentent un grand nombre de résidus cystéine orientés vers le centre de leurs monomères et peuvent lier jusqu'à 80 atomes de cuivre (Vita et al., 2015, 2016).

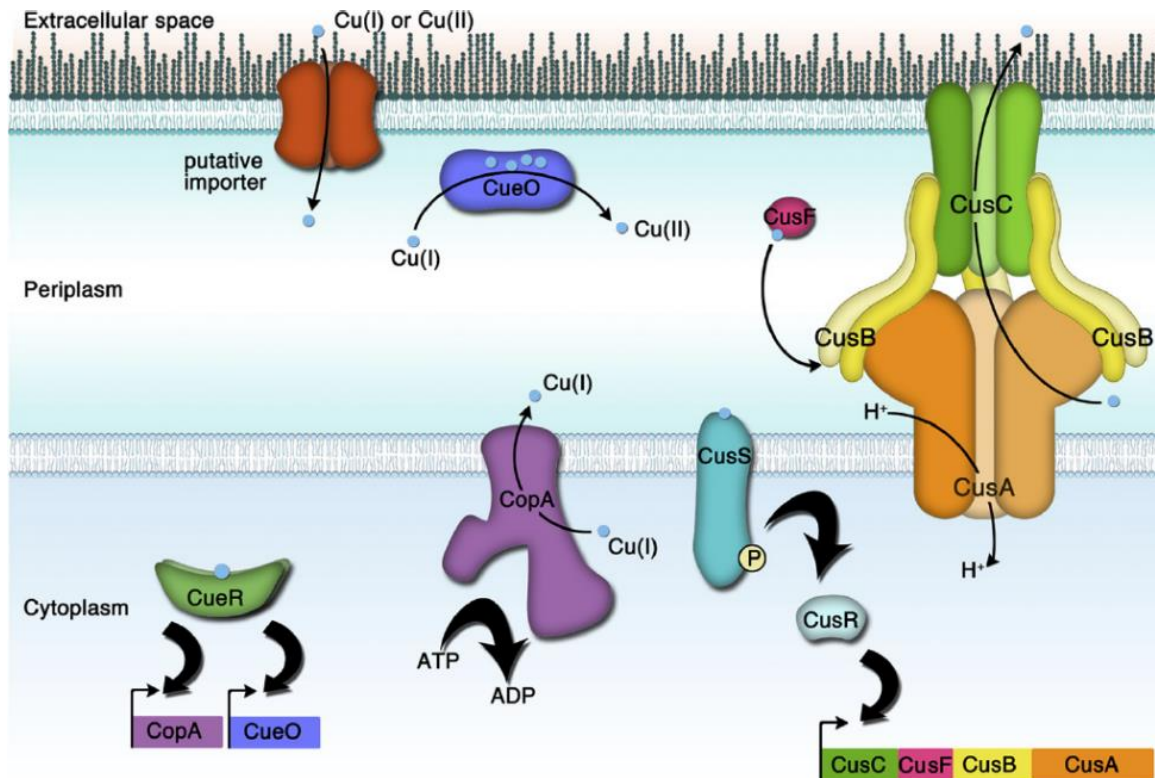


Figure 2. Schéma des systèmes participant à l'homéostasie du cuivre chez *E. coli*. Le cuivre entre dans le périplasma par un transporteur inconnu. CusS détecte le cuivre périplasmique, active CusR, qui induit l'expression de *cusABC*. CueR détecte le cuivre cytoplasmique et régule l'expression de *copA* et *cueO* (Kim et al., 2011).

Chapitre II : Importation des métaux chez les bactéries Gram-négatives

1. Transport non spécifique par les porines à travers la membrane externe

La membrane externe contient diverses protéines impliquées dans le transport de nutriments, parmi lesquelles les porines représentent une fraction significative. Les porines classiques facilitent la diffusion non spécifique de divers substrats de petite taille, généralement inférieure à 600 Da (Nikaido, 2003). Elles sont structurées en tonneau β et souvent organisées en trimères pour une stabilité supplémentaire. Elles ont une forme en sablier avec une région de constriction d'environ 5,5 à 6 Å de diamètre, formée par une boucle extracellulaire repliée vers l'intérieur (Fig. 3). Cette région de constriction est caractérisée par un champ électrique résultant de la proximité de résidus chargés positivement et négativement. Ce champ oriente les molécules d'eau à l'intérieur du canal, défavorise la pénétration des composés hydrophobes, et contribue à une certaine sélectivité en facilitant l'entrée des petites molécules polaires. Les porines donc sont en partie sélectives et permettent le passage de certains composés beaucoup plus facilement que d'autres, selon leur forme, leur charge et leur taille (Vergalli et al., 2020).

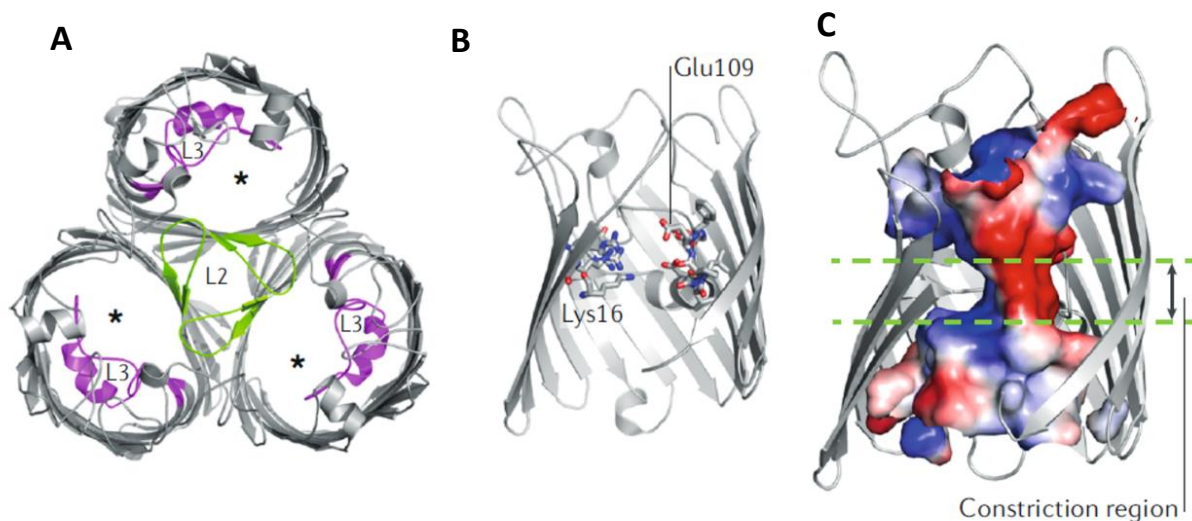


Figure 3. Aspects structurels d'OmpC, une porine d'*E. coli* (PDB ID 2J1N). A : Vue extracellulaire du trimère OmpC. B : vue latérale d'un monomère, avec les résidus de la région de constriction. C, coupe transversale à travers OmpC montrant la forme interne en forme de sablier coloré par le potentiel électrostatique (rouge : résidus chargés négativement, bleu : résidus chargés positivement). (adapté de (Vergalli et al., 2020))

Les porines participent à l'importation de faible affinité des métaux chez les bactéries Gram-négatives, surtout dans des conditions de forte concentration en métaux où les systèmes de transport spécifiques sont réprimés. Cela a été décrit chez *E. coli* où les porines OmpA et OmpC jouent un rôle dans l'acquisition du fer à partir de la transferrine (Sandrini et al., 2013). OmpF chez *E. coli* serait aussi impliquée dans l'acquisition du cuivre puisque sa délétion confère une certaine résistance au cuivre (Lutkenhaus, 1977).

Chez *Mycobacterium smegmatis* également, il a été montré qu'en présence d'un excès de citrate ferrique, les besoins en fer des cellules sont satisfaits par diffusion à travers les porines, notamment MspA, MspC et MspD. En effet, des mutants dépourvus des porines MspA ou MspC présentent un fort défaut de croissance en carence en cuivre et une tolérance significative au cuivre lorsqu'ils sont cultivés avec des concentrations élevées. L'expression hétérologue de MspA chez *M. tuberculosis* a donné des résultats similaires (Haeili et al., 2015; Speer et al., 2013). Cependant chez *M. smegmatis* la quantité de citrate intracellulaire ne change pas, suggérant que le fer se dissocie du citrate au niveau de la membrane externe (Jones & Niederweis, 2010).

2. Transport spécifique à travers la membrane externe par les transporteurs TonB-dépendants

2.1. Structure des transporteurs TonB-dépendants et mode de fonctionnement

Les nutriments de plus grande taille présents en faible concentration dans l'environnement bactérien sont incapables de passer par diffusion passive à travers les porines. Leur importation requiert des transporteurs spécifiques qui utilisent de l'énergie. Dans la membrane externe, les transporteurs TonB-dépendants (TBDTs) assurent cette fonction. Ces transporteurs ont une structure assez conservée (Fig. 4), avec un tonneau β transmembranaire à 22 brins et un domaine globulaire appelé "plug" du côté N-terminal de la protéine et qui bouche le tonneau (Noinaj et al., 2010). Le site de liaison du ligand dans les TBDTs définit leur spécificité. Il est généralement situé à côté du domaine plug et peut être formé par des résidus de la paroi du tonneau, des boucles extracellulaires et du domaine plug (Noinaj et al., 2010).

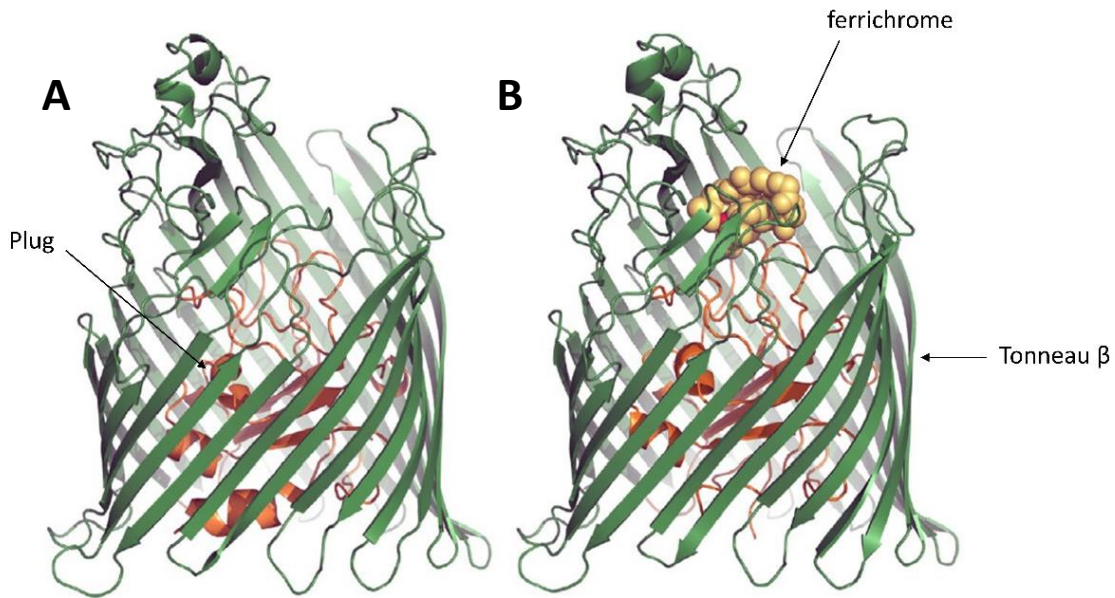


Figure 4. Structure cristalline de la protéine FhuA d'*E. coli* (PDB ID 1FCP). A : non ligandée, B : ligandée avec du ferrichrome (jaune avec l'ion ferrique en rouge) (Braun, 2024).

Une séquence appelée “TonB-Box” précède le domaine plug. Cette séquence est souvent séquestrée à l’intérieur du TBDT du côté périplasmique, mais la fixation du ligand dans le tonneau induit un changement de conformation qui l’expose vers le périplasm. Ce changement de conformation est léger, puisque les différences de structure entre un TBDT sous forme apo et un TBDT lié à son ligand sont généralement minimales (Silale & van den Berg, 2023). Dans le TBDT FhuA, lors de la liaison du complexe ferrichrome-fer, une hélice située entre la TonB-Box et le plug se déplie, ce qui expose la TonB-box (Ferguson et al., 1998). Dans le TBDT BtuB, un pont salin reliant l'extrémité N-terminale du domaine plug à la surface interne du tonneau β est rompu lors de la liaison à la vitamine B12, ce qui entraîne l’exposition de la TonB-Box (Zmyslowski et al., 2022).

Cette étape est très importante pour le transport, car une fois libérée, la TonB-Box peut entrer en contact physique avec la protéine TonB. TonB est une protéine d’environ 26 kDa, située dans la membrane cytoplasmique, avec un seul domaine transmembranaire hélicoïdal et un domaine C-terminal soluble situé dans le périplasm. Par son domaine transmembranaire, elle interagit avec le complexe ExbBD situé dans la membrane interne. ExbB est une protéine de

26 kDa qui possède 3 domaines transmembranaires et un domaine soluble cytoplasmique. ExbD est une protéine de 17 kDa avec un domaine transmembranaire N-terminal hélicoïdal ancré dans la membrane cytoplasmique et un domaine C-terminal soluble situé dans le périplasme (Krewulak & Vogel, 2011). TonB, ExbB et ExbD s'assemblent pour former un large oligomère dans la membrane plasmique composé d'une à deux copies de TonB, cinq copies d'ExbB et deux d'ExbD (Celia et al., 2020). Ce complexe utilise le gradient de protons à travers la membrane interne pour générer de l'énergie (Fig. 5). Cette énergie est ensuite transmise grâce à TonB au TBDT de la membrane externe, permettant l'entrée du ligand dans le périplasme (Celia et al., 2020; Noinaj et al., 2010).

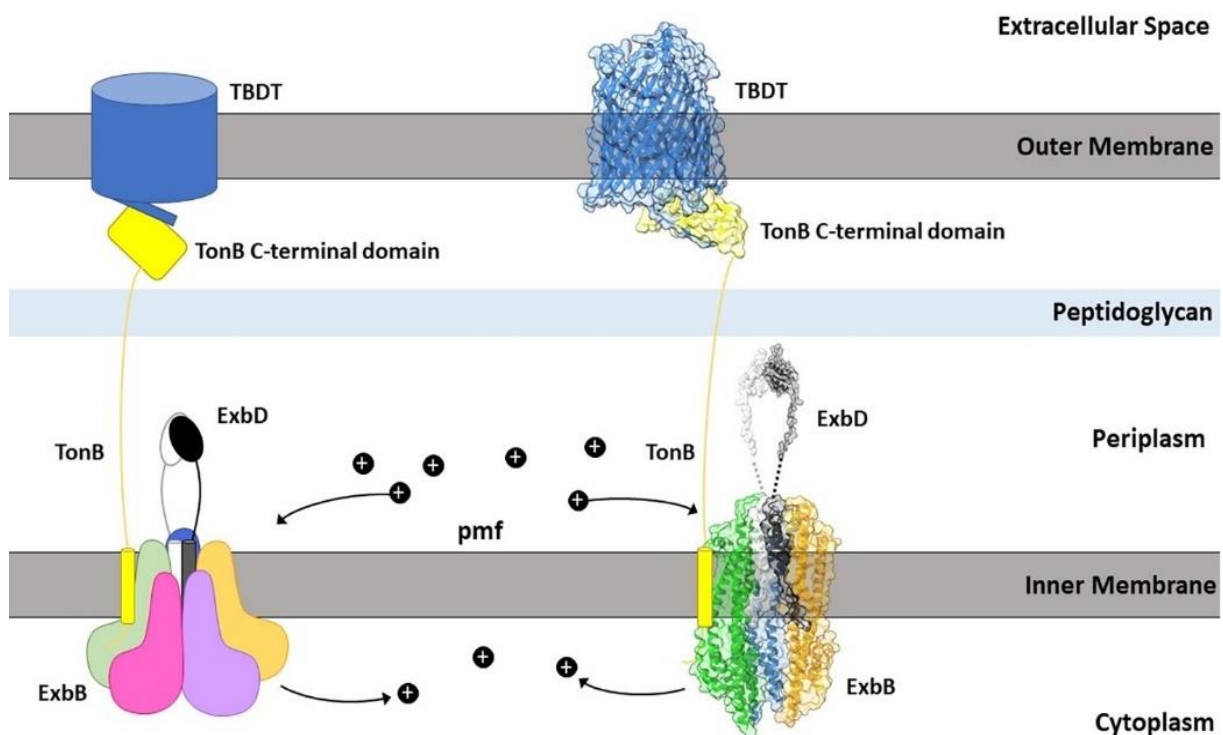


Figure 5. Représentation structurale d'un TBDT en interaction avec le complexe TonB-ExbB-ExbD (Braun et al., 2023).

Le mécanisme exact de la transduction d'énergie et d'interaction avec le TBDT n'est pas encore bien compris. Un modèle propose un mouvement de rotation du complexe ExbBD qui entraîne également la rotation de TonB. Par force de traction, TonB va tirer la TonB-box

causant un changement de conformation du domaine plug, ce qui ouvre un canal dans le TBDT et favorise l'importation du ligand (Ratliff et al., 2022).

Il a été suggéré que lors du transport de l'entérobactine ferrique via FepA, le domaine plug sort complètement du tonneau β (Ma et al., 2007). Cependant, d'autres études privilégient un modèle où une partie du plug subit des changements conformationnels, notamment en se dépliant partiellement pour ouvrir un canal de translocation du substrat, tandis que le reste du plug reste à l'intérieur du tonneau (Hickman et al., 2017; Udho et al., 2012).

Les TBDTs n'ont jamais été isolés à l'état ouvert, cela suggère que cet état est de courte durée. Il est probable qu'une fois le substrat dans le périplasme, le plug reprenne assez rapidement sa forme initiale dans le centre du tonneau pour empêcher le transport non spécifique d'autres molécules (Flores Jiménez & Cafiso, 2012; Silale & van den Berg, 2023). Pourtant, il a été suggéré que le transport par les TBDTs est lent: pour FhuA il est estimé à 4 molécules de ferrichrome par minute, 5-6 molécules d'entérobactine ferrique par minute pour FepA, et 0.2-0.9 molécules de vitamine B12 par minute pour BtuB (Silale & van den Berg, 2023).

2.2. Diversité fonctionnelle des transporteurs TonB-dépendants

Les TBDTs présentent une structure tridimensionnelle globalement conservée, mais les membres de cette famille ont une faible homologie de séquence qui témoigne de leur grande diversité (Tang et al., 2012).

Initialement, les TBDTs étaient principalement associés au transport de fer complexé à des sidérophores. Cependant il devient de plus en plus clair qu'ils sont capables de reconnaître et de transporter une large gamme de substrats chimiquement variés, allant des ions métalliques libres comme Cu(II) et Zn(II) aux vitamines, sucres, et autres substrats (Schauer et al., 2008).

Le tableau II illustre cette diversité en présentant des exemples de TBDTs avec le substrat correspondant.

Tableau II Diversité fonctionnelle des TBDTs chez les bactéries à Gram négatif

	Nom du TBDT	Ligand(s)	Espèce bactérienne	Référence
Transporteurs de composés organiques (Sucres, vitamines, peptides)	MalA	Maltodextrines / Maltose	<i>Caulobacter crescentus</i>	(Neugebauer et al., 2005)
	NagA	Oligosaccharides de chitine	<i>Caulobacter crescentus</i>	(Eisenbeis et al., 2008)
	SuxA	Sucrose	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	(Blanvillain et al., 2007)
	RagA	Produits de dégradation des protéines	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	(Hall et al., 2005)
	SusC	Glucides complexes	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	(Cho & Salyers, 2001)
	BF0615	Thiamine (Vitamine B1)	<i>Bacteroides fragilis</i>	(Rodionov et al., 2002)
	BtuB	Vitamine B12	<i>Escherichia coli</i>	(Kadner, 1990)
Transporteurs de métaux non ferreux	NosA	Cuivre	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Lee et al., 1991)
	OprC	Cuivre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Bhamidimarri et al., 2021)
	FrpB4	Nickel	<i>Helicobacter pylori</i>	(Schauer et al., 2007)
	Daro_1684	Cobalt	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	(Rodionov et al., 2006)
	ZnuD	Zinc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Pederick et al., 2015)
	CntO	Zinc - pseudopaline)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Lhospice et al., 2017)
Transporteurs de fer/hème à partir de produits de l'hôte	HasR	Hème -hémophile (HasA)	<i>Serratia marcescens</i>	(Cescau et al., 2007)
	ShuA	Hème- Hémoglobine	<i>Shigella dysenteriae</i>	(Cobessi et al., 2010)
	TbpA	Fe-Transferrine	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	(Kenney & Cornelissen, 2002)
	LbpA	Fe-Lactoferrine	<i>Neisseria meningitidis</i>	(Beddek & Schryvers, 2010)
Transporteurs de Fe(III) complexé à des sidérophores	FhuA	Fe-Ferrichrome	<i>Escherichia coli</i>	(Pawelek et al., 2006)
	FepA	Fe-Enterobactin	<i>Escherichia coli</i>	(Devanathan & Postle, 2007)
	FauA	Fe-Alcaligine	<i>Bordetella pertussis</i>	(Brickman & Armstrong, 1999)
	FecA	Fe-Dicitrate	<i>Escherichia coli</i>	(Yue et al., 2003)

2.3. Régulation de synthèse des transporteurs TonB-dépendants

Les bactéries régulent finement l'expression des TBDTs, pour qu'ils ne soient produits que lorsque c'est nécessaire et que leur ligand spécifique est présent, car ces transporteurs peuvent aussi servir de porte d'entrée à des toxines (Cascales et al., 2007; Prem Suriya et al., 2023).

Pour les TBDTs à fer, le principal système est le régulateur Fur. Ce régulateur transcriptionnel agit comme un répresseur en présence de son cofacteur, le Fe(II). Sous forme apo dans le cytoplasme, Fur peut se présenter en tétramère (chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, etc.) ou en dimère (chez *E. coli*, *Yersinia pestis*, etc.) (Pérard et al., 2016). Le Fe(II) en excès se lie à Fur, et ce complexe se fixe à des séquences d'ADN appelées Fur boxes, réprimant alors l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition ou le stockage du fer. En cas de carence, apo Fur se détache de ses promoteurs cibles, ce qui permet la transcription des gènes correspondants (Hassan & Troxell, 2013). Des homologues de Fur régulent également l'acquisition d'autres métaux, comme Zur pour le zinc et Mur pour le manganèse (Bellini & Hemmings, 2006; Gaballa & Helmann, 1998).

Un autre système bien décrit est le système des facteurs sigma de fonction extracytoplasmique, ECF (Extracytoplasmic Function). Un facteur sigma ECF est activé spécifiquement lorsque le complexe sidérophore-métal interagit avec le TBDT qu'il régule à la surface bactérienne. Ce signal est transmis à la protéine anti-sigma localisée dans la membrane interne via un domaine de signalisation du côté N-terminal du TBDT, provoquant la libération du facteur sigma séquestré et déclenchant la transcription des gènes d'acquisition. C'est le cas, par exemple, des TBDTs FecA (transporteur du Fe-dicitrate chez *E. coli*), FpvA (transporteur de Fe-pyoverdine chez *P. aeruginosa*) et BhuR (transporteur d'hème chez *Bordetella pertussis*) (Braun et al., 2022; Brickman et al., 2007; Visca et al., 2002).

Certains TBDTs comme FepA (transporteur du Fe-entérobactine) ou PirA (transporteur du fer complexé à des catéchols) sont régulés par des systèmes à deux composants. Une kinase membranaire reconnaît le complexe métal-sidérophore dans le périplasme après son importation, s'autophosphoryle, puis active un régulateur cytoplasmique par phosphorylation, déclenchant ainsi l'expression des gènes d'acquisition (Dean & Poole, 1993; Luscher et al., 2022; Schalk & Perraud, 2023).

D'autres régulations se font via des régulateurs transcriptionnels cytoplasmiques comme ceux de la famille AraC. Ici, après son transport jusqu'au cytoplasme le sidérophore interagit avec le régulateur, qui active la transcription des gènes d'acquisition. C'est le cas de FauA, transporteur du complexe fer-alcaldine chez *B. pertussis* (Brickman et al., 2001, 2007).

La traduction peut aussi être contrôlée par des riboswitches, comme pour BtuB, TBDT de la vitamine B12. En présence d'adénosylcobalamine (un métabolite de la B12), ce composé interagit avec la région 5' de l'ARNm de *btuB*, provoquant un changement de structure qui empêche la liaison du ribosome et bloque l'initiation de la traduction (Nahvi et al., 2002; Nou & Kadner, 2000).

Enfin, des régulations post-transcriptionnelles peuvent impliquer des petits ARN (sRNA), qui s'apparient à l'ARNm ciblé pour en moduler la traduction. Par exemple, OmrA et OmrB régulent négativement la production des TBDTs CirA (impliqué dans le transport de Zn(II)), FecA et FepA (Fröhlich & Gottesman, 2018; Guillier & Gottesman, 2008).

Un système de régulation post-transcriptionnelle a récemment été caractérisé chez *B. pertussis*. Il s'agit d'un mécanisme impliquant *cruR*, une petite phase de lecture ouverte, également appelée uORF (upstream Open Reading Frame). La protéine CruR appartient à la famille DUF2946 et est codée par le premier gène d'un opéron comprenant également deux autres gènes : *bfrG*, codant un transporteur TonB-dépendant (TBDT) encore non caractérisé, et *bp2921*, codant une protéine de la membrane interne appartenant à la famille PepSY-TM. Ces deux dernières protéines font l'objet de ma thèse. CruR régule spécifiquement l'expression de *bfrG* et *bp2921* en réponse à la disponibilité du cuivre. La protéine CruR se distingue par la présence de deux motifs conservés : CXXC, un site de fixation du cuivre, et RAPP, un site d'arrêt induisant une pause du ribosome.

Le modèle de ce système est le suivant. En condition de carence en cuivre, après transcription de *cruR*, l'ARN polymérase ferait une pause dans la région intergénique entre *cruR* et *bfrG*. Le ribosome traduisant CruR serait arrêté temporairement au motif RAPP. Cette pause empêcherait l'exposition d'un site de fixation (rut) du facteur de terminaison Rho sur l'ARNm. L'absence de fixation de Rho permettrait ainsi la poursuite de la transcription des gènes *bfrG* et *bp2921*.

À l'inverse, en condition d'excès de cuivre, ce dernier se fixerait au motif CXXC de CruR en cours de traduction, provoquant un changement de conformation qui empêcherait l'arrêt du

ribosome sur le motif RAPP, exposant le site *rut*. Rho pourrait alors s’y fixer, entraînant la terminaison de la transcription de *bfrG* et *bp2921* (Fig. 6) (Roy et al., 2022).

Une régulation post-transcriptionnelle par le cuivre impliquant des uORFs de la famille DUF2946 semble conservée chez de nombreuses protéobactéries (Öztürk et al., 2023). Un homologue de CruR a notamment été identifié chez *P. aeruginosa*, dans un opéron codant pour OprC, un TBDT spécifique du cuivre (Bhamidimarri et al., 2021; Roy et al., 2022).

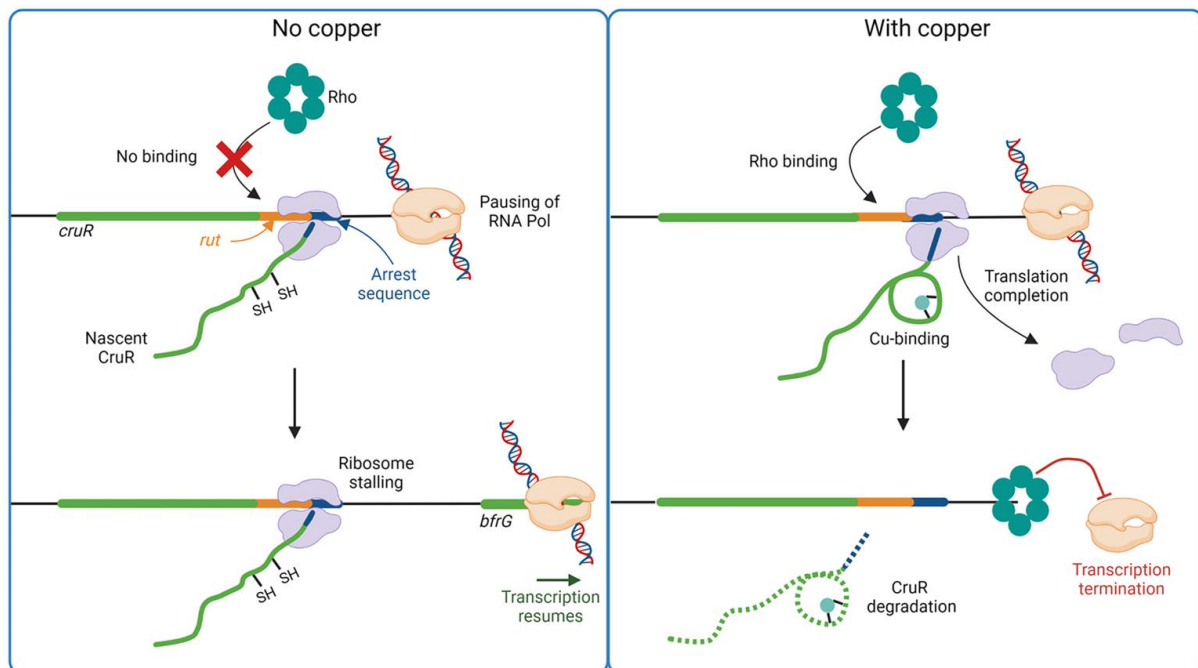


Figure 6. Modèle de régulation de *bfrG* par l’uORF *cruR*. CruR module la transcription en réponse au cuivre via un mécanisme dépendant de Rho (Roy et al., 2022).

2.4. Transport des métaux sous forme libre

Les métaux de transition sont rarement trouvés sous forme libre chez l’hôte. Cette stratégie de défense est connue sous le nom d’immunité nutritionnelle. Cependant, certains TBDTs transportent des métaux non liés.

ZnuD est le premier TBDT à zinc, caractérisé chez *Neisseria meningitidis*. Sa structure cristallographique montre un ion de zinc dans un site de haute affinité constitué de quatre résidus conservés provenant d’une boucle du domaine plug et d’une boucle extracellulaire. Aucun métallophore n’a été retrouvé dans le site de liaison, ce qui suggère que le transporteur

transporte le zinc libre, cela n'exclut pas la possibilité qu'il récupère le zinc qui était lié à un métallophore (Calmettes et al., 2015). Deux sites de liaison périphériques de faible affinité au niveau des boucles extracellulaires ont été identifiés par co-cristallisation avec du cadmium. Ces sites dirigent le zinc vers le site de haute affinité enfoui dans la cavité puis vers un site du côté périplasmique du transporteur (Fig. 7A,B) (Calmettes et al., 2015).

Chez *P. aeruginosa*, le transporteur OprC permet l'acquisition directe de cuivre ionique libre, à la fois sous forme Cu(I) et Cu(II). OprC est le premier exemple connu de TBDT capable d'importer du cuivre libre. Ce transporteur sera présenté plus en détails dans la partie transporteurs de cuivre (Bhamidimarri et al., 2021).

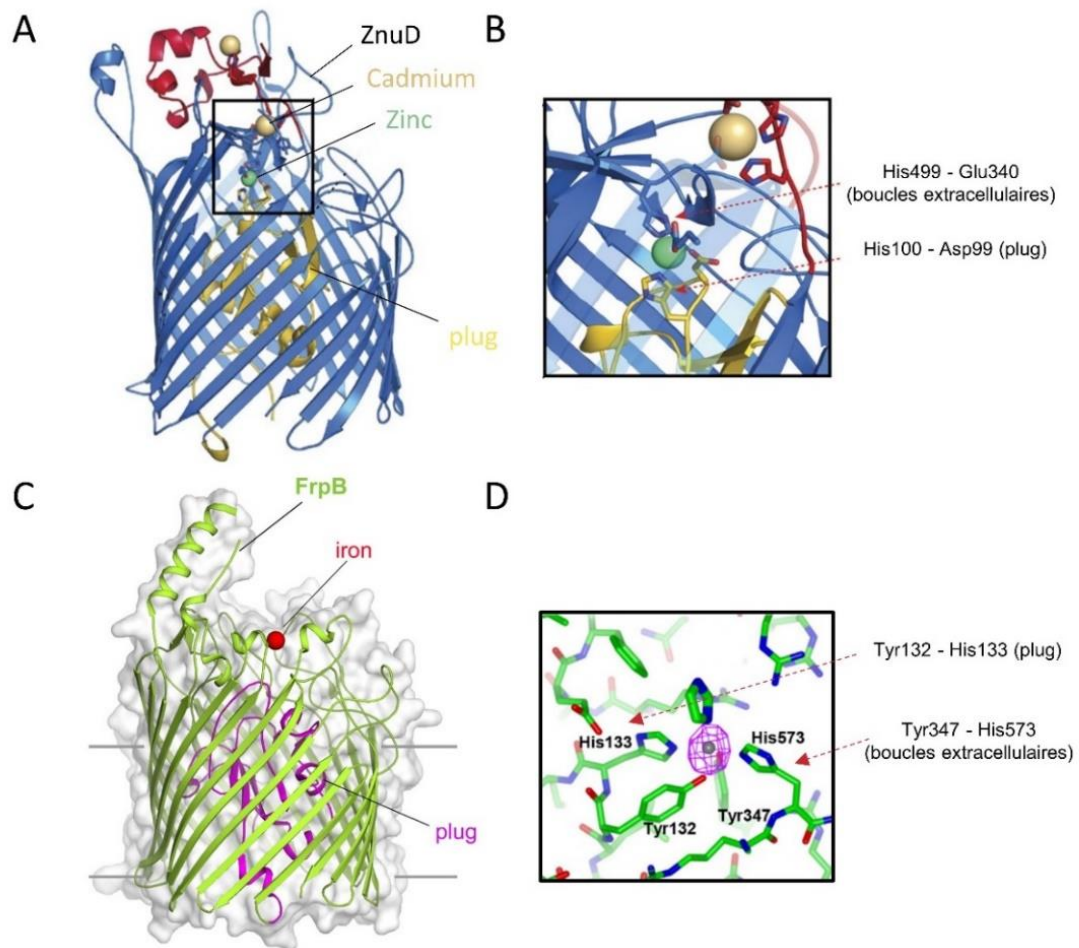


Figure 7. Exemples de TBDTs transportant des métaux sous forme libre. (A, C) structure des TBDTs ZnuD (PDB ID 4RDR) et FrpB (PDB ID 4AIQ) et mode de reconnaissance du Zn(II) et du Fe(III) respectivement. (B, D) détails des sites de fixation du Zn(II) et du Fe(III) (Calmettes et al., 2015 ; Saleem et al., 2013 ; Yadav et al., 2019).

Chez *Neisseria meningitidis*, le TBDT FrpB (ou FetA) lie avec une forte affinité et importe le Fe(III) libre. La structure cristalline a révélé un ion Fe(III) lié à un site de fixation spécifique formé de deux résidus du plug et deux résidus des boucles extracellulaires (Fig. 7C, D). Des analyses EPR ont confirmé la liaison du Fe(III) à FrpB au niveau d'un site avec les mêmes caractéristiques (Saleem et al., 2013). Cependant il a été montré que l'orthologue de FrpB chez *N. gonorrhoeae* peut transporter le Fe(III) lié à différents sidérophores de la famille des catécholates : l'entérobactine, la salmochelin et la dihydroxybenzoylsérine. Cela suggère que ce transporteur présente une large spécificité et peut prendre en charge une gamme variée de substrats (Hollander et al., 2011).

2.5. Transport des métaux après extraction à partir de protéines de l'hôte

Les métaux sont également transportés sous forme libre par les TBDTs après leur extraction de protéines de l'hôte. Comme décrit auparavant, chez l'hôte les métaux sont très peu disponibles car ils sont complexés à des protéines, comme la transferrine (Tf) ou la lactoferrine dans le cas du Fe(III).

Chez des bactéries des familles *Neisseriaceae*, *Pasteurellaceae* et *Moraxellaceae*, on trouve le système TbpA/TbpB, pour « Tf binding protein » (Fig. 8). Le TBDT TbpA se caractérise par la présence d'une hélice dans une boucle extracellulaire qui interagit avec le lobe C-terminal de la Tf et permet l'extraction du Fe(III). TbpA travaille avec TbpB, une lipoprotéine ancrée à la membrane. TbpB s'étend du côté extracellulaire et capture avec son lobe N-terminal la Tf chargée en Fe(III), ce qui favorise son interaction avec TbpA. Cela facilite l'extraction du Fe(III) qui est ensuite transféré à un motif du domaine plug, appelé « EIEYE motif ». Dans le périplasme la protéine de liaison périplasmique FbpA lie Fe(III) et le délivre à un ABC transporteur, FbpBC dans la membrane interne, qui le transporte vers le cytoplasme en hydrolysant l'ATP (C. Chan et al., 2023; Noinaj et al., 2012; Yadav et al., 2019).

Un mécanisme comparable est présent chez ces mêmes bactéries pour capter le fer à partir de la lactoferrine. Il fait intervenir deux protéines, LbpA et LbpB qui sont respectivement un TBDT et une lipoprotéine (Pettersson et al., 1998).

La majorité du fer chez l'hôte existe sous forme d'hème lié à l'hémoglobine. *Neisseria* et d'autres bactéries pathogènes possèdent des systèmes pour exploiter cette source de fer. Le système HpuB/HpuA est retrouvé chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*. Ce système montre des similarités avec les systèmes de transport de la transferrine et de la lactoferrine. HpuA est une lipoprotéine qui adopte une conformation étendue vers le milieu extracellulaire. Elle interagit avec l'hémoglobine et permet son contact avec le TBDT HpuB, qui effectue l'importation de l'hème après son extraction (Yadav et al., 2019). L'hème est ensuite transporté vers le cytoplasme où il va être dégradé par l'hème oxygénase HemO pour libérer le fer (Zhu et al., 2000).

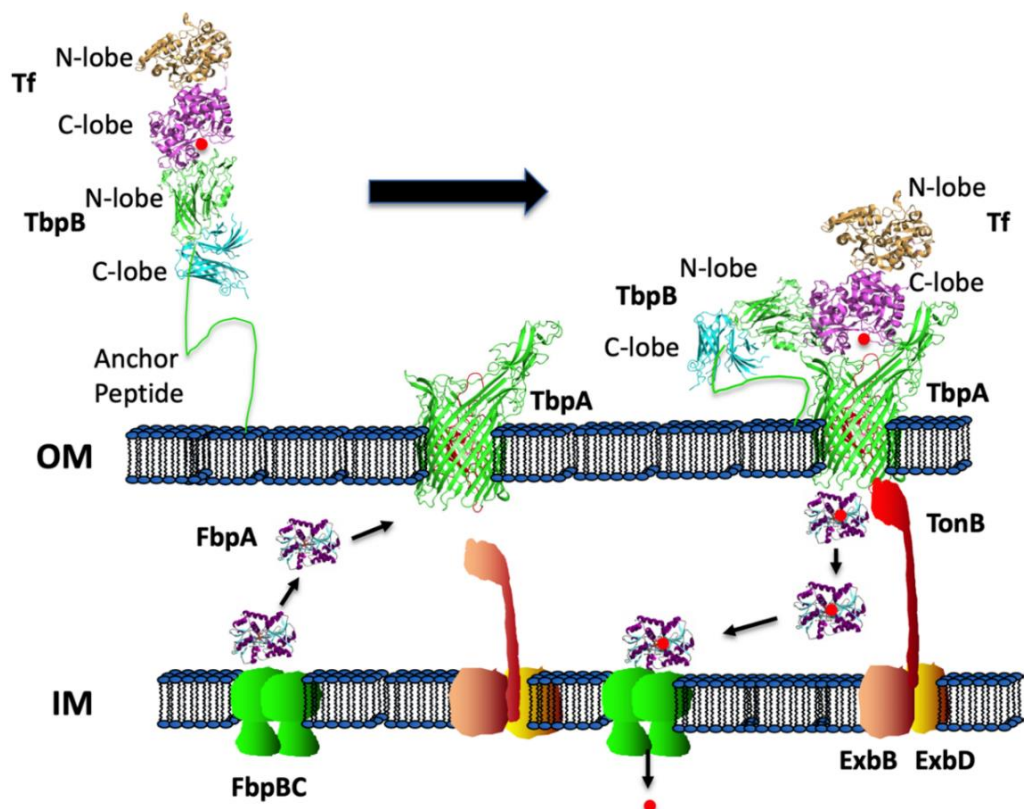


Figure 8. Mécanisme d'acquisition du fer à partir de la transferrine. TbpB capte la transferrine ferrique et la transmet à TbpA, qui utilise l'énergie du complexe TonB pour faire passer le fer dans le périplasme. Le fer est ensuite transféré par FbpA au complexe FbpB-FbpC, qui l'importe dans le cytoplasme (Chan et al., 2023).

Un autre système de transport des métaux à partir des protéines de l'hôte connu chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* est TdfH (ou CbpA) qui permet d'extraire le zinc à partir de la calprotectine. Produite par les neutrophiles, la calprotectine est connue pour séquestrer des

ions Zn(II) et Mn(II). Elle est composée des protéines S100A8 et S100A9 qui s'organisent en hétérodimère ou en hétérotétramère.

À la différence des TBDTs cités précédemment, TdfH ne travaille pas avec une lipoprotéine (Yadav et al., 2019) mais interagit directement avec les sites de fixation du zinc dans la calprotectine grâce à ses boucles, ce qui permet l'extraction du métal (Fig. 9). Il a été montré que TdfH de *N. gonorrhoeae* peut aussi lier les calprotectines chargées en Cu(II), ce qui suggère un rôle possible dans l'importation de ce métal, et peut-être d'autres (Bera et al., 2022).

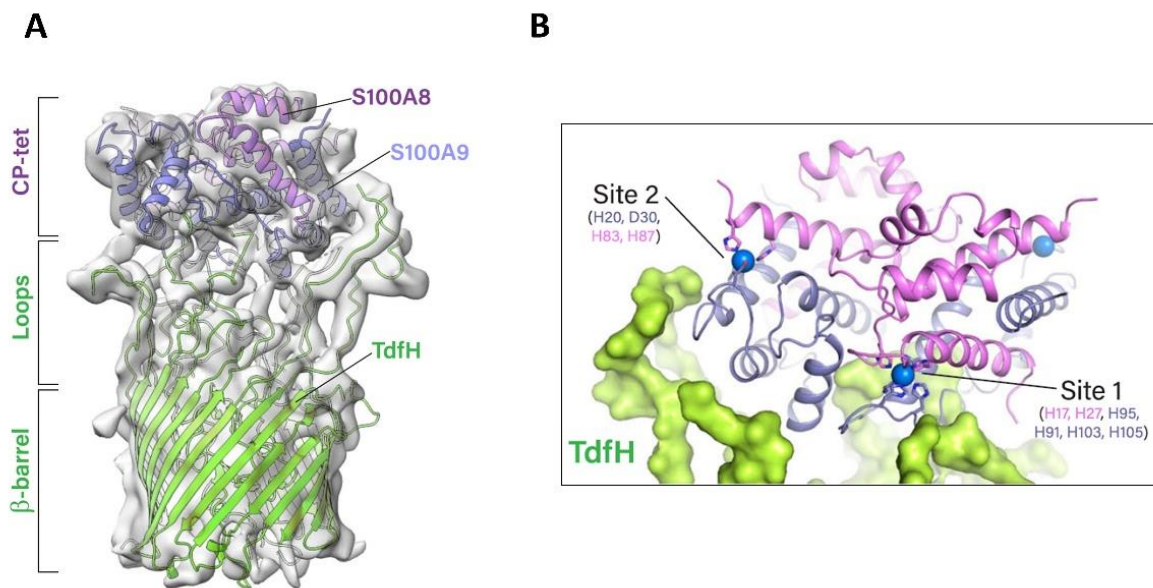


Figure 9. Structure cryo-EM du complexe TdfH-calprotectine (PDB ID 4XJK). (A) Vue orthogonale du complexe TdfH (vert) lié à la calprotectine (S100A8 et S100A9 en violet). (B) Vue rapprochée montrant l'interaction entre les boucles de TdfH et les deux sites de liaison au zinc de la calprotectine (zinc en bleu) (Bera et al., 2022).

2.6. Importation des métaux grâce à des effecteurs de systèmes de sécrétion

Le système de sécrétion de type VI (T6SS) est présent chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif. Il est connu pour injecter des effecteurs dans des cellules eucaryotes ou des bactéries concurrentes afin de favoriser la virulence ou la compétition inter-bactérienne (Silverman et al., 2012). Toutefois, des études récentes ont montré une fonction du T6SS dans l'acquisition de nutriments essentiels, en particulier les métaux.

Chez *Burkholderia thailandensis*, le système T6SS-4 est activé en réponse au stress oxydatif par le régulateur OxyR. Il permet la sécrétion d'un effecteur, TseM, capable de lier le Mn(II) dans l'environnement. Ce complexe TseM-Mn(II) est ensuite reconnu et transporté par un TBDT appelé MnoT (Si, Zhao, et al., 2017). Un mécanisme similaire a été mis en évidence pour l'importation du zinc dans la même espèce, impliquant un effecteur T6SS appelé TseZ et le transporteur HmuR. Ce TBDT est associé normalement au transport de l'hème, mais en situation de stress oxydatif, HmuR bascule vers une autre fonction, le transport de Zn(II), via une interaction avec TseZ (Si, Wang, et al., 2017).

Chez *P. aeruginosa*, le cuivre est acquis via un système impliquant le T6SS de type H2, qui sécrète l'effecteur azurine (Azu) en réponse à des conditions de faible concentration en Cu(II). Azu capture le cuivre extracellulaire et le transfère directement au TBDT OprC, dont l'expression, comme celle de H2-T6SS et d'Azu, est réprimée par le régulateur transcriptionnel sensible au Cu(I), CueR, et induite par de faibles concentrations de cuivre (Han et al., 2019).

2.7. Importation des métaux grâce à des métallophores

2.7.1. Les voies de biosynthèse des métallophores

La biodisponibilité des métaux peut être très limitée dans certaines conditions (faible solubilité, complexation ou forte compétition). Pour surmonter ces contraintes, certaines bactéries produisent des métallophores. Les métallophores les plus connus sont les sidérophores. Ces petites molécules de 500 à 1500 Da sont capables de chélater le Fe(III) avec une forte affinité et de le délivrer à des transporteurs spécifiques, souvent absents chez les espèces concurrentes (Hider & Kong, 2010). Certains métallophores participent aussi à la passivation des métaux en excès (Leprevost et al., 2024). Leur biosynthèse est souvent régulée par la concentration intracellulaire en métal, et ils présentent une grande diversité, allant de petits métabolites comme le citrate à des protéines sécrétées (Maret, 2024).

Plusieurs voies de biosynthèse permettent leur production. Certaines impliquent des enzymes multifonctionnelles codées par des clusters de gènes, comme les polycétides synthases (PKS) et les synthétases de peptide non-ribosomique (NRPS), qui génèrent une grande variété de métabolites secondaires (Brakhage, 2013). Les PKS possèdent des domaines

organisés de façon modulaire : l'acyltransférase (AT) sélectionne des substrats (malonyl-CoA ou methylmalnoyl-Co) et les active par acylation, l'ACP (acyl carrier protein) les transporte, et le domaine KS (kétoynthase) catalyse l'élongation pour former des polycétides. Les NRPS fonctionnent selon une logique similaire et permettent de synthétiser des sidérophores composés essentiellement d'acides aminés. Un domaine d'adénylation (A) sélectionne et active l'acide aminé, qui est ensuite transporté par un domaine PCP (peptidyl carrier protein), ensuite un domaine de condensation (C) catalyse la formation de la liaison peptidique, et un domaine thioestérase (T) libère le peptide une fois la chaîne terminée. D'autres domaines facultatifs permettent des modifications supplémentaires (oxydation, méthylation, cyclisation...), augmentant la diversité structurale (Timofeeva et al., 2022).

Il existe également des sidérophores produits par des synthétases indépendantes des NRPS (NIS). Ces enzymes utilisent des substrats carboxylés (citrate, α -cétoglutarate...) et consomment de l'ATP pour former des liaisons amide avec des amines ou alcools, générant des sidérophores de type hydroxamate ou carboxylate (Xie et al., 2024).

Enfin, certains métallophores, comme les méthanobactines (chalcophore : métallophore pour le cuivre) (Reyes & Rosenzweig, 2024), sont produits via la voie des RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides). Ces peptides naturels sont synthétisés sous forme de précurseurs par le ribosome, puis modifiés post-traductionnellement. Le précurseur comprend généralement une séquence leader N-terminale conservée, qui guide les enzymes de modification vers la région core (C-terminale), cible des modifications. Le produit final est ensuite libéré par clivage protéolytique (Arnison et al., 2012).

2.7.2. Exemple des sidérophores

Il existe une grande variété de sidérophores de structures chimiques différentes. Généralement, ils coordonnent le Fe(III) avec des atomes d'oxygène, selon une géométrie octaédrique. L'implication d'autres atomes comme l'azote et le soufre diminue l'affinité du sidérophore pour le Fe(III) (Hider & Kong, 2010). On les classe en quatre grandes familles, selon les groupes chimiques qui assurent la coordination du fer : les hydroxamates, les catécholates, les carboxylates et les sidérophores mixtes. Des exemples représentatifs de chaque classe sont montrés dans la Fig. 10.

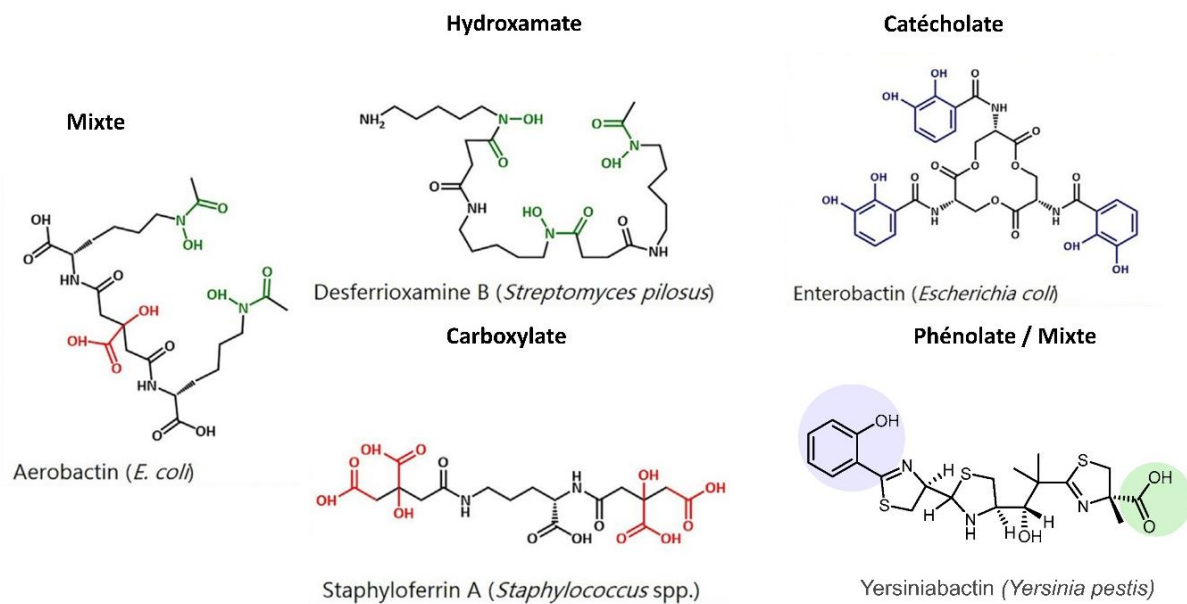


Figure 10. Exemples représentatifs des classes de sidérophores. Les groupements catécholates, carboxylates, phénolates et hydroxamates sont indiqués respectivement en bleu, rouge, violet et vert. Dans le cas de la yersiniabactine, le groupement carboxylate est surligné en vert (Albelda-Berenguer et al., 2019).

2.8. Facteurs contrôlant la complexation des métaux par des métallobindants

La sélectivité d'un métallobindant vis-à-vis d'un métal dépend de plusieurs facteurs liés à la nature du métal et du métallobindant. La composition chimique du métallobindant représente un critère important. Selon la règle des acides et bases durs et mous (HSAB), chaque métal a des préférences de liaison à des groupements donneurs. Les métaux dits durs (Fe(III), Ga(III)...) préfèrent les ligands riches en oxygène, les métaux mous (Cu(I), Cd(II)...) préfèrent les ligands riches en soufre ou azote et les métaux intermédiaires (Fe(II), Zn(II), Cu(II)) se lient souvent à des donneurs azotés (Pearson, 1968).

La structure du métallobindant joue également un rôle clé dans la complexation, car le nombre d'atomes donneurs et leur arrangement spatial va conférer une géométrie de coordination et ainsi une sélectivité vis-à-vis du métal. Une analyse des sites de liaison des métaux dans environ 100 métallobindants et 3 000 petits complexes avec des métaux de transition divalents a révélé que la disposition octaédrique est privilégiée par Co(II) et Ni(II), tétraédrique par Zn(II), plan carré par Cu(II) et linéaire par Hg(II) (Fig. 11) (Rulísek & Vondrásek,

1998). Certains métallophores sont très flexibles et permettent une adaptation à différentes géométries de coordination, alors que d'autres sont plus rigides. La longueur des cycles formés entre les groupements donneurs et le métal lors de la chélation influence aussi la compatibilité métal-métallophore (Irving & Williams, 1953; Kraemer et al., 2015).

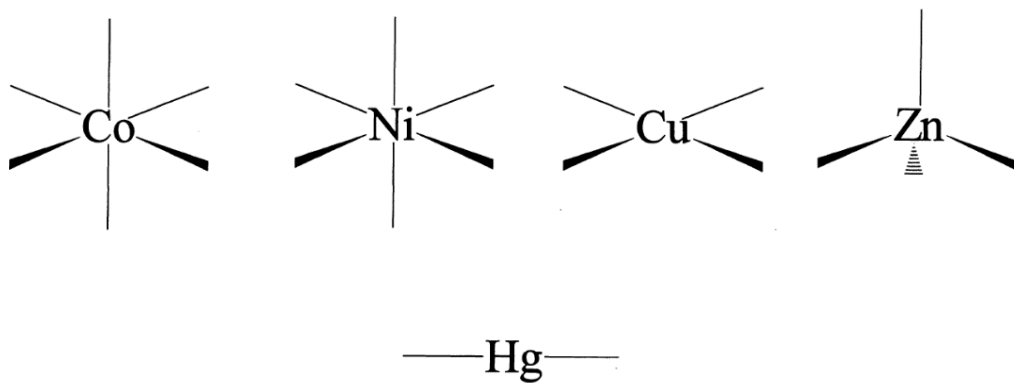


Figure 11. Les géométries de coordination préférées de quelques ions métalliques divalents. Co(II) et Ni(II) : octaédrique , Zn(II) : tétraédrique, Cu(II) : plan carré et Hg(II) : linéaire (Rulísek & Vondrásek, 1998).

La stabilité de la liaison métal-métallophore dépend du nombre de points de contact entre le ligand et le métal. Un ligand multidenté stabilise davantage le complexe qu'un ligand avec une faible denticité. Enfin, les ligands qui ont une structure adaptée, c'est-à-dire dont les groupements donneurs coordonnent le métal de façon optimale sans avoir besoin de se réorganiser, confèrent plus de stabilité au complexe qu'un ligand qui doit modifier sa structure.

Malgré tous ces facteurs qui contrôlent la formation des complexes, avoir une spécificité stricte d'un métallophore pour un seul métal cible est difficile (Kraemer et al., 2015). Il a été montré que certains métallophores sont capables de lier plusieurs métaux, comme la yersiniabactine qui lie le fer, le cuivre et le zinc (Koh et al., 2015; Price et al., 2021).

3. Transport des métaux à travers la membrane interne : cas du fer

Après leur importation à travers la membrane externe sous forme de complexes métal-métallophore, les métaux doivent traverser la membrane interne pour atteindre le cytoplasme. Ce processus est bien décrit dans le cas du fer, et c'est pour cette raison cette partie va être consacrée au transport des complexes ferrisidérophores.

Le transport à travers la membrane interne implique principalement des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette). Une fois dans le périplasma, les complexes sont capturés par des protéines de liaison périplasmiques (PBP, periplasmic binding proteins), qui présentent une structure bilobée caractéristique. Ces protéines fixent leur substrat entre les deux lobes et le transmettent ensuite au transporteur ABC (Delepelaire, 2019). Ces transporteurs ABC présentent une organisation conservée. Ils sont composés d'une PBP, de deux domaines transmembranaires formant un canal de passage, et de deux sous-unités cytoplasmiques capables d'hydrolyser l'ATP (Delepelaire, 2019; Schalk & Guillon, 2013).

Certains ferrisidérophores sont également transportés par des perméases spécifiques, comme RhtX, FptX et FiuB, impliquées respectivement dans le transport de la ferrirhizobactine chez *Sinorhizobium meliloti*, et de la ferripyochelin et du ferrichrome chez *P. aeruginosa* (Cuív et al., 2004; Hannauer et al., 2010; Schalk & Guillon, 2013). Ces perméases fonctionnent sous forme d'une seule sous-unité transmembranaire non associée à une protéine périplasmique. Le transfert du complexe ferrisidérophore peut ainsi se faire directement des TBDTs vers la perméase, ou bien par diffusion libre dans le périplasma avant d'être captés par le site de liaison de la perméase (Schalk & Guillon, 2013). Il a été démontré que l'activité de FptX dépend de la force proton-motrice (Zhang et al., 2024).

3.1. Mécanismes de dissociation du fer de son sidérophore

Les sidérophores présentent une très forte affinité pour le fer, ce qui rend les complexes formés très stables. Un cas extrême est celui de l'entérobactine avec une constante d'affinité pour Fe(III) supérieure à 10^{52} M^{-1} (Carrano & Raymond, 1979). Les bactéries ont donc développé des mécanismes spécifiques permettant la dissociation du fer de son sidérophore. Trois stratégies principales ont été décrites dans la littérature : (1) l'hydrolyse du sidérophore, (2) la modification chimique de celui-ci, et/ou (3) la réduction du fer, qui diminue l'affinité du

sidérophore et permet la libération de Fe(II). Ces mécanismes peuvent avoir lieu dans le périplasme ou le cytoplasme, selon la nature du complexe et l'espèce bactérienne (Schalk & Guillon, 2013).

Après le transport du complexe à travers la membrane interne, le Fe (III) est réduit en Fe (II), parfois suivi d'une étape d'hydrolyse du sidérophore, comme pour la ferrientérobactine chez *E. coli* (Brickman & McIntosh, 1992). Dans certains cas, la dissociation du complexe est associée à une modification du sidérophore, comme le ferrichrome chez *P. aeruginosa* qui subit une acétylation dans le cytoplasme. Une fois le métal libéré, le sidérophore modifié est réexporté vers le milieu extracellulaire, permettant ainsi son recyclage. Pour le ferrichrome cela est possible après interaction avec le chlorure ferrique qui va hydrolyser le groupement acétyl (Hannauer et al., 2010; Hartmann & Braun, 1980)

La dissociation du fer peut également avoir lieu dans le périplasme, par réduction directe sans modification ni dégradation du sidérophore. C'est le cas du complexe fer-pyoverdine chez *P. aeruginosa*. Après son importation par le TBDT FpvA, l'ion Fe(III) chélaté par la pyoverdine est réduit par l'action de la protéine FpvG, une réductase de la membrane interne appartenant à la famille PepSY-TM, avec l'aide de FpvH et de FpvC, ce dernier jouant le rôle de chélateur du Fe(II) (Ganne et al., 2017). La pyoverdine dépourvue de fer est ensuite recyclée vers l'extérieur de la cellule par une pompe à efflux, ce qui constitue un avantage énergétique en évitant la synthèse de nouveaux sidérophores (Imperi et al., 2009). Un mécanisme similaire a été décrit pour la ferrioxamine B, où la dissociation du fer est également assurée par une réduction catalysée par FoxB, une protéine de la membrane interne de la même famille PepSY-TM (Josts et al., 2021). La famille PepSY-TM sera décrite plus en détails par la suite.

Chapitre III : Acquisition du cuivre chez les bactéries Gram-négatives

Contrairement aux systèmes d'importation du fer, largement étudiés, les mécanismes d'acquisition du cuivre chez les bactéries à Gram négatif restent encore peu caractérisés. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les transporteurs de cuivre identifiés à ce jour chez ces bactéries.

1. NosA : un transporteur TonB-dépendant de cuivre identifié chez *Pseudomonas stutzeri*

NosA est une protéine de la membrane externe d'environ 70 kDa identifiée chez *P. stutzeri*. Le gène *nosA* a été séquencé et présente une forte homologie de séquence avec BtuB, le transporteur de vitamine B12 chez *E. coli*, ainsi qu'avec d'autres TBDTs tels que FepA et FhuA (Lee et al., 1991). Une analyse phylogénétique a permis de placer NosA dans un sous-cluster de TBDTs aux côtés de HasR et FhuA (Lee et al., 1991; Yoneyama & Nakae, 1996).

Bien que la structure de NosA n'ait pas encore été caractérisée, la protéine a été purifiée et du cuivre y a été détecté (Lee et al., 1989), suggérant sa capacité de liaison au cuivre. NosA est exprimée en conditions anaérobies, et son expression est régulée spécifiquement par le cuivre. Elle est réprimée à des concentrations micromolaires de cuivre, tandis que d'autres métaux tels que Mn, Co, Ni, Zn ou Fe n'ont aucun effet (Lee et al., 1989).

Des mutants de *nosA* produisent une forme inactive de l'enzyme N₂O réductase (NosZ), en raison de l'absence de cuivre (Lee et al., 1989). NosZ est une cuproprotéine homodimérique localisée dans la membrane cytoplasmique, qui catalyse la dernière étape de la dénitrification en réduisant le N₂O en N₂. Chaque monomère contient six atomes de cuivre répartis entre deux centres : le centre tétranucléaire Cu_Z (Cu₄S₂), responsable de la liaison et de la réduction du N₂O, et un centre binucléaire Cu_A à valence mixte, impliqué dans le transfert d'électrons (Stewart et al., 2019; Zumft, 2005). Chez les mutants *nosA*, NosZ est produite sous forme apo, dépourvue de cuivre, ce qui a conduit à l'hypothèse que NosA jouerait un rôle dans l'importation du cuivre pour l'assemblage fonctionnel de NosZ. Toutefois, son mécanisme précis reste inconnu (Lee et al., 1989).

Cependant, des études ultérieures ont montré que chez certaines souches de *P. stutzeri*, l'inactivation de *nosA* n'affecte pas la synthèse fonctionnelle de NosZ, suggérant l'existence de voies alternatives d'importation du cuivre (Wunsch et al., 2003). Par ailleurs, des homologues de NosA ont été identifiés chez des protéobactéries non dénitrifiantes, telles que *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*, ce qui laisse penser que NosA pourrait jouer un rôle plus général dans l'importation du cuivre (Bhamidimarri et al., 2021).

2. Les bactéries méthanotrophes et le cuivre : la méthane monooxygénase (pMMO)

Les bactéries méthanotrophes utilisent le méthane (CH₄) comme unique source de carbone et d'énergie. La première étape de leur métabolisme du méthane consiste en son oxydation en méthanol, catalysée par une métalloenzyme appelée méthane monooxygénase (MMO). Il existe deux types de MMO : une forme soluble cytoplasmique (sMMO), qui nécessite du fer pour son activité, et une forme membranaire particulière (pMMO), dépendante du cuivre (Sirajuddin & Rosenzweig, 2015).

La sMMO présente un large spectre de substrats, mais une faible affinité pour le méthane. En revanche, la pMMO se distingue par une forte spécificité (Gu et al., 2016; Sirajuddin & Rosenzweig, 2015). Elle est constituée de trois sous-unités : PmoA, PmoB et PmoC et contient trois centres métalliques distincts. Un site di-cuivre situé à l'extrémité N-terminale de PmoB constitue le site actif de l'oxydation du méthane. Un site mono-cuivre est également localisé dans PmoB et un troisième site capable de lier du cuivre ou du zinc est présent dans PmoC (Fig. 12) (Sirajuddin & Rosenzweig, 2015).

Certaines bactéries méthanotrophes possèdent les gènes codant pour les deux types de MMO. L'expression de ces enzymes est régulée par la disponibilité du cuivre selon un mécanisme connu sous le nom de « copper switch ». En condition de faible disponibilité en cuivre, l'expression et l'activité de la sMMO augmentent. À l'inverse, lorsque la concentration en cuivre s'élève, l'expression de la pMMO est favorisée tandis que celle de la sMMO diminue (Semrau et al., 2010). Ainsi, les méthanotrophes exprimant majoritairement la pMMO ont un besoin accru en cuivre, qu'elles doivent importer de leur environnement.

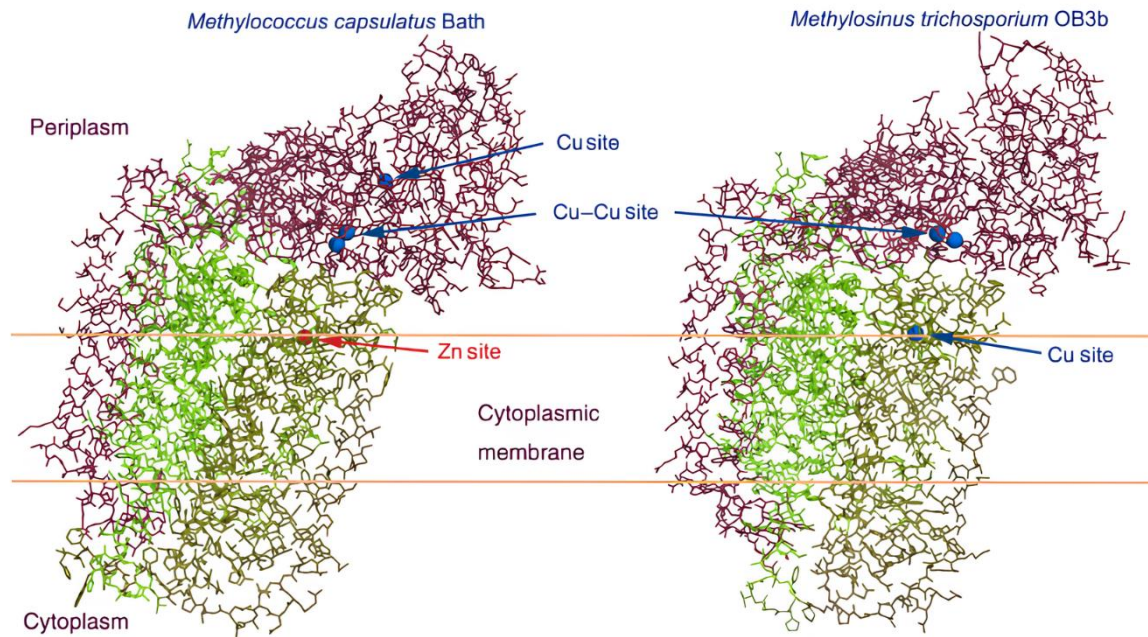


Figure 12. Structure cristalline du monomère de la pMMO de *Methylococcus capsulatus Bath* et de *Methylosinus trichosporium OB3b*. Sous-unités : PmoA (vert clair), PmoB (rouge foncé), PmoC (vert foncé) (Semrau et al., 2010).

2.1. La méthanobactine chez les méthanotrophes

En 1990, un mutant de *Methylosinus trichosporium OB3b* exprimant constitutivement la sMMO a été identifié. Le milieu de culture de ce mutant contenait une concentration en cuivre supérieure à celle observée chez la souche sauvage, suggérant un défaut dans l'acquisition du cuivre. Des analyses ont permis d'isoler et d'identifier un composé présent dans le milieu, capable de lier spécifiquement le cuivre avec une très forte affinité. Ce composé a été nommé méthanobactine (Mbn), et sa structure a été cristallisée en complexe avec le cuivre (Fig. 13) (El Ghazouani et al., 2011; Phelps et al., 1992; Téllez et al., 1998).

Chez les méthanotrophes, la Mbn joue un rôle central dans l'acquisition du cuivre nécessaire à l'assemblage de la pMMO. Il s'agit d'un chalcophore sécrété sous la forme d'un petit peptide ribosomique modifié post-traductionnellement, appartenant à la famille des RiPPs, avec une masse d'environ 1200 Da. Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des Mbns comprennent systématiquement un gène codant pour le peptide précurseur (*mbnA*), et deux gènes codant pour les enzymes de modifications post-traductionnelles (*mbnB* et *mbnC*).

D'autres gènes comme *mbnN*, *mbnF*, *mbnS* et *mbnD* peuvent également être présents et sont associés à des modifications supplémentaires, en plus des gènes de transport et de régulation (Dassama et al., 2017; Reyes & Rosenzweig, 2024). Des homologues de ces clusters ont également été identifiés chez des bactéries Gram-négatives et Gram-positives non méthanotrophes (G. E. Kenney & Rosenzweig, 2013).

Il existe plusieurs Mbns avec différentes modifications. En se basant sur les structures disponibles, les Mbns complexées avec le cuivre présentent toutes une structure pyramidale caractéristique. Elles se caractérisent par la présence de deux cystéines formant un pont disulfure, et parfois d'une méthionine C-terminale dans la forme mature. Les Mbns coordonnent le Cu(I) selon une géométrie tétraédrique déformée via des ligands provenant de deux cycles oxazolone avec des groupes thioamide voisins (El Ghazouani et al., 2011 ; Kim et al., 2004).

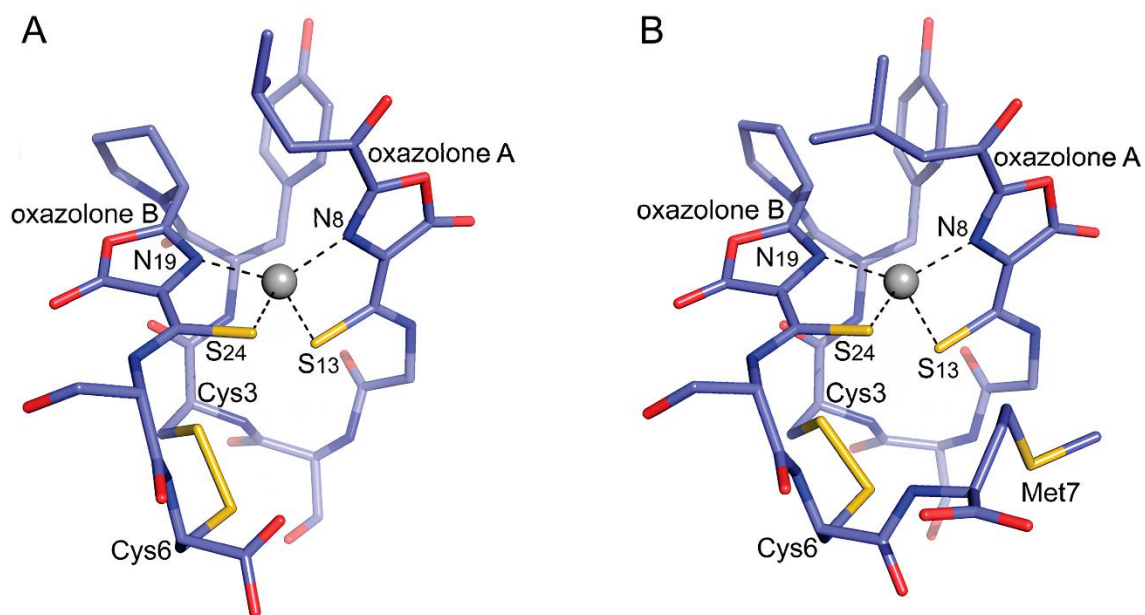


Figure 13. Structures cristallisées de Cu(I)-Mbn (sans méthionine) (A) et de Cu(I)-Mbn (avec méthionine) (B) de *M. trichosporium OB3b* (PDB ID 2xjh et 2xji respectivement), avec le cuivre représenté par une sphère argentée. Dans les deux peptides, le cuivre est coordonné par les atomes d'azote de deux cycles oxazolone et les atomes de soufre de deux groupes thioamide, formant une géométrie tétraédrique déformée (El Ghazouani et al., 2011).

La Mbn lie le Cu(I) avec une forte affinité ($K_a = 10^{19-21} \text{ M}^{-1}$) et le Cu(II) avec moins d'affinité ($K_a = 10^{11-14} \text{ M}^{-1}$). Dans la Mbn, ce dernier est rapidement réduit en Cu(I) (Choi et al., 2006; El

Ghazouani et al., 2012). Le mécanisme exact de cette réduction reste inconnu, mais il a été suggéré qu'elle est couplée à une génération d'O₂ à partir d'H₂O (Dershwitz et al., 2021).

En absence de cuivre, la Mbn peut également lier d'autres métaux, bien que de manière moins spécifique, tels que Ag(I), Au(III), Hg(II), Pb(II), U(VI), Cd(II), Co(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II) et Zn(II) (Reyes & Rosenzweig, 2024).

2.2. Transport du complexe Cu-méthanobactine chez les méthanotrophes

Dans les clusters de gènes responsables de la biosynthèse de la Mbn, on retrouve le gène *mbnT*, codant pour un TBDT. Ce transporteur contient une extension N-terminale impliquée dans une transduction de signal via une régulation exercée par les facteurs sigma et anti-sigma MbnI/MbnR (G. E. Kenney et al., 2016).

Chez *Methylosinus trichosporium OB3b*, il a été démontré qu'un mutant déficient en *mbnT* est incapable d'importer le complexe Cu-Mbn. De plus, un niveau plus élevé d'expression de sMMO dans ce mutant suggère un défaut d'acquisition du cuivre pour assembler la pMMO. Cependant, en présence de cuivre libre, le cuivre est importé au même niveau par ce mutant et par la souche sauvage, indiquant l'existence d'une voie d'acquisition alternative, probablement via des porines (Gu et al., 2016).

L'expression de *mbnT* de *M. trichosporium OB3b* chez *E. coli* confère à cette dernière la capacité d'importer le complexe Cu-Mbn, montrant le rôle de MbnT dans le transport de ce complexe (Dassama et al., 2016). Des expériences de résonance plasmonique de surface ont confirmé l'interaction entre le complexe Cu-Mbn et MbnT purifié, avec une constante de dissociation de 6.22 µM. Par ailleurs, il a été observé que MbnT de *Methylocystis rosea SV97* est également capable d'interagir avec la Mbn de *M. trichosporium OB3b*, suggérant que certains TBDTs peuvent reconnaître et potentiellement transporter des méthanobactines produites par d'autres espèces. Aucune interaction n'a été détectée entre MbnT et d'autres ligands typiques de TBDTs, tels que la cobalamine, le complexe fer-pyoverdine ou le fer-citrate, ce qui souligne la spécificité de MbnT pour la méthanobactine (Dassama et al., 2016). Toutes ces données montrent que le MbnT est le transporteur du complexe Cu-Mbn chez les méthanotrophes, mais sa structure n'a jamais été caractérisée.

La protéine MbnE, codée aussi par les opérons de Mbn, a été identifiée comme une protéine de liaison périplasmique capable d'interagir avec le complexe Cu-Mbn, suggérant un rôle dans le transport du cuivre dans l'espace périplasmique (Dassama et al., 2016).

Des hypothèses sur le mécanisme de dissociation du complexe Cu(I)-Mbn impliquent soit l'oxydation de Cu(I) en Cu(II) ce qui réduirait l'affinité de la Mbn, facilitant la libération de Cu(II), soit un changement conformationnel de la Mbn qui favoriserait la libération du cuivre. MbnH et MbnP sont des protéines périplasmiques codées dans certains opérons *mbn*. Il a été montré que MbnP peut lier le Cu(I) avec une forte affinité ($K_a=10^{18} \text{ M}^{-1}$), cette liaison se fait uniquement après modification post-traductionnelle de MbnP par la protéine MbnH, une protéine apparentée aux cytochrome c peroxidases. Ces observations suggèrent un rôle de MbnH et MbnP dans la libération du cuivre de la Mbn (Kenney et al., 2019; Reyes & Rosenzweig, 2024). La figure 14 résume le mécanisme proposé pour l'importation du cuivre par la Mbn chez *M. trichosporium OB3b*.

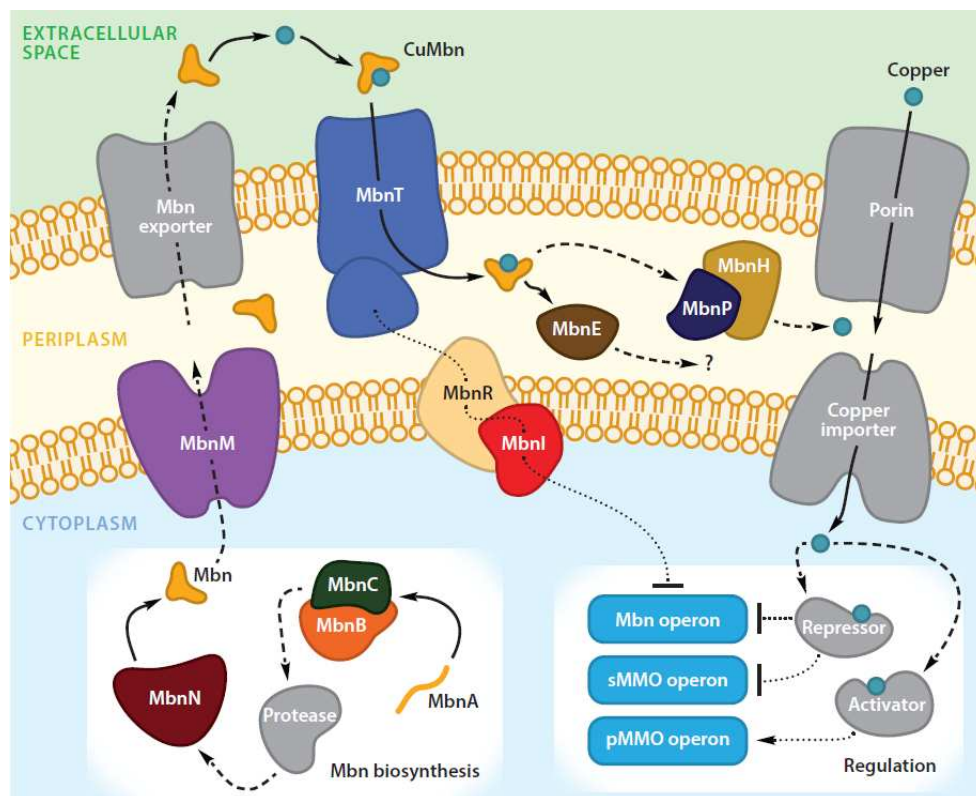


Figure 14. Vue d'ensemble de l'homéostasie du cuivre chez *M. trichosporium OB3b*. Les protéines en gris n'ont pas été identifiées. Les flèches pleines indiquent des processus confirmés expérimentalement, les flèches en pointillés représentent des interactions supposées, et les lignes en pointillés fins indiquent des voies de signalisation ou de régulation hypothétiques (Reyes & Rosenzweig, 2024).

3. PcuB : un TBDT induit par la carence en cuivre chez *Bradyrhizobium japonicum*

Bradyrhizobium japonicum est une bactérie Gram-négative du sol, appartenant à la famille des alpha-protéobactéries. Elle établit une symbiose avec les racines des légumineuses et se distingue par sa forte capacité d'adaptation à l'environnement (Kamicker & Brill, 1986).

En condition anaérobie, *B. japonicum* réalise la dénitrification, en utilisant le nitrate (NO_3^-) comme accepteur final d'électrons. Ce processus implique notamment deux cuproenzymes : la nitrite réductase, qui réduit NO_2^- en NO à l'aide de deux centres à cuivre (types 1 et 2), et la N_2O réductase, qui catalyse la conversion du N_2O en N_2 via des centres Cu_A et Cu_Z (Bedmar et al., 2005).

En conditions aérobies, *B. japonicum* respire sur O_2 avec huit cytochromes oxydases terminales possibles, dont six sont dépendantes du cuivre. Ces dernières appartiennent à la famille des HCOs (heme-copper oxidases), et sont divisées en deux groupes : quatre cytochromes c oxydases, avec deux cytochromes c oxydases de type aa3, possédant deux centres à cuivre : Cu_A (sur la sous-unité II, côté périplasmique) et Cu_B (enfoui dans la sous-unité I, site de réduction de l' O_2 en H_2O), et deux cytochromes c oxydases de type cbb3, avec un seul centre Cu_B . Le second groupe inclut deux quinol-oxydases (avec un centre Cu_B). En plus des HCOs, *B. japonicum* possède aussi deux oxydases indépendantes du cuivre, de type cytochrome bd ubiquinol oxydase (Bühler et al., 2010).

La présence de nombreuses cuproprotéines suggère l'existence de systèmes spécialisés pour l'acquisition du cuivre. Une analyse transcriptomique par biopuce, réalisée sur des cultures de *B. japonicum* soumises à différentes conditions de cuivre, a permis d'identifier un opéron de cinq gènes, *pcuABCDE*, dont l'expression augmente en carence en cuivre (Serventi et al., 2012).

Le gène *pcuB* code un TBDT, suggérant un rôle potentiel dans l'importation du cuivre. PcuA, PcuC et PcuD sont des protéines périplasmiques solubles, parmi lesquelles PcuC est homologue à PCu_AC , un chaperon à Cu impliqué dans l'assemblage des HCOs. PcuE, quant à elle, est une protéine de la membrane interne, apparentée aux transporteurs CopCD/YncJ connus pour leur implication dans l'acquisition du cuivre à travers la membrane interne.

La délétion de l'opéron complet entraîne un défaut de croissance en conditions aérobie et anaérobie (avec nitrate) et en absence de cuivre. Ce mutant a perdu la capacité de produire la cytochrome c oxydase de type aa3. Il a été ensuite montré que ces effets sont liés principalement à la perte de *pcuC*, alors que la délétion de *pcuB* seul n'affecte pas la croissance dans les conditions testées. La fonction et la structure de PcuB restent donc à caractériser, mais son induction spécifique en situation de carence en cuivre suggère un rôle dans le transport de ce métal chez *B. japonicum* (Serventi et al., 2012).

4. Transport du cuivre chez *Pseudomonas aeruginosa*

4.1. OprC

La protéine C (OprC) a été identifiée chez *P. aeruginosa* et décrite initialement comme une porine (Yoshihara & Nakae, 1989). Quelques années plus tard, il a été montré que sa séquence nucléotidique présente une forte homologie (65 %) avec celle de NosA, le transporteur de cuivre identifié chez *P. stutzeri* (Lee et al., 1989), et également avec d'autres TBDTs, tels que PfeA, FepA, Cir, FhuE et BtuB.

Comme décrit pour NosA, l'expression d'OprC est spécifiquement réprimée par la présence de cuivre dans le milieu et induite en condition de croissance anaérobie. Toutefois, un mutant déficient en *oprC* reste capable de croître, malgré l'importance des cuproenzymes impliquées dans la dénitrification en anaérobiose. Sans OprC, le cuivre semble capable d'entrer dans le périplasme et d'assurer le fonctionnement de ces cuproenzymes, suggérant qu'OprC n'est pas essentielle pour l'entrée du cuivre dans les conditions testées (Yoneyama & Nakae, 1996).

L'analyse du sécrétome dépendant du système de sécrétion T6SS du type H2 chez *P. aeruginosa* a révélé que la fonction et l'assemblage du T6SS-H2 sont induites par la carence en cuivre via le régulateur transcriptionnel CueR. Il a été montré que ce système est impliqué dans la sécrétion de la cuproprotéine Azurine. L'azurine est une petite protéine (14 kDa), présente chez plusieurs bactéries telles que *Pseudomonas*, *Bordetella* et *Alcaligenes*, qui se caractérise par sa forte affinité pour le Cu(II), et est décrite comme participant au transfert d'électrons notamment vers la nitrate réductase lors de la respiration anaérobie chez *P. aeruginosa* (Cahyono et al., 2020).

La sécrétion d'azurine par la souche sauvage de *P. aeruginosa* confère un avantage compétitif face à *E. coli*, un avantage absent chez le mutant $\Delta oprC$, suggérant une interdépendance entre OprC et l'azurine. Des expériences *in vitro* ont mis en évidence une interaction directe entre ces deux protéines. De plus, un mutant dépourvu d'azurine accumule moins de cuivre, suggérant que l'azurine sécrétée via le système H2-T6SS capte le cuivre extracellulaire et le transmet à OprC pour favoriser son importation dans la cellule (Han et al., 2019). Un modèle illustrant ce mécanisme a été proposé (Fig. 15).

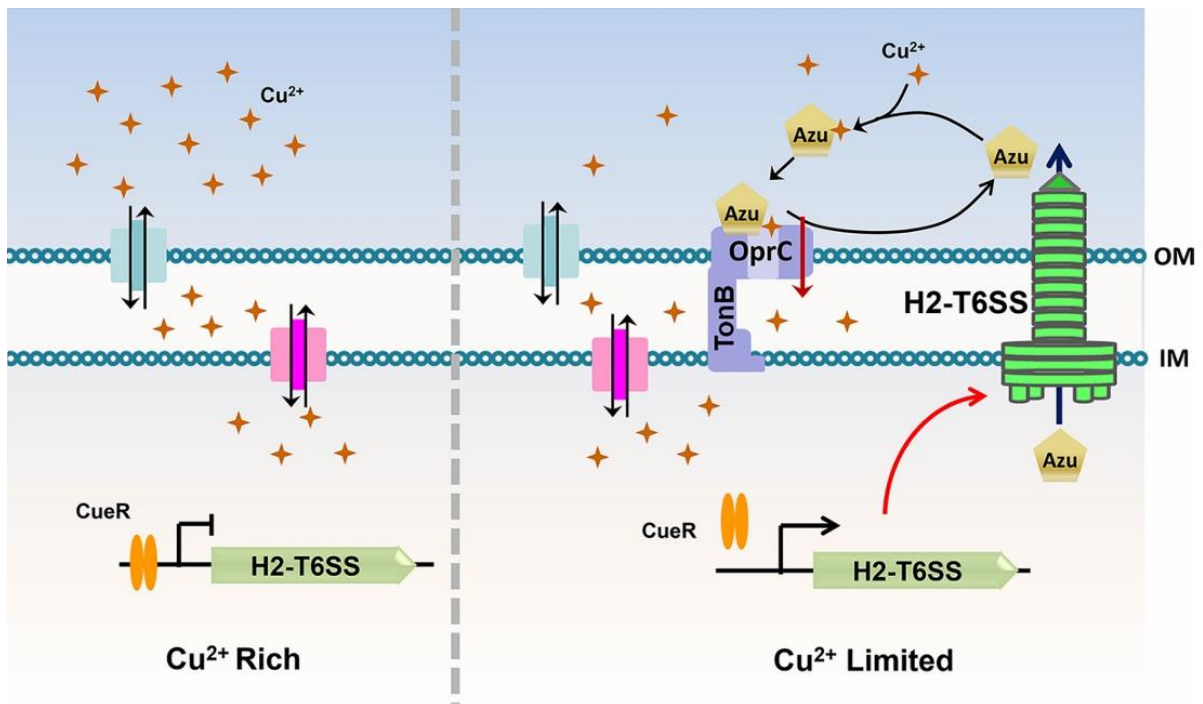


Figure 15. Modèle proposé du transport de Cu(II) médié par le système T6SS-H2 chez *P. aeruginosa*. En condition de carence en cuivre, la répression du T6SS-H2 par CueR est levée, permettant la sécrétion de l'azurine qui capte le Cu(II) extracellulaire et le transmet à OprC via une interaction directe (Cahyono et al., 2020).

La structure d'OprC a été résolue par cristallographie, faisant de lui le premier TBdT de cuivre cristallisé (Bhamidimarri et al., 2021). OprC présente une architecture typique des TBdT et possède un site de haute affinité de type CxxxM-HxM, où le cuivre est lié sous une coordination tétraédrique. Ce site est formé par deux résidus du domaine plug (Cys143, Met148) et deux autres de la paroi du tonneau β (His323, Met325).

Une caractéristique remarquable d'OprC est la présence de 11 résidus méthionine alignés pour former un chemin, appelé « methionine track », qui guide le cuivre de la surface extracellulaire vers le site principal de fixation (Fig. 16). La liaison du cuivre à ce site entraîne un changement conformationnel, en particulier au niveau des boucles extracellulaires, qui se réorganisent pour restreindre l'accès au site de fixation.

Il a été montré que le site principal peut lier à la fois Cu(I) et Cu(II), tandis que les sites de faible affinité situés le long du « methionine track » lient préférentiellement le Cu(I). Ainsi, en cas de délivrance de Cu(II) par l'azurine, le cuivre pourrait se fixer directement au site CxxxM-HxM, sans passer nécessairement par les résidus méthionine (Bhamidimarri et al., 2021).

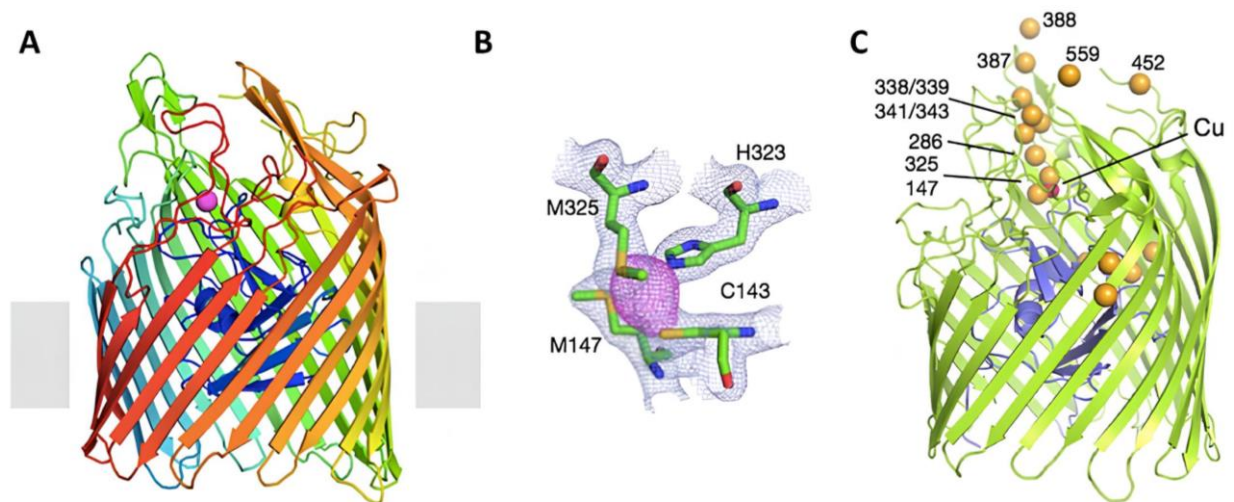


Figure 16. Caractéristiques structurales d'OprC, le TBDT de cuivre chez *P. aeruginosa* : A. Modèle tridimensionnel d'OprC liant le cuivre, coloré de l'extrémité N-terminale (bleu) à C-terminale (rouge). L'atome de cuivre est représenté par une sphère magenta. B. Visualisation des résidus impliqués dans la coordination du cuivre (Cys143, Met147, His323 et Met325). C. Vue extracellulaire montrant les atomes de soufre des résidus méthionine formant le « methionine track » (Bhamidimarri et al., 2021).

4.2. CrtA : Copper-responsive transporter A

P. aeruginosa possède un large répertoire de TBDTs. Une étude récente a identifié l'un de ces transporteurs non encore caractérisé, PA0434, comme voie d'entrée pour les pyocines SX1 et SX2 ciblant *P. aeruginosa* (Prem Suriya et al., 2023). L'expression de PA0434 est spécifiquement régulée par le cuivre : elle est induite en condition de carence et réprimée en présence d'un excès de cuivre et a donc été nommé CrtA (pour Copper-responsive transporter A). Ces

résultats suggèrent que ce TBDT joue un rôle dans l'acquisition du cuivre. Il a également été démontré que CrtA obtient l'énergie nécessaire à son fonctionnement via une protéine TonB spécifique (Premuriya et al., 2023). Le lien entre CrtA et l'homéostasie des métaux a été confirmé dans une autre étude (Perraud et al., 2020), qui a observé une augmentation de son expression dans des conditions de limitation en métaux. Dans ces mêmes conditions, l'expression d'autres TBDTs, notamment OprC était également induite, comme attendu en cas de restriction en cuivre.

P. aeruginosa est connue pour sa capacité à détourner les sidérophores produits par d'autres microorganismes (xénosidérophores). En fonction de la disponibilité et du type de ces composés présents dans son environnement, la bactérie adapte son phénotype en activant l'expression des systèmes de transport correspondants, en particulier grâce à systèmes spécifiques sigma ECF-anti sigma. L'expression de CrtA est induite après incubation de la bactérie avec la yersiniabactine, et encore davantage en présence d'un mélange contenant la yersiniabactine, la vibriobactine, le ferrichrome et l'entérobactine (Perraud et al., 2020). Cependant, comme il n'y a pas de Sigma ECF-antisigma codés dans l'opéron de *crtA* chez *P. aeruginosa*, cette induction reflèterait plutôt une carence en cuivre suite à sa complexation par ces métallobactines que la détection du ligand spécifique de CrtA.

Une autre étude portant sur l'importation de sidérophores couplés à des antibiotiques via les TBDTs a montré que la surexpression de *crtA* augmente la sensibilité de *P. aeruginosa* à divers antibiotiques conjugués à des sidérophores, notamment BAL030072, MC-1 et le cefiderocol. Ceci suggère que ces composés peuvent emprunter CrtA comme voie d'entrée (Luscher et al., 2018).

L'expression de l'opéron contenant *crtA* est fortement réprimée en présence de cyanure (HCN) dans le milieu, ainsi que par le quorum sensing, qui régule la production d'HCN chez *P. aeruginosa* (Frangipani et al., 2014; Schuster et al., 2003). Dans ces conditions, l'expression d'*oprC* ne varie pas, suggérant que CrtA et OprC sont régulés différemment et n'ont probablement pas des fonctions redondantes dans le métabolisme du cuivre chez *P. aeruginosa*.

Collectivement, toutes ces données convergent vers l'hypothèse selon laquelle CrtA est un transporteur de cuivre qui n'aurait pas de ligand spécifique produit par *P. aeruginosa*, mais qui pourrait transporter un ou plusieurs xénosidérophores (Luscher et al., 2018).

5. Transport du cuivre par FyuA, un TBDT du complexe Fer-Yersiniabactine

Chez *Yersinia pestis*, des mutants avirulents chez la souris ont été identifiés, dont la virulence est restaurée après ajout de fer (S. Jackson & Burrows, 1956). Ces mutants présentent une délétion d'un îlot de haute pathogénicité (HPI). Les souches porteuses de cet HPI produisent un sidérophore, initialement appelé sidéochrome. Ce composé est importé via un transporteur de la membrane externe nommé Psn, impliqué dans l'import de la bactériocine pesticin (Wake et al., 1975).

Le HPI a été identifié également chez *Y. enterocolitica*, où le sidérophore a pu être purifié et caractérisé. Il a alors été renommé yersiniabactine (Ybt). Ce composé permet le transport du Fe(III) via le transporteur FyuA (anciennement Psn) (Chambers et al., 1996; Haag et al., 1993). La Ybt est un peptide non ribosomique produit par un système NRPS/PKS. Elle se distingue par la présence de trois hétérocycles azotés-soufrés permettant la fixation du Fe(III) (Miller et al., 2006).

Des souches d'*E. coli* uropathogènes possèdent le HPI de *Yersinia*, composé de plusieurs opérons codant pour la biosynthèse de YbT ainsi que des gènes de régulation, de transport et de métabolisme. Les gènes du HPI figurent parmi les plus fortement surexprimés dans un modèle murin d'infection urinaire par *E. coli* uropathogène (Reigstad et al., 2007). La Ybt a été directement détectée par spectrométrie de masse dans des échantillons d'urine de souris et d'humains infectés, et 97% des échantillons présentaient un rapport Cu(II)-Ybt/Fe(III)-Ybt supérieur à 1. Cela a révélé que le Ybt lie le Cu(II) et que ce complexe est stable et peut se former en présence de fer dans les infections urinaires.

Les isolats exprimant la Ybt sont plus résistants au cuivre. La Ybt forme un complexe stable avec le Cu(II), empêchant sa réduction et limitant ainsi la toxicité du cuivre pour la bactérie. Cette fonction révèle un rôle additionnel de la yersiniabactine dans la virulence, indépendant de son rôle classique dans l'acquisition du fer (Chaturvedi et al., 2012).

Il a également été démontré que la Ybt est un métallopeptide à large spectre, capable de lier plusieurs métaux di- et trivalents (Fe(III), Cu(II), Ni(II), Co(III), Cr(III)). De plus, la Ybt ne lie pas seulement le cuivre à forte concentration mais aussi en condition de limitation, ce qui pourrait avoir une fonction nutritionnelle. L'importation du complexe Cu(II)-Ybt, sa dissociation intracellulaire et le recyclage de la Ybt nécessitent FyuA et le complexe YbtPQ de la membrane interne. Comme pour Fe(III)-Ybt, la dissociation du complexe Cu(II)-Ybt passe par une étape de réduction (Koh et al., 2017)

Cependant, Cu(II)-Ybt n'est pas en compétition avec Fe(III)-Ybt pour l'importation via FyuA, même à des concentrations élevées. FyuA transporte préférentiellement Fe(III)-Ybt, suggérant une reconnaissance spécifique. Des modélisations indiquent que le complexe Cu(II)-Ybt a une structure distincte de celle du complexe Fe(III)-Ybt. Dans le premier, les trois atomes d'azote hétérocycliques et l'atome d'oxygène d'un groupement phénolate participent à la formation d'une configuration plane carrée typique autour de l'ion Cu(II), qui diffère de la configuration hexacoordonnée octaédrique du complexe Fe(III)-Ybt (Fig. 17) (Koh et al., 2017).

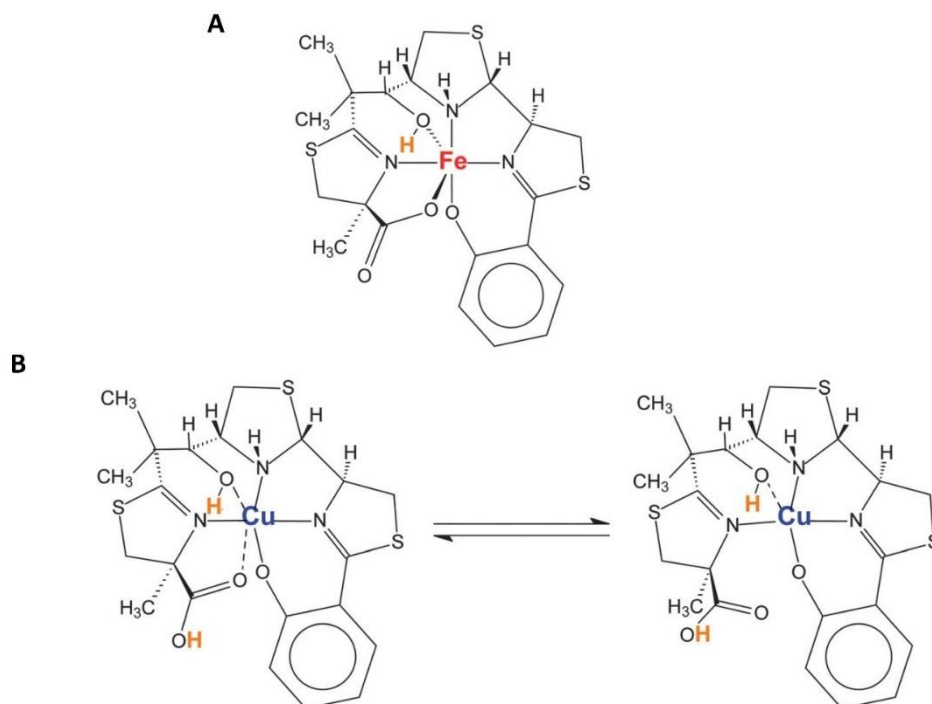


Figure 17. Modélisation des complexes métalliques de la yersiniabactine avec Fe(III) et Cu(II). (A) Complexe hexacoordonné Fe(III)-Ybt présentant une géométrie octaédrique classique. (B) Deux isomères prédits du complexe Cu(II)-Ybt : formes penta/hexa-coordonnées interconvertibles, typiques d'une géométrie carrée plane. Les liaisons axiales Cu-O indiquées par des pointillés sont plus longues, ce qui reflète une coordination plus faible à ces positions (Koh et al., 2015).

6. Transport du cuivre à travers la membrane interne des bactéries à Gram négatif

Le cytoplasme bactérien est un environnement réducteur, où le cuivre se trouve principalement sous forme Cu(I), la forme la plus toxique. Or, les cuproprotéines sont essentiellement localisées dans le périplasma ou la membrane interne. Cependant, au moins pour certaines cuproprotéines, le Cu doit passer par le cytoplasme avant d'être inséré dans leurs sites actifs. De plus, certains régulateurs transcriptionnels impliqués dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre comme CueR sont cytoplasmiques (Rademacher & Masepohl, 2012). Bien que les transporteurs de cuivre de la membrane interne soient encore peu étudiés comparés à ceux d'autres métaux, plusieurs systèmes ont été identifiés.

Chez *Rhodobacter capsulatus*, une mutation dans le gène *ccoA*, codant un transporteur de la famille des MFS (major facilitator superfamily), rend la bactérie dépendante d'un apport en cuivre pour l'assemblage et l'activité de la cytochrome c oxydase cbb_3 (Ekici et al., 2012b). CcoA permet l'assemblage du Cu_B de cbb_3 en travaillant en coordination avec un système codé par l'opéron *ccoGHIS*. Dans ce système, le Cu(II) périplasmique est importé par CcoA vers le cytoplasme, où il est réduit en Cu(I) par une réductase nommée CcoG, puis il est réexporté vers le périplasma par l'ATPase CcoI (Andrei et al., 2021). Une fois dans le périplasma, il est pris en charge par les chaperons à cuivre Scol et pCu_AC pour assembler le centre Cu_B . CcoA constitue le premier exemple de transporteur MFS impliqué dans l'acquisition de cuivre chez les bactéries.

Chez *P. aeruginosa*, l'ATPase de type P HmtA (Heavy metal transporter A) serait impliquée dans le transport du cuivre. Sa surexpression entraîne une hypersensibilité au cuivre, tandis que son absence confère un avantage de croissance à haute concentration de cuivre. L'augmentation du niveau intracellulaire de cuivre en présence de HmtA, même à faibles concentrations, suggère un transport de haute affinité. Ce processus est inhibé par des thiols comme la cystéine (capables de complexer le cuivre), indiquant que HmtA transporterait le cuivre non complexé (Lewinson et al., 2009). Quoique ces données semblent convaincantes, il ne semble pas y avoir d'autres articles qui attribuent une fonction d'importation de métaux à des ATPases de cette famille.

Chez *E. coli*, l'opéron AZY code pour YobA et YebY, deux protéines de liaison périplasmique, et YebZ, une protéine de la membrane interne avec huit hélices transmembranaires (Fig. 18A). La surexpression de YebZ augmente le niveau de cuivre intracellulaire de manière spécifique, dépendante de l'énergie (glucose) et de deux histidines périplasmiques conservées. YobA faciliterait le transfert du cuivre à YebZ, tandis que YebY agirait comme une valve de sécurité en cas d'excès de cuivre, bloquant son importation. Ce système est essentiel à l'activation de l'opéron *mar*, qui confère une résistance aux antibiotiques et est inducible par le cuivre. Le cuivre transporté par YobA peut être livré également à des enzymes de la membrane interne comme NDH-2 (Fig. 18B) (Palmer et al., 2025). Des homologues de YobA et YebZ tels que CopC et CopD sont présents chez *Pseudomonas syringae* (Cha & Cooksey, 1993). Enfin, une étude récente révèle un rôle inattendu pour les canaux mécanosensibles de type MscS dans l'importation du cuivre chez *E. coli*. La suppression du gène *mcsS* diminue significativement l'entrée de cuivre, tandis que sa surexpression l'augmente, entraînant une accumulation intracellulaire et une hypersensibilité au cuivre. Ces canaux semblent également permettre l'importation d'autres métaux, comme le zinc (Ghnamah et al., 2025)

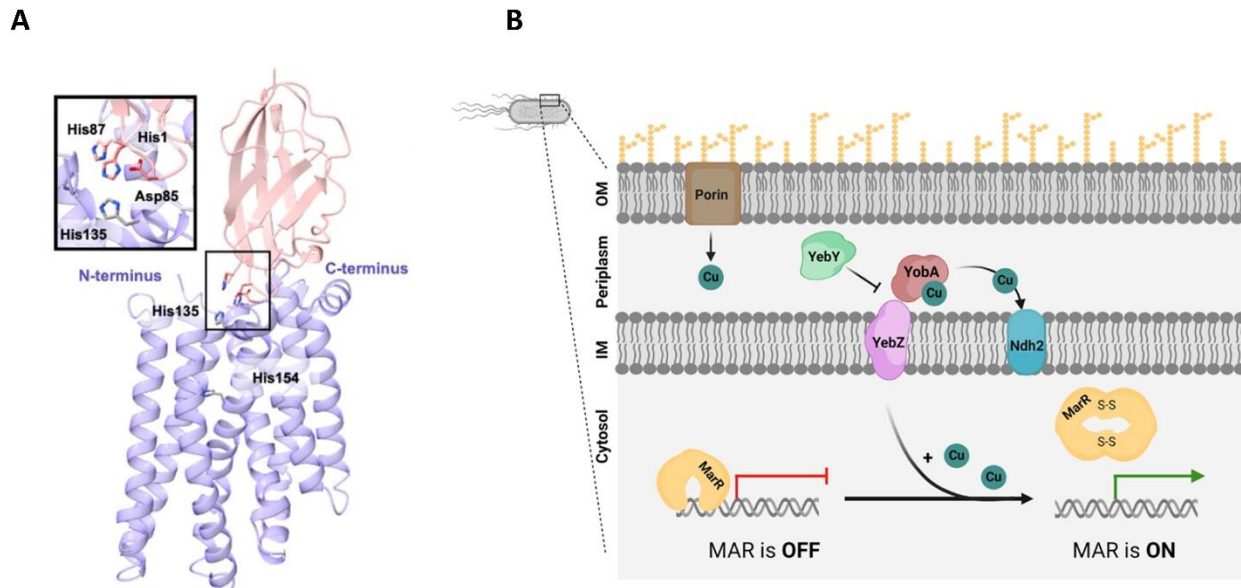


Figure 18. Transport du Cu(II) à travers la membrane interne d'*E. coli* par le transporteur YebZ. A. Modélisation AlphaFold de l'interaction entre YobA (rose) et YebZ (violet), impliqués dans l'importation du cuivre chez *E. coli*. Le site de coordination du cuivre Cu(II) dans YobA et le résidu conservé H135 de YebZ sont mis en évidence. B. Schéma illustrant le rôle de ce complexe dans le transport du cuivre depuis le périplasm vers le cytoplasme, contribuant à l'activation de la voie *mar* (Palmer et al., 2025).

Chapitre IV : *Bordetella pertussis*

1. *Bordetella pertussis* : Modèle d'étude

Le genre *Bordetella*, appartenant à la classe des β -protéobactéries et la famille des *Alcaligenaceae*, est classé en deux grandes catégories : les Bordetelles dites « classiques », qui comprennent *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*, et les espèces « non classiques », telles que *Bordetella holmesii*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella pseudohinzii*, *Bordetella trematum*, *Bordetella avium* et *Bordetella petrii*.

B. pertussis aurait évolué à partir d'un ancêtre proche de *B. bronchiseptica*. Cette évolution s'est notamment traduite par une prolifération marquée des séquences d'insertion (IS) dans le génome. Le génome de *B. pertussis* comporte environ 250 éléments IS481, responsables de divers remaniements génomiques, notamment des délétions. Ces altérations ont contribué à une réduction significative de la taille du génome, avec 3,9 Mbp et 3 576 gènes pour *B. pertussis*, contre 5,34 Mbp et 4 579 gènes chez *B. bronchiseptica*. Cette perte de plus de 1 000 gènes est liée à l'adaptation de *B. pertussis* à un mode de vie exclusivement humain, en tant que pathogène strict (Caulfield & Harvill, 2024).

B. pertussis est un petit coccobacille à Gram négatif, mobile et strictement aérobic. Elle se développe de manière optimale entre 35 et 37 °C et utilise principalement l'oxydation des acides aminés comme source d'énergie. C'est une bactérie particulièrement exigeante sur le plan nutritionnel : elle est difficile à cultiver en laboratoire, très sensible aux détergents ainsi qu'aux acides gras insaturés. Des colonies hémolytiques isolées peuvent être obtenues après 4 à 5 jours d'incubation sur un milieu solide Bordet-Gengou (BG), enrichi avec 10 % de sang de mouton défibriné. Elle peut également être cultivée en milieu liquide Stainer-Scholte (SS), un milieu riche et complexe (MacArthur et al., 2019).

B. pertussis infecte les voies respiratoires supérieures et se transmet par voie aérienne, provoquant la coqueluche. Après inhalation, la bactérie colonise l'épithélium cilié des voies respiratoires supérieures grâce à un ensemble d'adhésines spécifiques (Fig. 19). Elle se multiplie localement, induisant une production accrue de mucus. Certaines de ses toxines provoquent la destruction des cellules épithéliales, ce qui empêche l'élimination efficace du

mucus, entraînant ainsi des quintes de toux sévères conduisant au blocage de la respiration et l'étouffement du malade (Melvin et al., 2014). En plus des symptômes respiratoires, l'infection peut provoquer des complications systémiques telles qu'une hyperleucocytose marquée, avec des taux de leucocytes dépassant parfois les 100 000 cellules/ml (Locht, 2016).

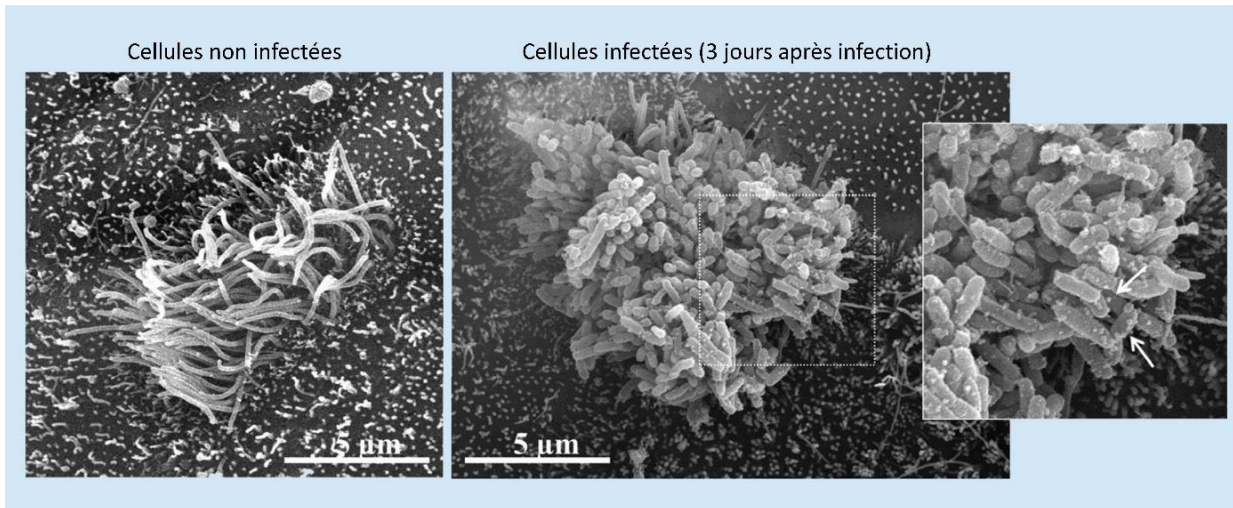


Figure 19. Infection de l'épithélium bronchique humain par *B. pertussis*. Vue en microscopie électronique montrant un épithélium bronchique humain infecté depuis 3 jours. *B. pertussis* forme des micro-colonies sur les cellules ciliées et libère de nombreuses vésicules de membrane externe, indiquées par des flèches (Gasperini et al., 2017).

2. Traitement et vaccination contre *B. pertussis*

Au début de l'infection, les symptômes de la coqueluche peuvent difficilement être distingués de ceux d'autres affections respiratoires, ce qui rend le diagnostic précoce particulièrement difficile. De ce fait, la maladie est souvent identifiée à des stades avancés, caractérisés par des manifestations cliniques plus graves. Il existe un traitement antibiotique qui peut réduire le risque de transmission, constitué principalement de l'érythromycine, l'azithromycine ou la clarithromycine, mais quelques isolats résistants à ces antibiotiques ont été identifiés récemment en Chine et en France (Feng et al., 2021; Ivaska et al., 2022; Rodrigues et al., 2024; Tiwari et al., 2005).

Les premiers vaccins contre la coqueluche étaient des vaccins cellulaires (wPV, whole-cell pertussis vaccines), contenant la bactérie entière inactivée au formaldéhyde. Ces vaccins ont entraîné une chute de l'incidence de la maladie. Toutefois, en raison de leur forte

réactogénicité et des effets secondaires, y compris certains décès, leur usage a été suspendu dans plusieurs pays. Cette interruption a été suivie d'une recrudescence rapide de la maladie. Le vaccin acellulaire (aPV, acellular pertussis vaccine) a ensuite été introduit en 1981 dans les pays industrialisés. Ce vaccin contient entre un et cinq antigènes purifiés de *B. pertussis* (la toxine pertussique, l'hémagglutinine filamenteuse, la pertactine et les fimbriae) associés aux anatoxines diphtérique et tétanique. Néanmoins, l'immunité induite par ce type de vaccin semble décliner rapidement (Szwejsler-Zawislak et al., 2023). Cela a été accompagné par l'émergence de souches de *B. pertussis* présentant des adaptations évolutives, notamment, des souches ne produisant plus de pertactine. D'autres ont augmenté la production de la toxine pertussique, nécessitant une réponse immunitaire plus forte pour être neutralisée (Belcher et al., 2021; Caulfield & Harvill, 2024). Il est également important de noter que les vaccins acellulaires, bien qu'ils préviennent les symptômes de la maladie, n'empêchent pas la colonisation du nasopharynx. Ainsi, même les individus vaccinés peuvent continuer à transmettre la bactérie par voie aérienne (Warfel et al., 2014).

Malgré une couverture vaccinale globalement élevée, une résurgence de la coqueluche a été observée dans plusieurs pays ces dernières années, surtout après la pandémie de COVID-19 (Bricks et al., 2024; Tan et al., 2015).

D'autres formulations vaccinales alternatives sont en cours de développement. Notamment BPZE1, issu de notre laboratoire, est un vaccin cellulaire constitué d'une souche vivante atténuée de *B. pertussis* conçue pour imiter une infection naturelle sans provoquer de maladie. Cette souche a été génétiquement modifiée pour inactiver plusieurs toxines. Administrée par voie intranasale, elle est capable de coloniser le nasopharynx et de déclencher une réponse immunitaire robuste, incluant la production d'anticorps spécifiques. Chez le babouin, la vaccination avec BPZE1 s'est révélée efficace pour prévenir la colonisation après un challenge avec une souche virulente (Locht, 2016; Locht et al., 2017). Parallèlement, d'autres recherches visent à renforcer l'efficacité des vaccins acellulaires actuels en y ajoutant de nouveaux antigènes pour stimuler davantage la réponse immunitaire ou en modifiant l'adjuvant utilisé.

3. Pouvoir pathogène de *B. pertussis*

3.1. Facteurs de virulence

La pathogénèse de *B. pertussis* repose sur l'action de multiples facteurs de virulence, localisés soit à la surface bactérienne, soit sécrétés dans le milieu extracellulaire. Parmi les facteurs de virulence, les adhésines jouent un rôle clé en facilitant l'attachement aux tissus, notamment aux cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires de l'hôte. Les principales adhésines étudiées comprennent l'hémagglutinine filamenteuse, la pertactine et les fimbriae. Pour les toxines, on trouve des toxines non protéiques telles que l'endotoxine (lipooligosaccharides) et la toxine cytotrachéale, un glycopeptide issu de la dégradation du peptidoglycane qui inhibe la synthèse d'ADN dans les cellules épithéliales ciliées et induit leur destruction via la production d'oxyde nitrique. Parmi les toxines protéiques, la toxine de pertussis catalyse l'ADP-ribosylation des protéines $G_i\alpha$ membranaires, perturbant ainsi diverses voies de signalisation cellulaire. L'adénylate cyclase/hémolysine forme des pores dans les membranes des cellules cibles, provoquant un déséquilibre ionique. De plus, elle dérégule la production d'AMP cyclique et ainsi la signalisation cellulaire. Enfin, la toxine dermonécrotique a également une activité enzymatique, agissant principalement sur les GTPases, et les effecteurs du système de sécrétion de type III affectent également la signalisation du cytosquelette d'actine (Kuwae et al., 2016). L'expression de l'ensemble de ces facteurs de virulence est finement régulée par plusieurs systèmes de régulation génétique (Belcher et al., 2021; Loch, 2001).

3.2. Régulation de la virulence

B. pertussis régule l'expression de ses facteurs de virulence à travers un système à deux composants appelé BvgAS. Ce système comprend BvgS, une protéine senseur-kinase, et BvgA, un régulateur transcriptionnel. BvgS s'autophosphoryle, puis transfère ce groupement phosphate à BvgA. L'activation de BvgA entraîne alors l'induction des gènes dits vags (virulence-activated genes), qui codent notamment pour les adhésines et les toxines protéiques mentionnées précédemment.

Sous ces conditions, *B. pertussis* est dans une phase appelée phase Bvg⁺, et adopte un phénotype virulent responsable du développement de l'infection respiratoire. Durant cette phase, le gène *bvgR*, codant pour un répresseur transcriptionnel, est également exprimé. Ce dernier inhibe partiellement l'expression des *vrgs* (virulence-repressed genes) (Chen & Stibitz, 2019; Melvin et al., 2014).

En réponse à certains signaux environnementaux, comme une température inférieure à 25 °C, *B. pertussis* peut entrer dans une phase d'avirulence, dite Bvg⁻, où le système BvgAS devient inactif. Dans cet état, les *vags* ne sont plus exprimés, tandis que les *vrgs* sont fortement induits. Cette phase est associée à la survie dans des environnements pauvres en nutriments. Les signaux qui assurent cette transition *in vivo* restent mal caractérisés. Toutefois, en laboratoire, des composés tels que le sulfate de magnésium ou l'acide nicotinique permettent d'induire cette transition.

Il existe une phase intermédiaire Bvgⁱ, qui correspond à une activité partielle de BvgAS. Chez *B. bronchiseptica*, cette phase favorise la formation de biofilms, suggérant un rôle potentiel dans la persistance bactérienne au cours de l'infection (Irie et al., 2004). Il faut noter que le système BvgAS n'est pas le seul impliqué dans la régulation des gènes de virulence, d'autres systèmes sont impliqués, notamment un second système à deux composants, RisAS, participant à la modulation de certains *vags* et *vrgs* (Coutte et al., 2016).

3.3. Le cuivre chez *B. pertussis*

B. pertussis est une bactérie aérobic stricte. En tant que pathogène humain strict, son protéome est réduit par rapport à celui des bactéries environnementales. Son cuproprotéome comprend deux cytochrome oxydases à hème-cuivre : une ubiquinol oxydase de type bo (bo-Qox) et une cytochrome c oxydase de type aa3 (aa3-Cox), cette dernière étant la cuproprotéine la plus répandue chez les bactéries. La bactérie possède également une superoxyde dismutase périplasmique à cuivre, impliquée dans la protection contre le stress oxydant. *B. pertussis* produit aussi une azurine, petite cuproprotéine périplasmique très abondante, de fonction non caractérisée.

En lien avec l'homéostasie du cuivre, *B. pertussis* encode plusieurs protéines, dont une ATPase de type P1B CopA, une oxydase à multi-cuivre (MCO) périplasmique ainsi que des chaperons

à cuivre, telles que CopZ et CusF. À cela s'ajoutent des régulateurs transcriptionnels sensibles au cuivre : CueR et le système CusRS (Antoine et al., 2019).

Au cours de son évolution vers un mode de vie strictement pathogène, *B. pertussis* a subi une réduction génomique marquée. Elle a perdu plusieurs systèmes de gestion du cuivre, notamment le système d'exportation CusABC. Bien que le gène codant la MCO soit encore présent dans le génome, il n'est plus exprimé à cause de la présence d'IS dans son promoteur (Rivera-Millot et al., 2021). Le gène de CopA reste exprimé et régulé par le cuivre, mais la protéine ne semble pas impliquée dans la protection contre l'excès de cuivre (Rivera-Millot et al., 2021). Quant au système CusRS il n'est pas exprimé du tout en conditions de laboratoire. Ces pertes reflètent vraisemblablement l'adaptation de *B. pertussis* à sa niche, les muqueuses respiratoires humaines, où le cuivre est rarement présent en excès, sauf localement dans les cellules phagocytaires.

Un système de défense spécifique a récemment été mis en évidence grâce à une analyse transcriptomique menée en condition d'excès de cuivre. Cette étude a révélé la surexpression de l'opéron *bp1727-bp1728-bp1729*, codant respectivement CopZ, PrxGrx (une peroxydase glutathion-dépendante) et GorB (une glutathion réductase). CopZ joue un rôle central en liant le Cu(I) cytoplasmique, ce qui prévient sa toxicité et pourrait aussi servir à stocker le Cu en excès. PrxGrx et GorB, quant à elles, protègent la cellule contre le stress oxydatif, notamment induit par le cuivre. L'expression de cet opéron est co-réglée par CueR (sensible au cuivre) et OxyR (sensible aux peroxydes) (Rivera-Millot et al., 2021).

Par ailleurs, cette analyse a montré que l'expression de l'opéron *bp2923-bfrG-bp2921* est fortement réprimée en condition d'excès de cuivre et activée en situation de carence. BfrG est un transporteur TBDT de fonction non caractérisée. Ces résultats suggèrent que cet opéron code un système d'acquisition du cuivre chez *B. pertussis*.

4. Transport des métaux chez *B. pertussis*

4.1. Transport de fer

La colonisation de l'épithélium respiratoire par *B. pertussis* induit un environnement complexe, marqué par l'activation de la réponse inflammatoire et la stimulation du système immunitaire. Dans ce contexte, *B. pertussis* doit acquérir les nutriments essentiels à sa survie,

notamment les métaux de transition. Or, en raison de l'immunité nutritionnelle, la disponibilité de ces métaux est fortement limitée.

B. pertussis produit un unique sidérophore, l'alcaligine, appartenant à la famille des hydroxamates (Fig. 20). Ce sidérophore forme un complexe stable avec le Fe(III) dans un ratio 3:2, avec une constante de stabilité de 10^{37} M^{-1} à pH 6 (Nishio et al., 1988). L'alcaligine est synthétisée par une voie indépendante des NRPS. Le complexe Fe_2Alc_3 est internalisé via le TBDT FauA (Brickman & Armstrong, 1999). L'expression de *fauA*, ainsi que la biosynthèse de l'alcaligine, sont induites en condition de carence en fer, via le régulateur Fur. Un second niveau de régulation est assuré par AlcR, un régulateur transcriptionnel de la famille AraC. En réponse à la déplétion en fer, l'alcaligine exportée par la protéine AlcS est réimportée (vide) via des porines. Une fois internalisée, l'alcaligine agit comme un inducteur en se liant à AlcR, ce qui active alors fortement l'expression de *fauA* pour optimiser l'importation du complexe fer-alcaligine (Fig. 21) (Brickman et al., 2007).

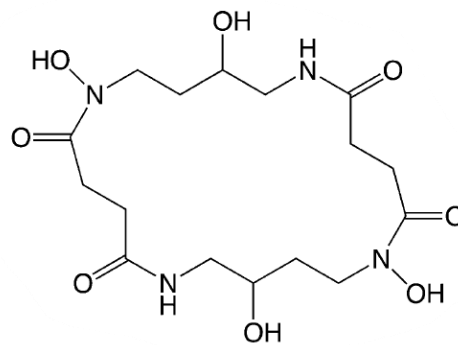


Figure 20. Structure moléculaire de l'alcaligine (Brickman et al., 2007).

Bien que *B. pertussis* soit incapable de synthétiser l'entérobactine, un sidérophore de type catécholate, elle peut néanmoins l'acquérir lorsqu'il est produit par d'autres bactéries, via le TBDT BfeA (Fig. 21) (Beall & Sanden, 1995). L'expression de *bfeA* est également sous le contrôle du régulateur Fur, mais aussi de BfeR, un régulateur de la famille AraC qui comme AlcR interagit avec l'entérobactine libre pour activer l'expression de BfeA. Il a été démontré que BfeA peut aussi reconnaître et importer d'autres sidérophores de type catécholate, des analogues synthétiques tels que le TRENAM et le MECAM, ainsi que certains composés endogènes de l'hôte, notamment des catécholamines (épinéphrine, noradrénaline, dopamine) (Brickman et al., 2007).

B. pertussis peut aussi utiliser l'hème comme source de fer via le TBDT BhuR (Fig. 21). Ce dernier est régulé par Fur et aussi par le système sigma/anti-sigma HurI/R, qui s'active après fixation extracellulaire de l'hème sur le récepteur BhuR et permet d'induire l'expression de *bhuR* (Vanderpool & Armstrong, 2001).

L'ensemble de ces systèmes d'acquisition du fer sont finement régulés et sont utilisés à des stades spécifiques de l'infection. En situation de carence, la répression médiée par Fur des gènes *alcR*, *bfeR* et *hurI/R* est levée, permettant à ces régulateurs spécifiques de détecter la forme de fer disponible et d'activer l'expression du système de transport correspondant (Brickman et al., 2008). Il est important de noter que tous les TBDTs de *B. pertussis* utilisent le même système TonB, car il existe un seul locus codant pour le complexe TonB-ExbBD (Pradel et al., 2000).

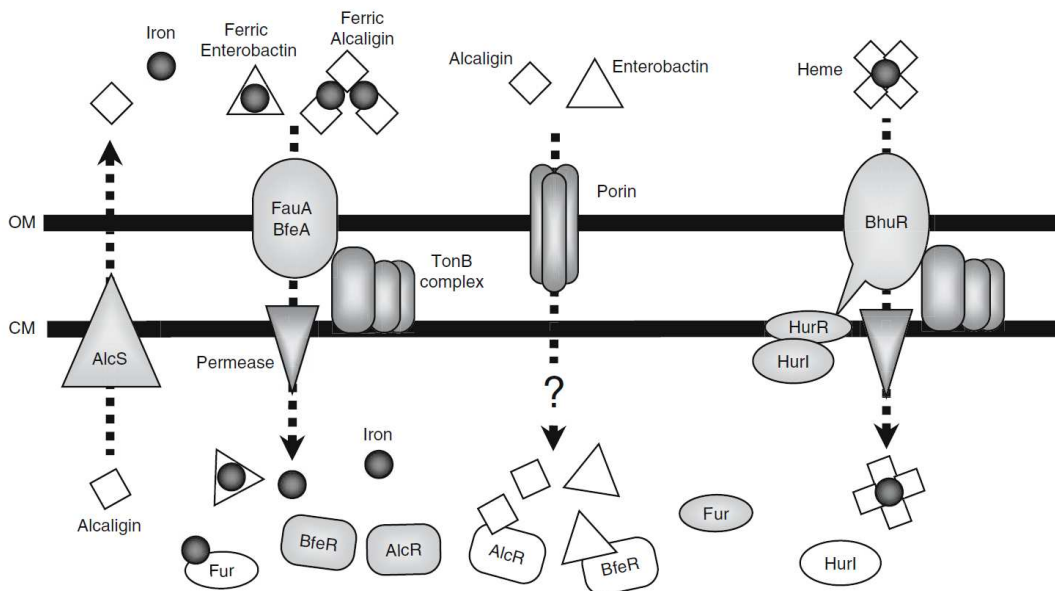


Figure 21. Systèmes connus d'importation de fer chez *B. pertussis*. La réponse de *B. pertussis* à la carence en fer est régulée par Fur et trois régulateurs spécifiques : AlcR, BfeR et HurI/R. Fur réprime leur expression en présence de fer, tandis que leur activation dépend de la présence de chaque ligand (alcaligine, entérobactine ou hème). AlcR et BfeR détectent ces ligands dans le cytoplasme indépendamment des récepteurs FauA et BfeA. HurI/R est activé par la fixation de l'hème sur le récepteur BhuR (Brickman et al., 2007).

4.2. Répertoire des transporteurs TonB-dépendants de *B. pertussis*

En plus de FauA, BfeA et BhuR, *B. pertussis* possède d'autres TBDTs non encore caractérisés. Plusieurs études ont montré que l'expression de certains est réprimée par le fer, suggérant qu'ils sont impliqués dans l'importation du fer, mais leur spécificité n'est pas encore connue.

D'autres TBDTs sont codés dans le génome de *B. pertussis*, mais leur régulation et leur spécificité restent à étudier. Il est possible qu'ils soient destinés à d'autres substrats autre que le fer (Tableau IV).

Tableau III. Liste des TBDTs présents chez *B. pertussis*. Adapté de (Armstrong et al.,2019).

TBDT	Ligand	Régulation	Référence
FauA	Fer-alcaligine	Fur-dépendant, AlcR	(Brickman and Armstrong, 1999)
BfeA	Fer- Enterobactine	Fur-dépendant, BfeR	(Beall and Sanden, 1995)
BhuR	Hème	Fur-dépendant, HurIR	(Vanderpool and Armstrong, 2001)
BfrB*		Fur-dépendant	(Beall, 1998)
BfrC*		Fur-dépendant	(Beall, 1998)
BfrD	Fer-Catecholamines/ Catéchols	Fur-dépendant	(Armstrong et al., 2012)
BfrE	Fer-Catecholamines/ Catéchols	Fur-dépendant	(Armstrong et al., 2012)
BfrF*			
BfrG*		Réprimé par le cuivre	(Rivera-Millot et al., 2021)
BfrH*		Fur-dépendant	(Burgos et al., 2010)
BfrI*		Fur-dépendant	(Alvarez Hayes et al., 2015; Vidakovics et al., 2007)
HemC*			(Armstrong et al., 2012)
Bp3101*			(Armstrong et al., 2012)
Bp3595*			(Armstrong et al., 2012)
Bp3077*			(Armstrong et al., 2012)
Bp1760*			(Armstrong et al., 2012)

*, TBDT de spécificité inconnue

4.3. Autres métallophores produits par *B. pertussis*

Le seul métallophore actuellement identifié chez *B. pertussis* est l'alcaligine, qui permet l'importation du Fe(III) via le transporteur FauA (Brickman & Armstrong, 1999). Toutefois, comme le montre le tableau IV, le génome de *B. pertussis* contient plusieurs gènes codant pour des TBDTs, ce qui suggère que d'autres métallophores pourraient être produits par cette bactérie, mais restent à ce jour non caractérisés.

Un opéron de quatre gènes (*bp2924-bp2927*) a récemment été identifié chez *B. pertussis*. Son expression est régulée par le système à deux composants BvgAS, impliqué dans le contrôle de la virulence. Le gène *bp2924*, codant pour un peptide de type RiPP, figure parmi les plus fortement exprimés en phase de virulence (Bvg⁺), tandis que son expression est complètement réprimée en phase intermédiaire (Bvgⁱ) ou en phase d'avirulence (Bvg⁻) (Coutte et al., 2020).

Cet opéron est situé juste à côté de l'opéron divergent *cruR-bfrG-bp2921*, dont l'expression est réprimée en présence de cuivre et induite en cas de carence. Contrairement à ce dernier, *bp2924-bp2927* ne semble pas être régulé par le cuivre chez *B. pertussis*. Toutefois, un opéron homologue chez *Caulobacter vibrioides* est régulé positivement par le cuivre. Une étude récente a montré que le RiPP correspondant, nommé bufferine, est capable de lier le cuivre et joue un rôle dans la protection contre le stress cuivrique (Leprevost et al., 2024). La fonction de la bufferine codée par *bp2924* chez *B. pertussis* reste à élucider, mais il est possible qu'elle agisse comme métallophore, potentiellement impliquée dans le métabolisme du cuivre.

Par ailleurs, *B. pertussis* pourrait exploiter des xénométallophores produits par d'autres microorganismes présents dans le mucus respiratoire. Ce mucus contient également de nombreux métabolites, dont la concentration peut augmenter à la suite de l'inflammation ou de la lyse des cellules hôtes induite par les toxines de *B. pertussis*. Des analyses de lavages bronchoalvéolaires par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) ont permis d'identifier une grande variété de métabolites (Tableau V), qui peuvent être utilisés comme nutriments par les microorganismes colonisant les voies respiratoires (Armstrong, 2015; Evans et al., 2014; Rai et al., 2012). Certains de ces métabolites peuvent lier des métaux de transition.

Enfin, des composés comme le glutathion ou l'acide ascorbique sont également présents dans cet environnement et pourraient jouer un rôle dans la chimie des métaux ou dans la réponse au stress oxydant (Armstrong, 2015).

Tableau IV. Métabolites présents dans les fluides des voies respiratoires humaines. Adapté de (Armstrong, 2015).

Échantillon	Donneur	Métabolites identifiés
Lavages bronchoalvéolaires	Humains : - Témoins sains - Patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë ou d'une lésion pulmonaire aiguë (les concentrations des métabolites ci-contre sont plus élevées chez ces patients)	<p>Acides aminés : L-glutamate, L-leucine, méthionine, L-phénylalanine, L-proline, L-tyrosine, L-tryptophane, alanine, arginine, aspartate, glycine, leucine, isoleucine, lysine, thréonine, valine, taurine</p> <p>Acides organiques : α-cétoglutarate, cis-aconitate, citrate, succinate, acétate, L-lactate, L-thréonate</p> <p>Sucres : D-glucose</p> <p>Composés azotés : Créatinine, créatine, O-acétylcarnitine, bétaïne</p> <p>Nucléosides / Bases : Guanosine, hypoxanthine, uridine, inosine, adénine</p> <p>Acides gras : Acide palmitoléique, acide arachidonique, acide linoléique</p> <p>Alcools : éthanol</p> <p>Autres : choline, hippurate, bis(2-éthylhexyl) phtalate</p>

Chapitre V : Assemblage du cuivre dans les cytochromes oxydases à hème-cuivre

1. Respiration chez *B. pertussis*

B. pertussis est une bactérie aérobie stricte qui colonise exclusivement le tractus respiratoire humain et utilise l'oxygène comme unique accepteur final d'électrons. Lors du passage du site d'infection initial vers le site de colonisation, elle est exposée à des variations du niveau d'oxygénation, particulièrement lorsque les bactéries sont recouvertes de mucus produit par certaines cellules de l'épithélium respiratoire, ce qui limite la diffusion de l'oxygène. Cela nécessite une adaptation de la bactérie pour respirer efficacement (McKay et al., 2024). L'adaptation des bactéries se traduit par la présence d'une chaîne respiratoire branchée, où différentes cytochromes oxydases terminales peuvent être utilisées selon les conditions environnementales (Fig. 22). Le génome de *B. pertussis* contient six opérons codant pour des cytochromes oxydases terminales appartenant à trois familles distinctes : deux cytochromes *bd* ubiquinol oxydases (CydAB1 et CydAB2), deux cytochromes *bo* ubiquinol oxydases (CyoABCD1 et CyoABCD2), et deux cytochromes *c* oxydases (CtaCDFGE, de type aa_3 , et CcoNOQP, de type cbb_3). Les deux dernières familles appartiennent au groupe des HCOs (hème-copper oxydases) (Kranz et al., 2002).

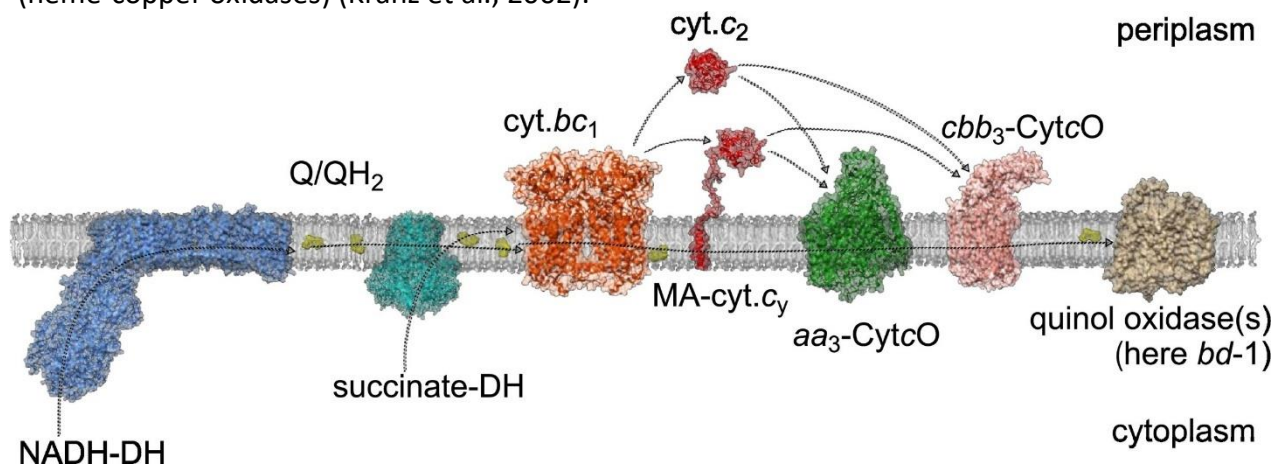


Figure 22. Représentation schématique d'une chaîne respiratoire bactérienne branchée. L'espèce choisie comme exemple est *Rhodobacter sphaeroides*. Le NADH et le succinate sont oxydés par les complexes NADH déshydrogénase et succinate déshydrogénase, transférant leurs électrons vers le pool de quinones (Q) pour former des quinols réduits (QH₂). Ces QH₂ alimentent soit directement les quinol oxydases terminales (ex. cytochrome *bd* oxydase, et *bo* chez *B. pertussis*), soit le complexe *bc*₁, qui transfère les électrons aux cytochromes *c* périplasmiques solubles (cyt. *c*₂) ou membranaires (MA-cyt. *c*_γ). Les électrons sont ensuite dirigés vers la cytochrome *c* oxydase terminale (*aa*₃ ou *cbb*₃), qui réduit l'O₂ en H₂O (Fedotovskaya et al., 2021).

Au cours de son évolution, marquée par une réduction génomique, *B. pertussis* aurait perdu l'expression ou la fonction d'une oxydase dans chacune de ces familles et n'a conservé que CydAB (bd-Qox, codée par *bp0259-0260*), CyoABCD (bo-Qox, codée par *bp2930-2933*) et CtaCDFGE (aa3-Cox, codée par *bp3740-3744*). Cette organisation est observée chez tous les isolats de *B. pertussis*, suggérant que ces trois oxydases constituent une composition minimale suffisante pour permettre l'adaptation de la bactérie aux variations environnementales au cours de l'infection et lors de la transmission (McKay et al., 2024).

À l'inverse, *B. bronchiseptica*, qui occupe différentes niches environnementales, possède huit cytochromes oxydases terminales (McKay et al., 2024). Chez cette espèce, l'inactivation simultanée des trois oxydases conservées de *B. pertussis* est impossible, et leur seule présence suffit à assurer une croissance *in vitro* équivalente à celle de la souche sauvage. L'expression individuelle de chacune de ces oxydases permet d'obtenir des niveaux de croissance, de production d'ATP et de force proton-motrice comparables à ceux de la souche parentale. Cependant, dans des conditions pauvres en oxygène (5 % et 2 % O₂), le mutant de CydAB présente un léger défaut de croissance par rapport à la souche sauvage, et son expression augmente en faible oxygénation par rapport à l'air ambiant. Selon cette étude, cette oxydase est prédite comme ayant une haute affinité pour l'oxygène, contrairement à CyoABCD et CtaCDFGE, considérées comme ayant une faible affinité (McKay et al., 2024).

Chez *B. bronchiseptica*, un mutant exprimant uniquement les oxydases conservées de *B. pertussis* survit et colonise le tractus respiratoire de la souris aussi efficacement que la souche sauvage, tout comme un mutant exprimant uniquement la cytochrome *bo* ubiquinol oxydase CyoABCD (McKay et al., 2024). Par ailleurs, il a été démontré que CyoABCD et CtaCDFGE sont conditionnellement essentielles à la survie *in vivo* de *B. pertussis* (Gonyar et al., 2019). De façon similaire, l'inactivation de *cyoABCDE* (Cyt oxydase bo₃) chez *P. aeruginosa* diminue la capacité de la souche à se multiplier dans un modèle animal d'infection systémique, cela était le cas également pour les autres oxydases impliquées dans la respiration aérobie (Skurnik et al., 2013). Le rôle central de CyoABCD dans la respiration *in vivo* pourrait être lié à sa capacité d'adaptation à une faible oxygénation et plus largement à une gamme de concentrations en oxygène, comme décrit chez *Rhizobium etli* (Lunak & Noel, 2015).

2. Les HCOs de *B. pertussis*

2.1. La cytochrome c oxydase de type aa₃

La cytochrome c oxydase de type aa₃ (aa₃-Cox) est largement répandue chez les bactéries, en particulier au sein des α-protéobactéries, et se retrouve également dans les mitochondries des eucaryotes. Sa structure a été résolue par cristallographie et révèle un complexe formé de quatre sous-unités (SU). La SU-I contient le centre Cu_B associé à l'hème a₃, formant ensemble le centre hème-cuivre, tandis que la SU-II renferme le site binucléaire Cu_A, constitué de deux atomes de cuivre présentant une valence mixte (Cu(II)-Cu(I)) (Fig. 23) (Kaila & Wikström, 2021).

Dans cette famille d'oxydases, les électrons produits par l'oxydation des cytochrome c périplasmique sont transférés successivement vers le site binucléaire Cu_A, puis vers l'hème a, et enfin vers le centre hème a₃-Cu_B, où s'effectue la réduction de l'oxygène en H₂O (Fig. 23). Cette réduction nécessite quatre électrons, mais un seul est transféré à la fois. Ce transfert d'électrons est accompagné d'un transfert de quatre protons à travers la membrane, contribuant ainsi à l'établissement de la force proton-motrice, et de quatre protons pour produire deux molécules d'eau (Belevich et al., 2006).

2.2. La cytochrome bo ubiquinol oxydase

La cytochrome bo ubiquinol oxydase (bo-Qox) est composée de quatre SU qui s'assemblent pour former un complexe fonctionnel. Parmi elles, seule la SU-I contient des cofacteurs et constitue l'élément central de l'oxydase. Cette SU ressemble à la SU-I de la aa₃-Cox, elle se caractérise par la présence d'un hème b et d'un centre hème o-Cu_B, où se fixe l'O₂ avant d'être réduit en H₂O. Les électrons nécessaires à cette réaction proviennent de l'oxydation de l'ubiquinol, qui se lie directement à l'oxydase via deux sites distincts : un site à faible affinité et un site à haute affinité, situé à proximité de l'hème b. Au cours de l'oxydation de l'ubiquinol, des protons sont transférés à travers la membrane, contribuant ainsi à l'établissement de la force proton-motrice (Fig. 23).

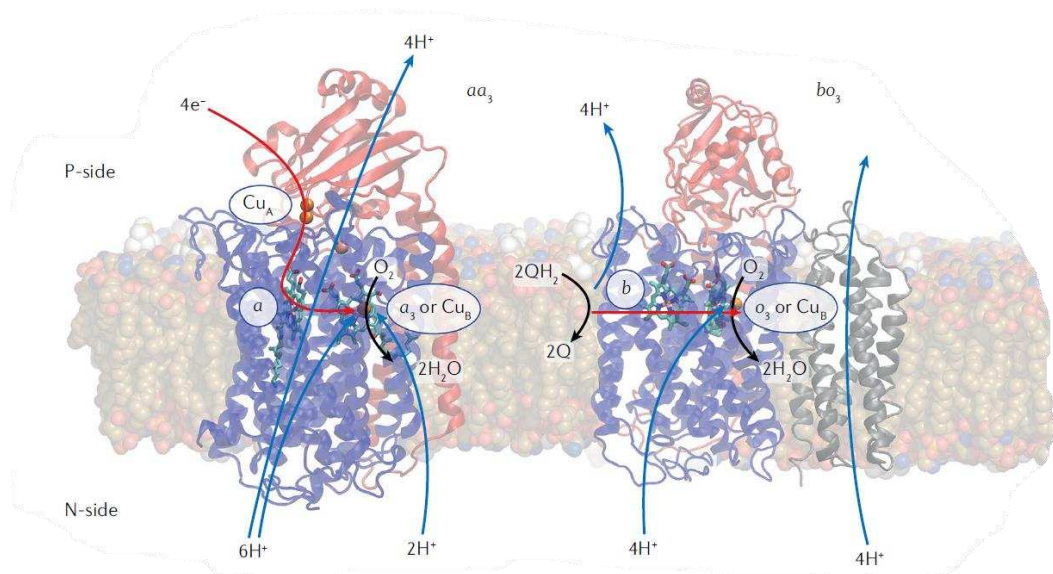


Figure 23. Structures des oxydases hème-cuivre $\alpha\alpha_3$ -Cox (PDB ID 3HB3) et $b\alpha_3$ -Qox (PDB ID 1FFT) impliquées dans la respiration aérobie. Ces enzymes catalysent chacune une réduction complète de l'oxygène en H_2O en utilisant quatre électrons par cycle catalytique. Flèches rouges = transfert d'électrons, flèches bleues = translocation de protons, flèches noires = réactions chimiques. Abréviations : Q = quinone ; QH_2 = quinol (Kaila & Wikström, 2021).

3. Assemblage des cofacteurs à cuivre dans les HCOs

3.1. Assemblage du Cu_B

Le centre Cu_B est ubiquitaire et conservé dans toute la famille des HCOs. Il est constitué d'un seul atome de $Cu(I)$, coordonné par trois histidines très conservées et situé à proximité d'un atome de fer lié à un hème (o , $\alpha_3...$) (Fig. 24). Ce site est profondément enfoui dans la membrane et isolé du solvant, assurant ainsi un environnement contrôlé pour la réduction de l' O_2 en H_2O (Nyvltova et al., 2017).

Chez plusieurs bactéries Gram négatives, l'assemblage du Cu_B dépend de l'activité de la protéine CoxG/CtaG, homologue de la protéine mitochondriale Cox11. CtaG est une protéine de 34 kDa composée d'un domaine C-terminal périplasmique de type β -immunoglobuline et d'un domaine N-terminal formé d'une hélice α ancrée dans la membrane interne. Le domaine périplasmique porte un motif Cys-X-Cys très conservé, impliqué dans la liaison du $Cu(I)$. Les deux domaines sont reliés par un linker flexible de 15 acides aminés. CtaG forme un homodimère (Banci et al., 2004).

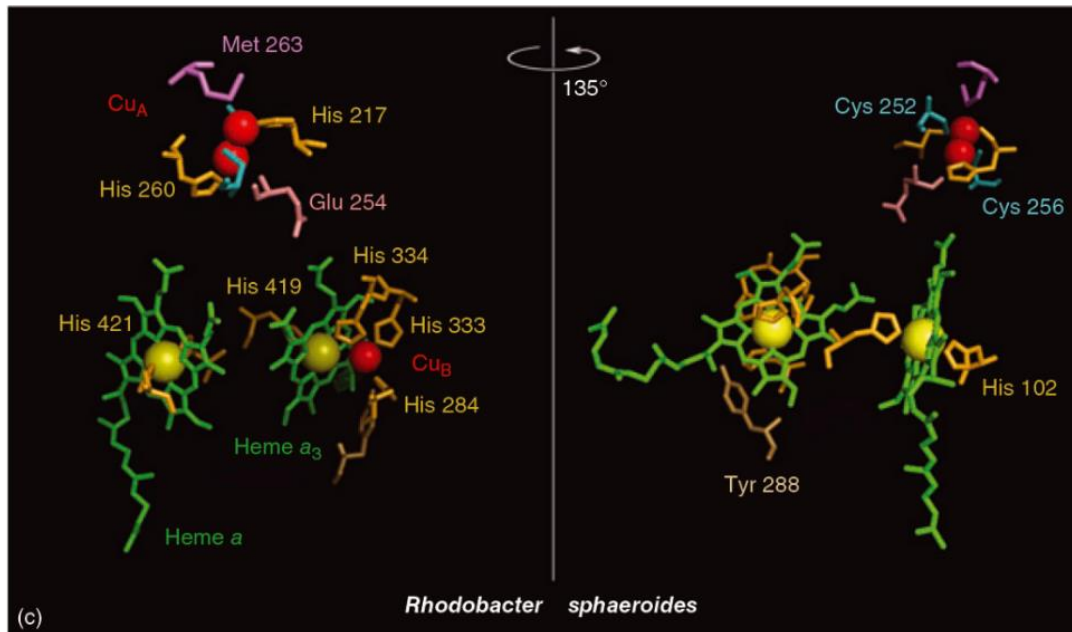


Figure 24. Centres métalliques rédox Cu_A et Cu_B de aa_3 -Cox de *Rhodobacter sphaeroides*. La structure de la protéine a été cachée pour ne montrer que les centres métalliques. Le Cu_B , un ion cuivre coordonné par trois histidines (His-333, His-334, His-284), est situé à 4,5 Å du fer de l'hème actif et couplé magnétiquement à celui-ci. Le Cu_A est un cluster binucléaire relié par deux cystéines et coordonné par une histidine et une méthionine en plus d'un groupement carbonyle de la protéine (Nyvtova et al., 2017).

Chez *R. sphaeroides*, l'expression de la aa_3 -Cox en absence de CtaG (Cox11) conduit à la production d'une oxydase contenant le Cu_A mais dépourvue de Cu_B (Hiser et al., 2000). Chez *B. japonicum*, un mutant délété de CtaG est déficient pour l'activité de la aa_3 -Cox, un défaut qui n'est pas compensé par la supplémentation en cuivre, suggérant que le Cu_B ne peut pas s'autoassembler et qu'aucune autre protéine ne peut remplacer CtaG. Toutefois, CtaG n'est pas essentielle pour la biogenèse de la cbb_3 -Cox qui contient également un Cu_B , ce qui suggère l'existence d'un mécanisme d'assemblage distinct pour cette oxydase (Bühler et al., 2010).

La manière dont CtaG assemble le Cu_B constitue une question majeure dans les recherches sur la biogenèse des oxydases. Le Cu_B étant enfoui profondément dans la SU-I de l'oxydase, son insertion au moment de la traduction présenterait un risque, car le cuivre exposé transitoirement dans le cytoplasme pourrait catalyser la formation des ROS. Un scénario d'insertion post-traductionnelle a été proposé après la découverte d'un canal dans la SU-I donnant accès directement au Cu_B (Fig. 25). Ce canal n'est plus accessible après l'assemblage

avec la SU-II, ce qui suggère que CtaG insérerait le Cu_B après l'insertion de la SU-I dans la membrane mais avant son association avec la SU-II (Greiner et al., 2008).

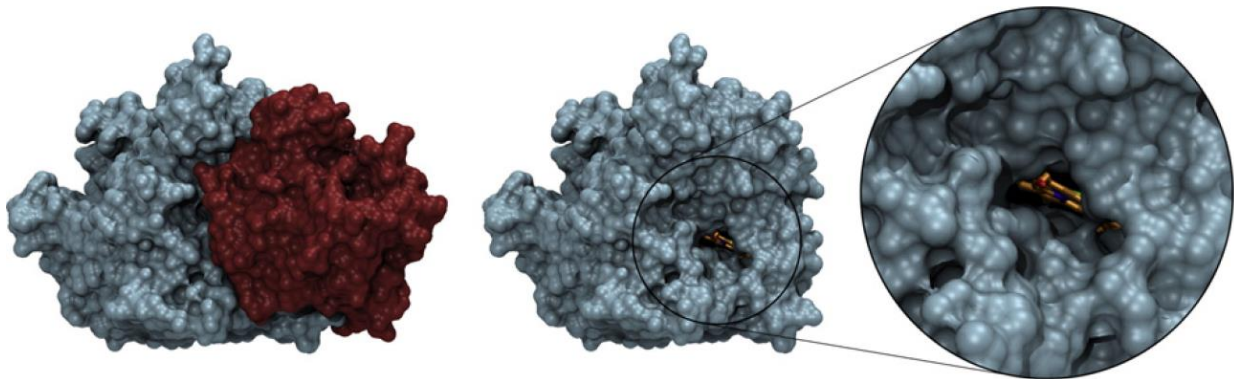


Figure 25. Canal d'accès au centre Cu_B de la cytochrome c oxydase de *Paracoccus denitrificans*. Les SU-I (bleu) et II (rouge) s'assemblent dans l'enzyme native. En absence de la SU-II, un canal menant au centre binucléaire hème a_3 : Cu_B (hème a_3 en orange) (Greiner et al., 2008) .

L'analyse de la séquence de CtaG a révélé la présence d'une cystéine conservée (Cys-35) située directement à la surface de la membrane interne. Chez *R. sphaeroides*, la substitution de la Cys-35 n'affecte pas la liaison du $Cu(I)$ à CtaG mais réduit l'activité de la aa_3 -Cox, indiquant que cette Cys intervient dans le transfert du $Cu(I)$ vers les histidines du centre Cu_B . Un modèle d'insertion du cuivre dans le Cu_B a été proposé (Fig. 26). L'homodimère de CtaG, portant un cluster $[Cu(I)-2\ Cys]$, flotterait au-dessus de la membrane, orienté vers la SU-I grâce à la flexibilité conférée par le linker de 15 acides aminés. Les clusters s'approcheraient des deux Cys-35, ce qui assurerait le transfert du $Cu(I)$ vers les groupements imidazoles des histidines conservées du Cu_B , via le canal de la SU-I, avant l'association avec la SU-II (Nyvltova et al., 2017).

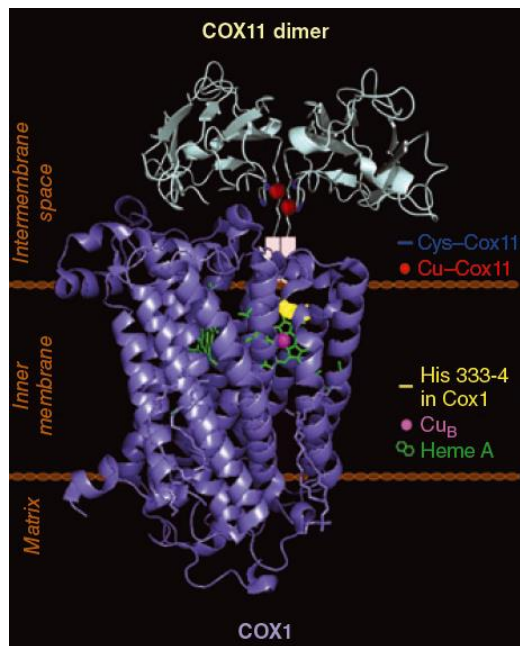


Figure 26. Modèle de transfert du cuivre vers la SU-I (Cox1) de la Cox-aa₃ par CtaG (Cox11). L'homodimère de CtaG est positionné au-dessus de la SU-I, avec son cluster [2Cu(I)-4S] (Cu en rouge, Cys en bleu) orienté vers la surface membranaire via des linkers flexibles de 15 acides aminés. Le centre Cu_B de la SU-I (magenta) et ses ligands His-333/His-334 (jaune) (non représentés) se trouvent à proximité des Cys-35 de CtaG, facilitant un transfert direct du Cu(I) (Nylvtova et al., 2017).

E. coli ne possède ni cytochrome c oxydase ni CtaG, mais possède une cytochrome oxydase de type bo₃ contenant un Cu_B. L'expression hétérologue de aa₃-Cox chez *E. coli* produit une SU-I dépourvue de Cu_B, ce qui suggère que la machinerie d'assemblage du Cu_B de la cytochrome oxydase bo₃ ne peut pas assembler celui de la aa₃-Cox. La coexpression de aa₃-Cox et CtaG chez *E. coli* ne rétablit pas l'assemblage du Cu_B, suggérant l'intervention d'autres chaperons dans ce processus (Greiner et al., 2008).

Une étude sur l'assemblage des cofacteurs cuivre dans aa₃-Cox chez *R. sphaeroides* a montré que deux chaperons à cuivre, PCu_{AC} et Scol, peuvent également contribuer à l'assemblage du Cu_B. L'absence de Scol, et dans une moindre mesure de PCu_{AC} affecte l'assemblage du Cu_B, surtout lorsque la concentration en cuivre est faible. L'ajout de cuivre compense partiellement ce défaut, mais en absence de CtaG, la présence de PCu_{AC} et Scol ne suffit pas à assembler le Cu_B. Une explication possible est que ces deux chaperons livrent le cuivre à CtaG, qui assurerait ensuite la métallation efficace du centre Cu_B (Thompson et al., 2012).

L'assemblage du Cu_B dans la cbb₃-Cox chez *Rhodobacter capsulatus* est assuré par un système codé par l'opéron *ccoGHIS*. Le Cu(II) dans le périplasme est importé par le transporteur MFS CcoA, vers le cytoplasme, où il est réduit en Cu(I) par une réductase appelé CcoG, puis Cu(I) est réexporté vers le périplasme par l'ATPase de type P1B CcoI (Andrei et al., 2021). Une fois dans le périplasme, il est pris en charge par les chaperons Scol et PCu_{AC} pour assembler le centre Cu_B. CcoH et CcoS seraient des protéines accessoires d'assemblage de cbb₃-Cox.

3.2. Assemblage du centre Cu_A

La SU-II de aa₃-Cox possède un domaine globulaire formé de dix brins β, exposé au périplasma et servant de site de liaison au cytochrome c (Fig. 23). Ce domaine est ancré dans la membrane par deux hélices transmembranaires.

À la base de ce domaine, près de la surface de la SU-I se trouve le centre Cu_A, constitué de deux ions cuivre (Cu(I) et Cu(II)) très proches (2,5 Å), formant un état à valence mixte. Ils sont coordonnés par deux cystéines, Cu_{A1} étant aussi lié par une histidine et une méthionine, et Cu_{A2} par une histidine et un glutamate (Fig. 24) (Canonica et al., 2019a; Nyvltova et al., 2017).

Le centre Cu_A est proche de la surface de la SU-I et devient peu accessible après l'association des deux sous-unités, suggérant que son assemblage se fait avant l'association des deux sous-unités (Nyvltova et al., 2017) mais après insertion de la SU-II dans la membrane (Fiumera et al., 2007). Dans l'environnement oxydant du périplasma, les deux cystéines forment un pont disulfure, ce qui nécessite une étape de réduction avant la métallation.

Chez plusieurs bactéries, l'assemblage du Cu_A implique trois protéines, Scol, PCu_AC et TlpA. La protéine Scol (aussi SenC/PrrC), est une protéine avec un domaine périplasmique de type thiorédoxine ancré par une hélice transmembranaire, liant un Cu(I) ou Cu(II) via deux cystéines et une histidine (Siluvai et al., 2011). La protéine PCu_AC est une protéine périplasmique soluble liant un Cu(I) avec forte affinité sur un site central, et un Cu(II) avec faible affinité sur une extension C-terminale. Enfin, TlpA est une protéine membranaire à domaine thiorédoxine périplasmique, dotée d'une activité dithiol-disulfure oxydoréductase, capable de réduire le pont disulfure du site Cu_A et de recycler Scol après libération de son cuivre (Abicht et al., 2014; Canonica et al., 2019a; Canonica et al., 2019b).

Chez *Bacillus subtilis*, la délétion de Scol perturbe la cytochrome oxidase caa₃ (qui possède un Cu_A) mais pas la quinol oxydase (qui possède un Cu_B sans Cu_A) (Hill & Andrews, 2012). Chez *R. sphaeroides*, il a été montré que l'absence de Scol ou PCu_AC affecte à la fois l'assemblage du centre Cu_A et du centre Cu_B, surtout en carence en cuivre. Leurs fonctions ne sont pas redondantes et l'excès de PCu_AC ne compense pas l'absence de Scol. L'ajout de cuivre permet de restaurer partiellement l'assemblage du Cu_A chez ces mutants, suggérant que ce centre pourrait s'autoassembler en présence d'excès de cuivre (Thompson et al., 2012). Cependant,

l'ajout du cuivre ne permet de restaurer l'activité cytochrome c oxydase chez un mutant de TlpA chez *B. japonicum* (Abicht et al., 2014). Pour les bactéries dépourvues de TlpA, il a été suggéré que ScoI puisse réduire le site de fixation de Cu_A grâce à son domaine thiorédoxine (Abriata et al., 2008).

Un modèle d'assemblage du centre Cu_A a été proposé chez *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Fig. 27), où ScoI-Cu(II) forme un complexe avec la SU-II apo de aa₃-Cox, puis la protéine PCu_AC-Cu(I)/Cu(II), transfère le Cu(II) de son extension C-terminale à ScoI. Ceci permettrait la dissociation du complexe, avec Cu(II) passé à aa₃-Cox, et le "recyclage" de ScoI-Cu(II). Le Cu(I) du centre Cu_A serait livré par une deuxième protéine PCu_AC. Seul le cuivre lié à l'extension C-terminale de PCu_AC est transférable, nécessitant le transfert d'un électron intramoléculaire entre les deux cuivres. Il faut noter que selon ce modèle PCu_AC se retrouve après assemblage de Cu_A avec un Cu(II) non-transférable dans son site central, alors qu'au départ il portait un Cu(I).

Bien qu'un excès de cuivre puisse compenser partiellement l'activité de ScoI et de PCu_AC, *in vivo* la concentration en cuivre libre est strictement contrôlée, rendant ces chaperons importantes à la biogenèse de la cytochrome c oxydase (Canonica et al., 2019b).

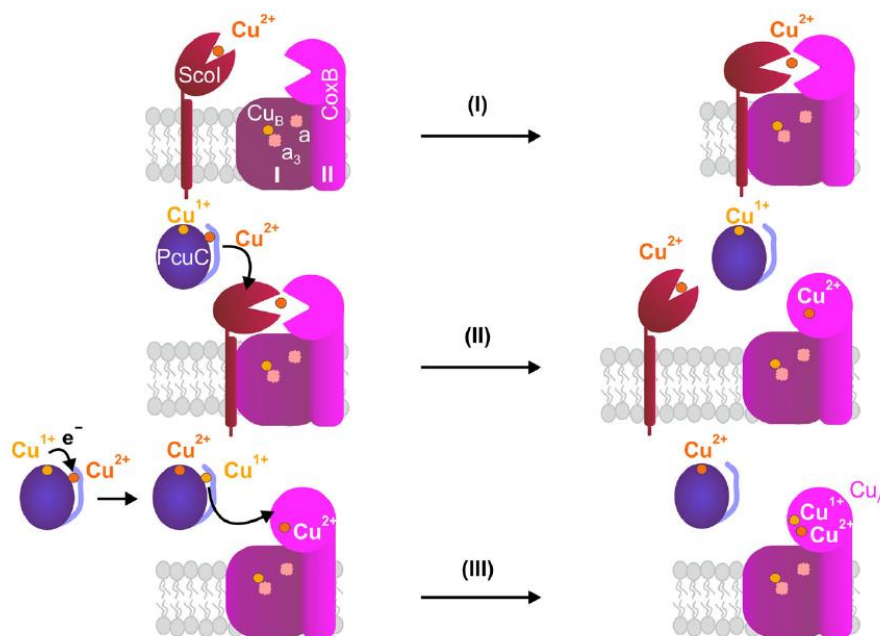


Figure 27. Schéma de la biosynthèse du centre Cu_A et de son insertion dans la sous-unité II (CoxB) de la cytochrome c oxydase de *B. diazoefficiens* (Canonica et al., 2019a).

L'ensemble de ces exemples d'assemblage des centres à cuivre des cytochromes oxydases illustre la grande diversité des mécanismes impliqués, faisant intervenir différentes protéines selon la nature des cytochromes oxydases et les espèces bactériennes concernées, témoignant ainsi d'une remarquable plasticité.

4. Mécanismes de réduction du cuivre

En conditions aérobies, le cuivre est majoritairement présent sous forme oxydée Cu(II), la forme soluble. Toutefois, dans le site actif des cuproenzymes comme les HCOs, il doit être partiellement sous forme réduite Cu(I), ce qui rend sa réduction essentielle. Les données sur ce processus chez les procaryotes restent limitées. Chez *Lactococcus lactis*, la réduction du Cu(II) peut se produire de manière non enzymatique grâce aux ménaquinones de la chaîne respiratoire (Abicht et al., 2013). Chez *E. coli*, une NADH-déshydrogénase de la chaîne respiratoire catalyse le transfert d'électrons du NADH, du FAD ou des quinols vers le Cu(II), entraînant sa réduction (Rapisarda et al., 1999). Il s'agit d'exemples de réduction 'accidentelle' non spécifiquement dédiée à l'insertion de Cu(I) dans les sites actifs des HCOs.

Dans le système d'assemblage du centre Cu_B de cbb₃-Cox chez *R. capsulatus*, la réductase CcoG possède un site actif cytoplasmique avec des cystéines conservées liant deux clusters [4Fe-4S] ainsi que deux atomes de cuivre. Elle catalyse spécifiquement la réduction du Cu(II) en Cu(I) dans le cytoplasme, possiblement avec un électron provenant du pool quinone/quinol. Bien que le gène *ccoG* soit souvent associé aux gènes codant cbb₃-Cox, la présence d'homologues dans des bactéries dépourvues de ce type d'oxydase suggère qu'il joue un rôle plus large que la biogenèse du centre Cu_B (Marckmann et al., 2019).

Chez *B. pertussis*, l'opéron *cruR-bfrG-bp2921*, régulé par le cuivre, contient le gène *bp2921* qui code pour une protéine de membrane interne appartenant à la famille PepSY-TM. Certains membres de cette famille ont été caractérisés comme réductases du Fe(III) en Fe(II) dans le périplasme. Il est donc possible que Bp2921 agisse comme réductase du Cu(II) en Cu(I).

5. Réductases de la famille PePSY-TM

La famille PepSY-TM est une grande famille de protéines, dont les quelques membres caractérisés sont des réductases associées à l'importation de complexes métal-sidérophore. Récemment chez *P. aeruginosa*, la structure cristalline et la fonction d'un membre de la famille

PepSY-TM ont été caractérisés (Josts et al., 2021). Il s'agit de FoxB, codée dans le même opéron que FoxA, un TBDT des complexes Fe(III)-ferrioxamine B et Fe(III)-nocardamine. Cet opéron est sous la régulation de Fur et du système sigma/anti-sigma FoxI/FoxR.

Après importation des complexes Fe(III)-sidérophore, le fer doit être libéré pour être assimilé, ce qui peut passer par la réduction de Fe(III) en Fe(II) afin de diminuer l'affinité pour le sidérophore (voir ci haut, paragraphe 3.1, chapitre II). Cette étude a montré que FoxB est une réductase de Fe(III) en complexe avec la ferrioxamine B dans le périplasma. Elle est capable de réduire aussi le Fe(III) en complexe avec la nocardamine.

FoxB est une protéine de la membrane interne avec quatre segments transmembranaires (TM), deux grands domaines périplasmiques et une boucle cytoplasmique entre le TM2 et le TM3 (Fig. 28). Elle coordonne deux hèmes via quatre histidines conservées et contient deux tryptophanes conservés au niveau de ces hélices transmembranaires, nécessaires pour le transfert d'électron et l'activité réductase. Les deux domaines PepSY forment une large cavité périplasmique, à l'intérieur de laquelle se produit la réduction du Fe(III) en complexe avec le sidérophore (Josts et al., 2021).

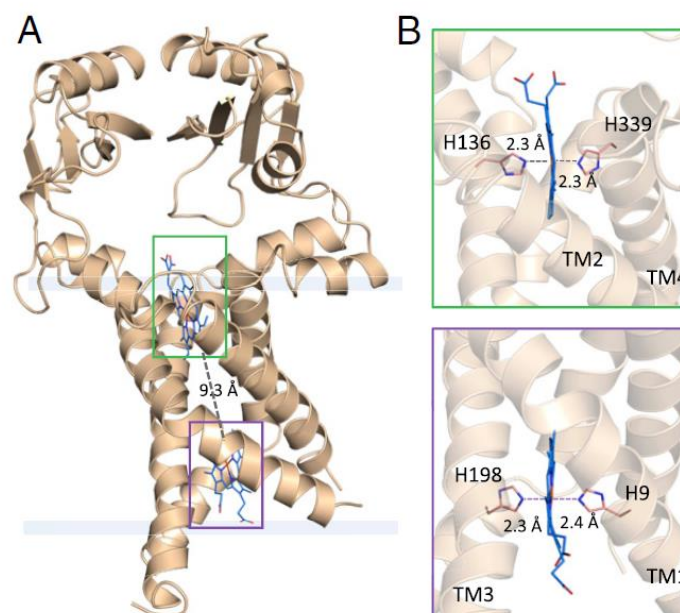


Figure 28. Structure de FoxB, une réductase du Fe(III) lié à la ferrioxamine B chez *P. aeruginosa*. (A) Organisation en quatre hélices transmembranaires avec deux domaines périplasmiques PepSY. La localisation des deux hèmes est montrée. (B) Coordination des hèmes par les hélices transmembranaires. Les hèmes sont situés en périphérie de la bicouche lipidique. Les histidines coordonnant le fer sont indiquées.

Quelques autres réductases de Fe homologues à des protéines de la famille PepSY-TM ont été étudiées. VciB chez *Vibrio cholerae* (famille PEPSY_TM-like2) est codée par un opéron qui code également pour un TBDT, VciA. VciB est une protéine à trois segments transmembranaires et une large boucle périplasmique, contenant deux histidines conservées indispensables à son activité. Elle forme un homodimère très stable qui résiste à la purification par détergent (Peng & Payne, 2017).

VciB a été identifié grâce à son rôle dans la stimulation de la croissance en condition de carence en fer. La présence de VciB augmente la proportion de Fe(II) périplasmique, disponible pour le transport à travers la membrane interne, indépendamment d'un système de transport de Fe(II) spécifique (Mey et al., 2008). Il a été ensuite montré que VciB agit en tant que réductase de Fe(III) en Fe(II). Cette fonction ne dépend pas de la présence de VciA, bien qu'une analyse *in silico* ait montré que les gènes homologues à *vciB* sont souvent à côté de gènes codant des TBDTs ou des protéines TonB. La complémentation de VciB par des orthologues a permis de restaurer la fonction de réductase de Fe(III), bien que certains orthologues n'aient pas de TBDT associé, suggérant que la fonction de la réductase peut être séparée de celle du TBDT. Chez *B. japonicum*, FrcB une protéine membranaire de la famille cytochrome b561 caractérisée par la présence de quatre hélices transmembranaires comportant quatre résidus histidine hautement conservés impliqués dans la coordination de deux groupes hème, un modèle structurel proche de FoxB. Il a été montré que FrcB est capable de réduire un large éventail de complexes Fe(III), incluant des sidérophores de type hydroxamate, catécholate et des chélateurs synthétiques (Small & O'Brian, 2011). Une autre protéine homologue de la famille cytochrome b561 a été identifié chez *P. aeruginosa* est FpvG, une protéine de la membrane interne qui joue un rôle essentiel dans la dissociation du complexe Fe(III)-pyoverdine. FpvG est une réductase qui réduit le Fe(III) complexé à la pyoverdine. Cette activité s'effectue en association avec d'autres protéines, notamment FpvH, FpvJ et FpvK. Le Fe(II) ainsi libéré est ensuite complexé par FpvC, une protéine périplasmique qui agit comme chélateur du Fe(II) après sa dissociation de la pyoverdine. FpvC participe probablement ensuite au transfert du métal vers le transporteur ABC FpvDE, assurant son importation vers le cytoplasme (Ganne et al., 2017).

Ces travaux montrent que la fonction réductase de Fe(III) semble être conservée dans ce type de protéines de la membrane interne.

6. Objectifs de la thèse

Dans cette analyse bibliographique, nous nous sommes intéressés au cuivre et à son interaction avec les bactéries à Gram négatif. En raison de sa solubilité et de sa disponibilité en milieu oxygéné, le cuivre constitue un cofacteur essentiel pour plusieurs enzymes bactériennes. Il est indispensable à la survie de ces microorganismes, mais devient rapidement toxique lorsqu'il est présent en excès. Le cuivre représente donc une ressource nutritionnelle critique que les bactéries doivent acquérir et utiliser avec une régulation particulièrement fine.

Les mécanismes de résistance à la toxicité du cuivre ont été largement étudiés chez les bactéries à Gram négatif. En revanche, les mécanismes d'importation restent très peu connus, bien que la présence de cuproprotéines dans ces organismes implique l'existence de systèmes d'acquisition du cuivre.

Nous avons choisi *Bordetella pertussis* comme organisme modèle pour nos recherches. Il s'agit d'un pathogène strictement humain, aérobic obligatoire, dont la respiration repose en grande partie sur des oxydases terminales à cuivre (HCOs). Or, dans sa niche écologique, le tractus respiratoire humain, la disponibilité en cuivre est extrêmement restreinte, en raison des mécanismes de l'immunité nutritionnelle. Ceci suggère que *B. pertussis* possède un système spécifique d'importation de cuivre pour répondre à ses besoins métaboliques. Cependant, aucun système de transport de cuivre n'a été caractérisé à ce jour chez cette bactérie.

L'opéron *cruR-bfrG-bp2921* a retenu notre attention en raison de sa régulation dépendante du cuivre (Rivera-Millot et al., 2021 ; Roy et al., 2022). CruR réprime l'expression de BfrG et de Bp2921 en condition de présence de cuivre, et l'active en condition de carence, ce qui suggère que ce système est impliqué dans l'acquisition du cuivre. BfrG fait partie de la superfamille des transporteurs TonB-dépendants. Quant à Bp2921, elle est prédite comme une protéine de membrane interne de la famille PepSY-TM, dont certains membres sont connus comme réductases de Fe(III) en Fe(II), facilitant ainsi la dissociation du fer de son sidérophore après importation.

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse est d'étudier la fonction de BfrG et son rôle potentiel dans le transport du cuivre, ainsi que sa structure, son ligand et son mécanisme

d'action. Le deuxième objectif est de déterminer le rôle de Bp2921 au sein de ce système et son lien avec l'acquisition du cuivre. Cette thèse vise aussi à définir les cuproprotéines clientes de ce système d'acquisition du cuivre.

Résultats

I. Caractérisation de CrtA^{Bp} (BfrG) chez *B. pertussis*, le prototype d'une nouvelle famille de TBDT à cuivre

1. Identification de la famille de BfrG par analyse de similarité de séquence

Une analyse de similarité de séquence (Sequence Similarity Network, SSN) a été réalisée par le Dr Rudy Antoine, co-encadrant de ma thèse, afin de déterminer la famille à laquelle appartient BfrG. Plus d'un million de séquences de TBDTs sont actuellement répertoriées dans les bases de données protéiques. À partir de l'ensemble de ces séquences, un sous-ensemble de 297 770 protéines a été extrait en réduisant la redondance à 70 % et en se concentrant sur les protéines de 500 à 1 200 acides aminés. Ces séquences ont été organisées en clusters en fonction de leur similarité, déterminée à l'aide de BLAST. Les protéines partageant une forte similarité de séquence, et donc potentiellement la même fonction biologique, sont ainsi regroupées en clusters.

Le SSN ainsi obtenu révèle la présence de centaines de clusters distincts de TBDTs (Fig. 29). Les 14 TBDTs connus ou prédits chez *B. pertussis* ont ensuite été positionnés sur le réseau. BfrG se retrouve dans un cluster distinct de tous les autres TBDTs de *B. pertussis*, indiquant qu'il appartient à une famille non encore caractérisée. Ce cluster comprend 88 orthologues présentant 35 à 40 % d'identité de séquence et des tailles comprises entre 707 et 911 acides aminés. Ces orthologues sont retrouvés majoritairement chez les β - et γ -protéobactéries.

L'expression de *bfrG* étant régulée par la concentration du cuivre dans le milieu, nous avons émis l'hypothèse que cette protéine participe à l'acquisition du cuivre. À ce jour, un seul TBDT impliqué dans le transport du cuivre a été bien caractérisé. Il s'agit d'OprC chez *P. aeruginosa* qui transporte le Cu(I) ou le Cu(II) sous forme libre (Bhamidimarri et al., 2021). Nos analyses montrent qu'OprC n'appartient pas au même cluster que BfrG, suggérant que ces deux transporteurs ont des spécificités distinctes. En revanche, le TBDT PA0434, récemment identifié chez *P. aeruginosa* et nommé CrtA (Cu-responsive transporter A) en raison de sa régulation par le cuivre (Premuriya et al., 2023), est un orthologue de BfrG. Le gène *crtA* est situé dans un opéron similaire à celui de *bfrG*, précédé d'un gène codant une protéine

homologue à CruR (famille DUF2946) et suivi d'un gène codant une protéine PepSY-TM. Cette organisation génétique est conservée pour 32 % environ des membres de la famille CrtA.

Sur la base de ces observations, la protéine BfrG a été renommée CrtA^{Bp}, pour Cu-responsive transporter A of *B. pertussis*.

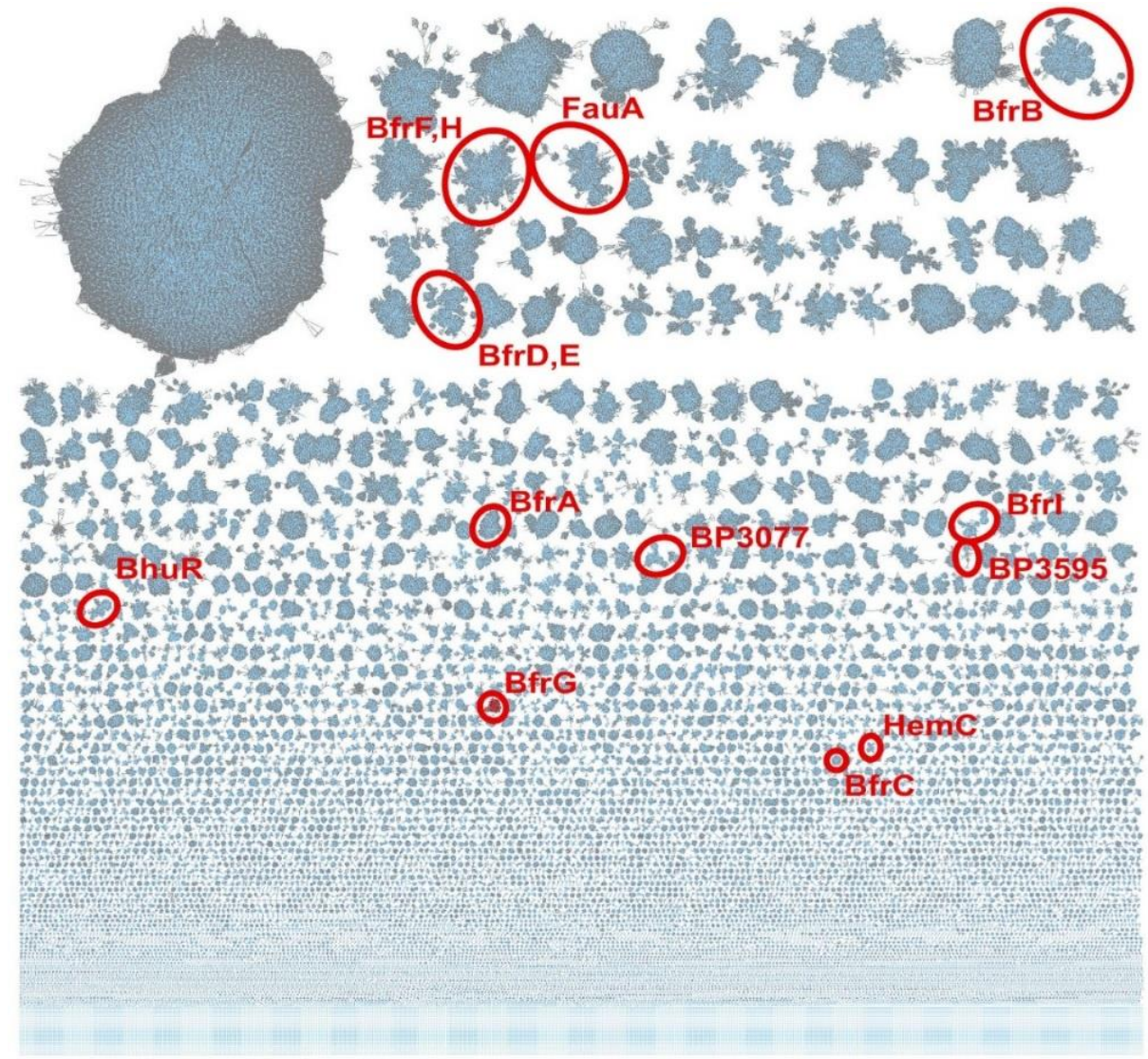


Figure 29. Analyse de similarité de séquence de la superfamille TBDT. Le réseau de nœuds illustre toute la diversité de la superfamille. L'ensemble des TBDTs de *B. pertussis* sont entourés en rouge, avec le cluster de la famille CrtA/BfrG coloré et entouré en rouge.

2. Transport du cuivre par CrtA^{Bp}

2.1. Etude de phénotype de croissance du mutant Bp- Δ crtA

B. pertussis est une bactérie aérobique stricte qui se cultive sous forte agitation en milieu liquide Stainer Scholte (SS), un milieu riche et complexe qui ne contient pas de cuivre ajouté. Une quantification par spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) effectué précédemment par le Dr. Alex Rivera-Millot au laboratoire, a montré que le milieu SS contient environ 0.5 μ M de cuivre.

La croissance du mutant de délétion de *crtA* (Bp- Δ crtA) a été comparée à celle de la souche sauvage (WT), BPSM, en condition standard (\sim 0.5 μ M), en présence d'excès de cuivre (50 μ M) ou bien en limitation en cuivre par le chélateur de Cu(I), le bathocuproïne disulfonate (BCS) (Fig. 30). Le Cu (I) est la forme principalement trouvée dans le milieu SS à cause de la présence de plus de 2 mM d'acide ascorbique, un agent réducteur, dans ce milieu.

Le mutant Bp- Δ crtA n'a montré aucun défaut de croissance par rapport au WT. Les deux souches ont poussé de façon similaire quelle que soit la concentration de cuivre dans le milieu.

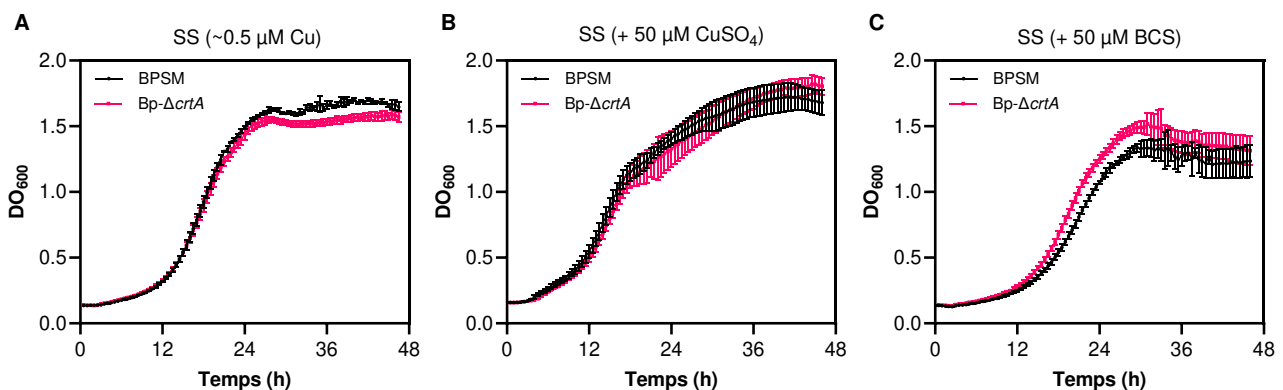


Figure 30. Croissance de BPSM (WT) et Bp- Δ crtA en milieu SS en conditions de culture agitée. A. croissance en milieu SS standard. B. Croissance en présence d'excès de cuivre (50 μ M). C. Croissance en limitation en cuivre par 50 μ M de BCS. Résultat représentatif d'au moins trois réplicats biologiques. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques.

L'absence de phénotype observée pour le mutant Bp- Δ crtA ne peut vraisemblablement pas être attribuée à un transport non spécifique du cuivre via les porines puisque cette voie serait

utilisée surtout à de fortes concentrations en métal. Ici, on observe le même profil de croissance pour les deux souches même en conditions de limitation en cuivre induite par le BCS (Fig. 30C). Par ailleurs, aucun autre TBDT régulé par le cuivre n'a été identifié chez *B. pertussis* pouvant compenser l'absence de *CrtA*.

En comparant les niveaux de croissance en limitation en cuivre par rapport à la condition de supplémentation (Fig. 29 B et C), il apparaît que la limitation en cuivre n'impacte pas beaucoup la croissance. Ceci suggère que le cuivre n'est pas primordial pour la croissance de *B. pertussis* dans ces conditions de culture, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype de *Bp-ΔcrtA*.

La croissance de *Bp-ΔcrtA* et de BPSM a été également étudiée en condition de culture statique en absence d'agitation dans des plaques de 96 puits, en limitation ou en excès de cuivre. Même dans ces conditions, *Bp-ΔcrtA* n'a pas montré de défaut de croissance significatif (Fig. 31). Cependant l'amélioration de la croissance des deux souches par l'ajout du cuivre était remarquable, indiquant que le cuivre est plus important pour *B. pertussis* en culture statique. Le niveau d'oxygénation du milieu est vraisemblablement affecté par le manque d'agitation, suggérant un lien entre le métabolisme de cuivre et la respiration chez *B. pertussis*.

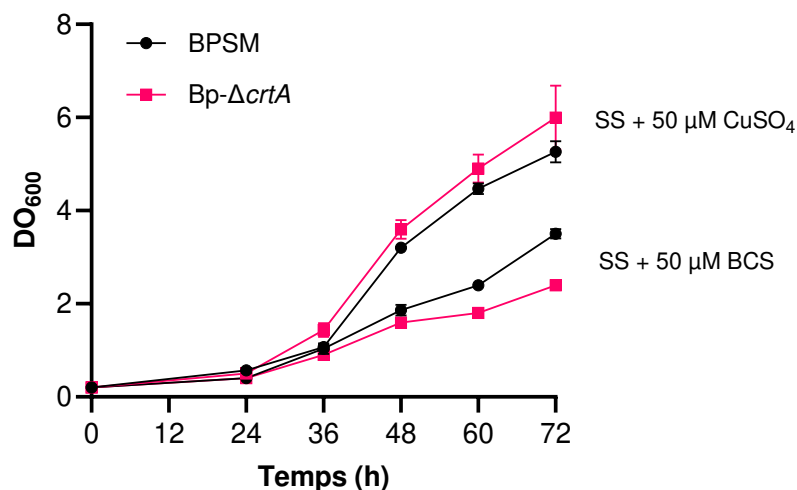


Figure 31. Croissance de BPSM et *Bp-ΔcrtA* en culture statique en excès (50 μM CuSO₄) ou en limitation en cuivre (50 μM BCS). Ces résultats sont représentatifs de trois réplicats biologiques. Les données correspondent à la moyenne et l'écart type de quatre réplicats techniques. Les valeurs de DO₆₀₀ ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre à cuvette ce qui explique les différences de valeur par rapport à celles obtenues avec lecteur de plaques "EnSight" dans la Fig. 30.

Dans le génome de *B. pertussis*, l'opéron *cruR-crtA-bp2921* est situé à proximité de l'opéron *bp2930-2933* (*cyoABCD*) codant pour bo-Qox, la cytochrome bo ubiquinol oxydase, qui appartient à la famille des HCOs avec un cuivre dans son site actif. Dans les 88 espèces avec un orthologue de *CrtA*, l'analyse de l'environnement génétique de *crtA* a montré que chez quelques organismes, *crtA* est situé dans le même opéron que les gènes codant PCu_AC et *Scol*, deux chaperons impliqués dans l'assemblage du cuivre dans les HCOs.

Dans cette famille, nous avons analysé les bactéries qui ont un génome complet (60 sur 88 bactéries), pour identifier les cytochromes oxydases terminales présentes. Cette analyse a montré que toutes ces bactéries seraient capables de respirer sur l'O₂ et utiliseraient au moins une HCO pour respirer (Fig.32). Toutes ces observations ont orienté notre recherche de fonction vers un lien de *CrtA* avec la respiration.

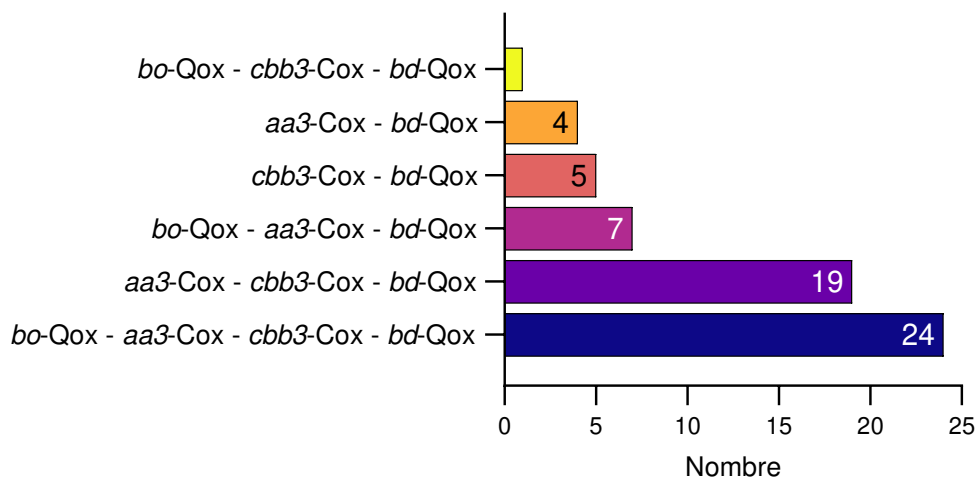


Figure 32. Nature des cytochromes oxydases terminales présentes chez les bactéries ayant un orthologue de *CrtA*. L'analyse a été faite avec les bactéries dont le génome est complètement séquencé et assemblé. Les combinaisons d'oxydases identifiées sont représentées en fonction du nombre de génomes correspondants. *bd-Qox* est une oxydase indépendante du cuivre, alors que *bo-Qox*, *aa3-Cox* et *cbb3-Cox* sont des oxydases à cuivre de la famille des HCOs.

2.2. Lien entre *CrtA*^{Bp} et les HCOs chez *B. pertussis*

B. pertussis possède trois cytochromes oxydases terminales fonctionnelles. Deux appartiennent à la famille des HCOs : la cytochrome bo ubiquinol oxydase (*bo-Qox*) codée par *cyoABCD*, contenant un centre cuivre (Cu_B), et la cytochrome c oxydase de type aa₃ (*aa3-Cox*) codée par *ctaCDFGE*, comportant trois atomes de cuivre (centre Cu_A bimétallique et centre Cu_B). *B. pertussis* possède aussi une oxydase indépendante du cuivre, la cytochrome *bd*

ubiquinol oxydase (bd-Qox) codée par *cydAB*. Des mutants de délétion de chacune de ces oxydases ont été construits, et leur croissance a été analysée dans des conditions de limitation ou de supplémentation en cuivre en culture agitée (Fig. 33).

En limitation en cuivre (Fig. 33A), Bp- Δ *cyoABCD* et Bp- Δ *ctaCDFGE* présentent des profils de croissance comparables à celui de BPSM, tandis que Bp- Δ *cydAB* montre un défaut de croissance marqué. L'ajout de 50 μ M de CuSO₄ a permis de restaurer sa croissance (Fig. 33B).

La souche Bp- Δ *cydAB*, ne possédant que les HCOs, dépend directement de la disponibilité du cuivre nécessaire à leur assemblage pour croître. Inversement, Bp- Δ *cyoABCD* et Bp- Δ *ctaCDFGE* peuvent croître en condition de limitation en cuivre grâce à l'activité de CydAB. Ces résultats montrent que CydAB est essentielle à la croissance en condition de limitation en cuivre. En son absence, le cuivre devient indispensable pour la respiration.

La présence de CydAB chez *B. pertussis* expliquerait l'absence de phénotype de croissance de Bp- Δ *crtA* dans les expériences décrites précédemment (Fig. 30). Même si l'importation de cuivre est probablement affectée par la délétion de *crtA*, cela impacterait peu la croissance en culture agitée tant que CydAB est fonctionnelle.

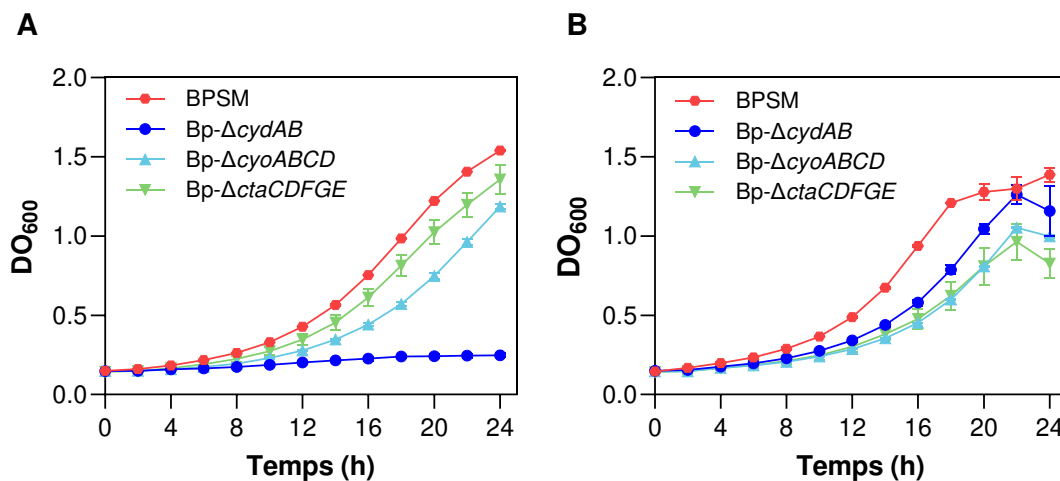


Figure 33. Croissance de *B. pertussis* sauvage et des mutants de délétion des cytochromes oxydases. Les cultures ont été faites en SS supplémente de 50 μ M de BCS (A), ou 50 μ M de CuSO₄ (B) en condition agitée. Résultat représentatif d'au moins trois réplicats biologiques. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques.

Afin d'étudier le rôle de CrtA dans l'acquisition du cuivre chez *B. pertussis*, l'opéron *cydAB* a été délété chez *Bp-ΔcrtA*. La croissance du mutant *Bp-ΔcrtAΔcydAB* a ensuite été comparée à celle de *Bp-ΔcydAB* en limitation en cuivre ou après supplémentation.

A 50 μM de BCS, *Bp-ΔcydAB* était incapable de croître (Fig. 33). De ce fait la concentration de BCS a été réduite à 15 μM. A cette concentration, *Bp-ΔcydAB* a démarré la croissance après une longue phase de latence de 24 h, contrairement au double mutant *Bp-ΔcrtAΔcydAB* qui n'a presque pas poussé (Fig. 34A).

Nous avons montré précédemment qu'en absence de *CydAB*, la croissance devient dépendante du cuivre. Par conséquent, l'absence de croissance de *Bp-ΔcrtAΔcydAB* contrairement à *Bp-ΔcydAB* indique que la délétion de *crtA* limite l'accès de la bactérie au cuivre. Cela montre l'implication de *CrtA* dans l'importation du cuivre chez *B. pertussis*.

L'ajout de 2 μM de CuSO_4 a permis de restaurer la croissance de *Bp-ΔcrtAΔcydAB* (Fig. 34B), suggérant que dans ces conditions le cuivre pourrait entrer dans la bactérie par une voie alternative, probablement les porines. Le phénotype de croissance du mutant de *CrtA* observé après délétion de *CydAB* montre indirectement que le cuivre importé est utilisé pour l'assemblage des HCOs de *B. pertussis*.

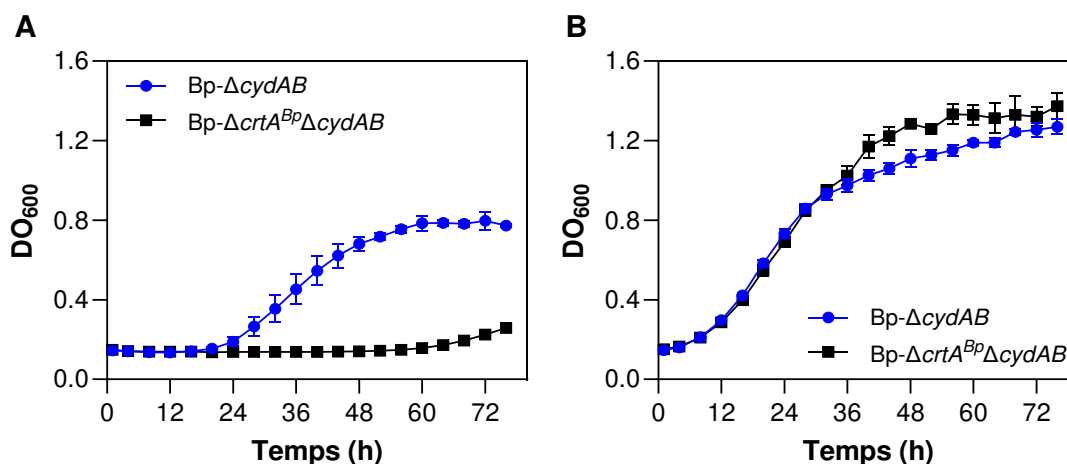


Figure 34. Etude du rôle de *CrtA* dans l'importation du cuivre par suivi de croissance de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB*. La croissance des deux souches a été déterminée en milieu SS avec 15 μM de BCS (A) ou 15 μM BCS + 2 μM CuSO_4 (B). Résultat représentatif d'au moins trois réplicats biologiques. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques.

2.3. CrtA^{Bp} transporte le cuivre oxydé

Le milieu SS contient 2,2 mM d'acide ascorbique, qui réduit le Cu(II) en Cu(I). Ainsi, le Cu(I) constitue la forme majoritaire de cuivre disponible en début de culture. Bien que faiblement soluble, le Cu(I) peut être complexé dans le milieu SS par des molécules thiolées telles que la cystéine ou le glutathion. Le BCS, ajouté pour induire la limitation en cuivre, forme un complexe stable 2:1 avec le Cu(I), qui ne peut pas traverser la membrane externe. En revanche, en absence d'ascorbate, le BCS ne complexe pas (ou peu) le Cu(II) à cause de son faible affinité. L'ajout de BCS dans un milieu dépourvu d'ascorbate n'affecte pas la croissance des mutants *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, indiquant qu'aucune limitation en cuivre n'est induite par le BCS en présence de Cu(II) (Fig. 35).

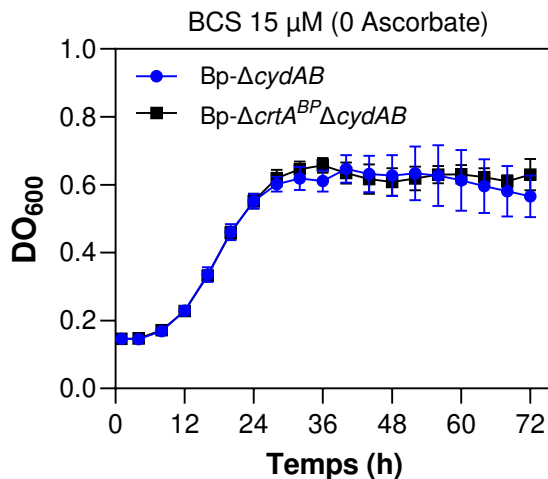


Figure 35. Croissance de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtA^{BP}ΔcydAB* en absence d'ascorbate. Le milieu SS a été supplémenté par 15 μM de BCS et déplié en ascorbate. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques.

En milieu SS standard (avec ascorbate), nous avons montré que *Bp-ΔcydAB* présente une phase de latence prolongée avant de démarrer sa croissance (Fig. 34A). En étudiant la croissance de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB* en présence de concentrations croissantes d'ascorbate (Fig. 36A et B) ou de BCS (Fig. 36C et D), nous avons observé que cette durée de la phase de latence dépend à la fois de la concentration d'ascorbate et de celle du BCS.

Ce phénotype peut être expliqué ainsi : en présence de fortes concentrations d'ascorbate le cuivre est initialement présent sous forme de Cu(I), complexé par le BCS. Le complexe Cu(I)-BCS est en équilibre avec une faible quantité de cuivre libre. Au cours de la culture agitée, la forte oxygénation du milieu causerait l'oxydation progressive de l'ascorbate, qui serait également consommé par les bactéries. En conséquence la diminution de la concentration de Cu(I) et l'apparition progressive du Cu(II) dans le milieu permettrait le démarrage de

croissance de *Bp-ΔcydAB*. Celle de *Bp-ΔcrtAΔcydAB* commence à des temps plus tardifs pendant la culture, probablement parce que la quantité de Cu(II) qui permet d'initier la croissance de *Bp-ΔcydAB* grâce à son importation par *CrtA* n'est pas suffisante pour assurer une cinétique suffisante d'entrée via des voies non spécifiques (ex. porines) chez *Bp-ΔcrtAΔcydAB*. Il faut donc plus de temps pour l'accumulation d'une quantité de Cu(II) plus importante permettant le démarrage de la croissance du double mutant. En diminuant fortement la concentration d'ascorbate (500 μM) ou celle de BCS (5 μM), la croissance de *Bp-ΔcrtAΔcydAB* devient possible, car le cuivre devient moins efficacement complexé par BCS. Ces observations suggèrent que *CrtA* est impliqué dans l'importation du cuivre oxydé.

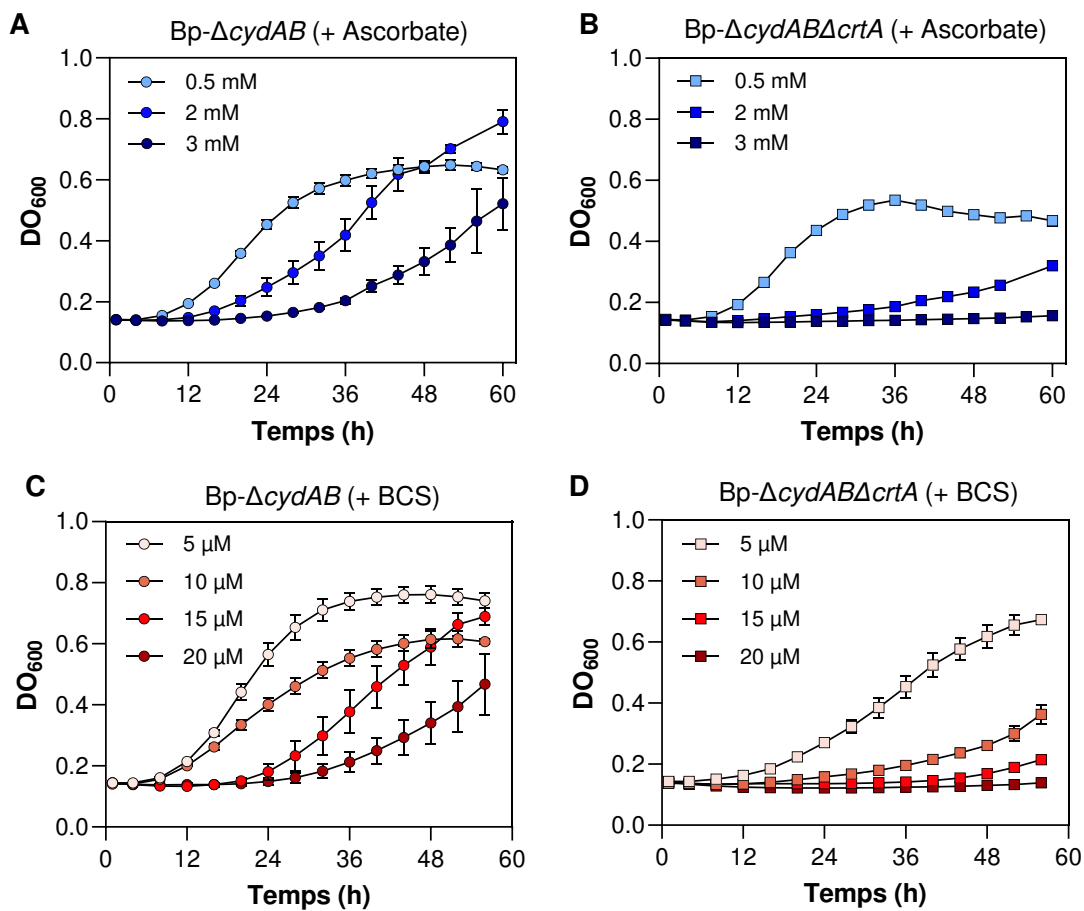


Figure 36. Effet des concentrations d'ascorbate et de BCS sur la phase de latence de la courbe de croissance des mutants de délétion de *cydAB*. (A, B). Croissance avec des concentrations croissantes d'ascorbate de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, respectivement. (C, D). Croissance avec des concentrations croissantes de BCS de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, respectivement. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques.

2.4. Spécificité du phénotype de croissance de Bp- $\Delta crtA\Delta cydAB$

Dans le but de vérifier que le phénotype de croissance de Bp- $\Delta crtA\Delta cydAB$ n'est pas lié à un défaut d'expression de *bp2921* causée par la délétion de *crtA*, une RT-qPCR a été réalisée sur le dernier gène de l'opéron (Fig. 37). Le niveau d'expression de *bp2921* était très similaire entre la souche sauvage et le mutant Bp- $\Delta crtA$ confirmant l'absence d'effet polaire de la délétion de *crtA*.

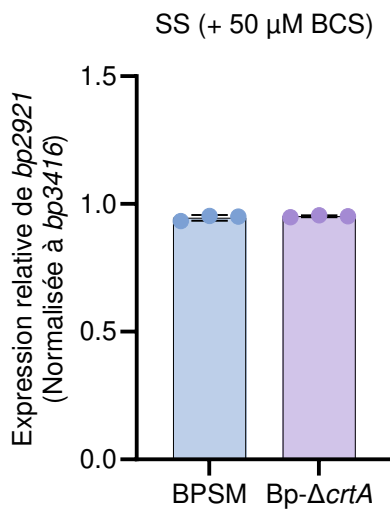


Figure 37. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *bp2921*. Les gènes *cruR*, *crtA* et *bp2921* forment un opéron. Les données ont été normalisées avec un gène de ménage *bp3416*. Résultat représentatif de trois réplicats biologiques.

Les gènes *crtA* et *bp2921* sont soumis à une régulation stricte par le cuivre via CruR, un régulateur post-transcriptionnel codé par le premier gène de l'opéron. La position de *crtA* et *bp2921* en aval de *cruR* est essentielle pour assurer une régulation efficace. L'expression non régulée de cet opéron ralentit la croissance de la bactérie en conditions d'excès de cuivre (Roy et al., 2022). Cela pourrait être lié à une importation non contrôlée du cuivre par CrtA ou bien à la fonction de la protéine Bp2921, qui sera étudiée ultérieurement.

La complémentation du mutant Bp- $\Delta crtA\Delta cydAB$ par *crtA* sur plasmide va générer une expression non régulée qui ne sera pas au même niveau de CrtA^{Bp} de la souche sauvage. Afin d'éviter une importation excessive de cuivre, nous avons inséré le gène *crtA* sous contrôle du promoteur Plac dans le vecteur pBBR-MCS5 à faible nombre de copie, pour limiter le niveau d'expression de *crtA*.

La croissance de Bp- $\Delta crtA\Delta cydAB$ ainsi complétement a été comparée à celles de Bp- $\Delta cydAB$ et Bp- $\Delta crtA\Delta cydAB$ en limitation en cuivre par 15 μ M de BCS (Fig. 38A) ou après

supplémentation de 2 μM de cuivre (Fig. 38B). En limitation en cuivre, la croissance de la souche complétementée débute plus tard que celle de la souche sauvage, mais plus tôt que celle du mutant *Bp- $\Delta\text{crtA}\Delta\text{cydAB}$* . En présence de cuivre, les trois courbes de croissance sont similaires. La phase de latence de la souche complétementée par rapport à la souche exprimant *CrtA* (*Bp- ΔcydAB*) correspond vraisemblablement au temps nécessaire pour accumuler une quantité suffisante de *CrtA*, l'expression basale étant faible en début de culture. Cela a été confirmé par analyse d'expression de *CrtA* par western blot après 48 h de culture (Fig. 38C). Après 60 h, la souche complétementée atteint une densité optique supérieure à celle de la souche sauvage. Cela pourrait résulter d'une expression continue de *crtA* à partir du plasmide, alors que dans *Bp- ΔcydAB* , l'expression serait réprimée une fois que la quantité de cuivre intracellulaire est suffisante. En fin de culture, le mutant *Bp- $\Delta\text{crtA}\Delta\text{cydAB}$* commence à croître, probablement parce que Cu(II) redevient disponible dans le milieu dû à la perte des effets de l'ascorbate et du BCS.

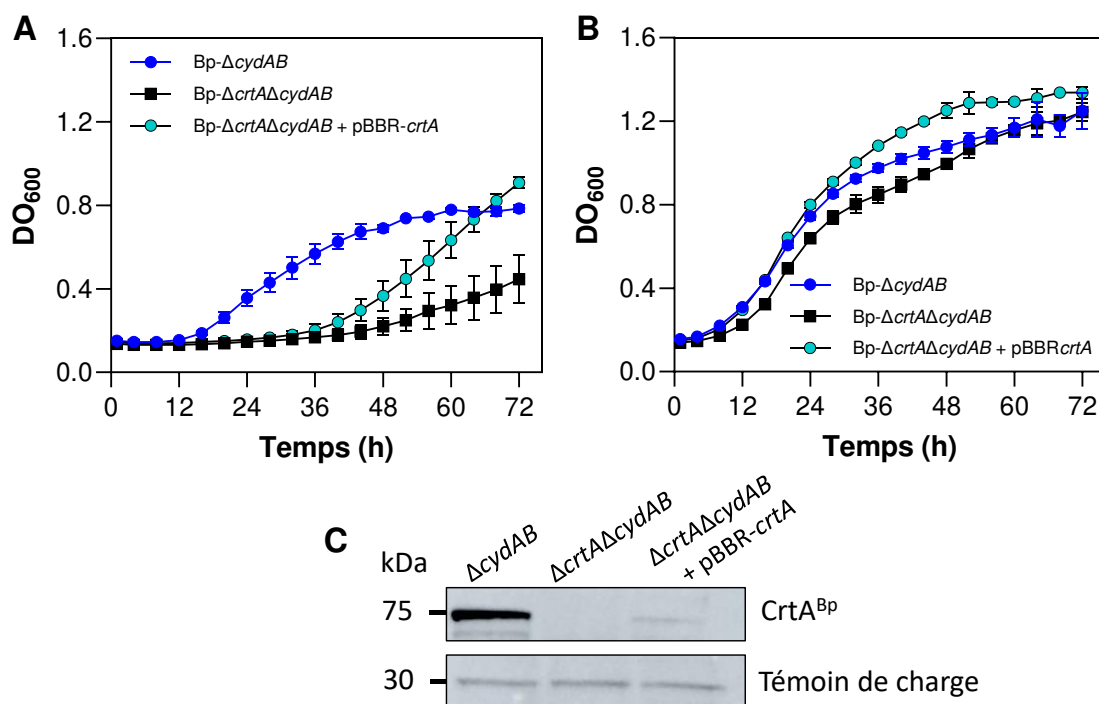


Figure 38. Complémentation du phénotype de croissance de *Bp- $\Delta\text{crtA}\Delta\text{cydAB}$* . Le gène *crtA* a été cloné sur un plasmide sous contrôle d'un promoteur lac. Les croissances des trois souches ont été déterminées en milieu SS avec 15 μM de BCS (A) ou 15 μM BCS + 2 μM CuSO_4 (B). Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques, représentatifs de trois réplicats biologique. (C) Niveau d'expression de *CrtA^{Bp}* chez *Bp- ΔcydAB* , *Bp- $\Delta\text{crtA}\Delta\text{cydAB}$* et *Bp- $\Delta\text{crtA}\Delta\text{cydAB}$ +pBBR-*crtA** après 48h de culture agitée déterminé par immunoblotting.

2.5. Rôle de CrtA *in vivo*

Le rôle de CrtA^{Bp} *in vivo* avait été précédemment testé dans notre laboratoire par le Dr. A Rivera-Millot, mais le mutant Bp- Δ crtA n'avait montré aucune différence significative de colonisation des souris comparé à la souche sauvage, à la fois au niveau du nez et des poumons. Ce résultat suggère qu'en absence de CrtA^{Bp}, *B. pertussis* est capable de s'approvisionner en cuivre via une voie alternative telle que les porines ou un autre transporteur. Par ailleurs, la bactérie possédant l'oxydase CydAB, elle serait en mesure de maintenir sa respiration même en conditions de carence en cuivre, ce qui favoriserait sa survie. Enfin, cette expérience ayant été réalisée avec des bactéries cultivées sur gélose au sang, il est possible que celles-ci aient accumulé du cuivre avant l'infection des animaux, ce qui pourrait masquer l'effet de la délétion de *crtA*.

Afin d'investiguer le pouvoir compétitif du mutant de délétion *in vivo* par rapport à la souche sauvage, nous avons effectué une co-infection des souris par un mélange de WT (BPSM) et Bp- Δ crtA à la même concentration. La charge bactérienne a été déterminée au niveau du nez et des poumons, 3 heures, 4, 7 et 14 jours après l'infection (Fig. 39). Dans cette nouvelle expérience, réalisée avec l'aide d'Anne-Sophie Debrie, les bactéries ont été pré-carencées en cuivre en les cultivant en milieu liquide contenant une faible concentration de BCS (20 μ M).

Lors de la co-infection nous avons remarqué que la souche sauvage présente un léger avantage de colonisation et de persistance au niveau du nez et des poumons par rapport au mutant. En tenant compte du rôle de CrtA^{Bp} dans le transport du cuivre, ce résultat suggère que face à des ressources nutritives communes limitées, les bactéries qui produisent CrtA accèdent plus facilement au cuivre que Bp- Δ crtA ce qui favoriserait leur adaptation chez l'hôte. Ce résultat indique que CrtA^{Bp} n'est pas essentiel *in vivo* mais il contribue à l'adaptation et au 'fitness' de la bactérie.

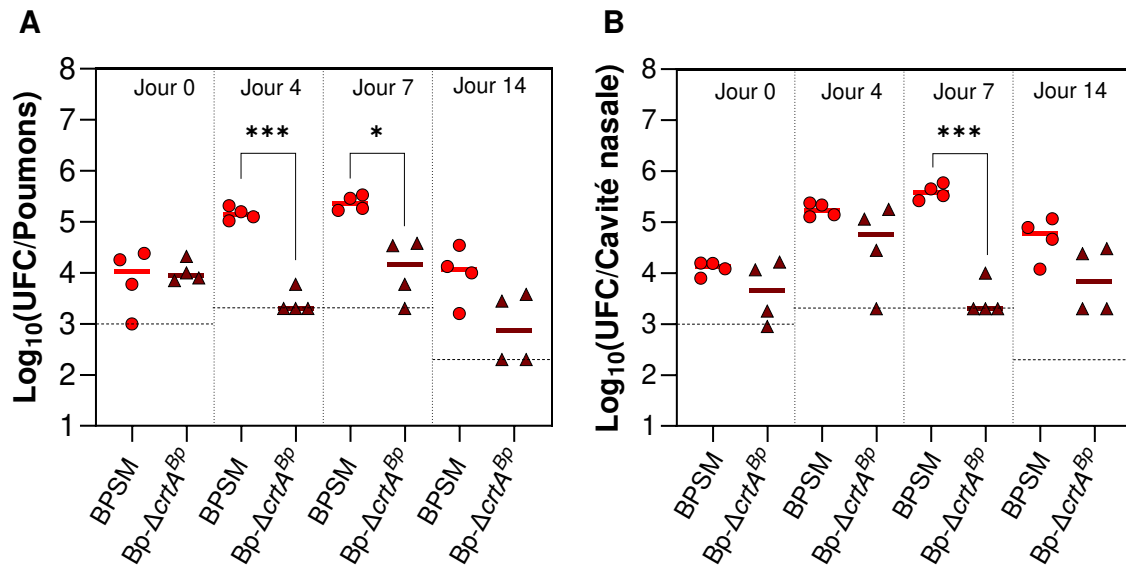


Figure 39. Etude de l'importance de CrtA^{Bp} dans un modèle d'infection murin. La charge bactérienne a été quantifiée au niveau des poumons (A) et de la cavité nasale (B) après une co-infection par *B. pertussis* sauvage (BPSM) ou par le mutant Bp- Δ crtA. Chaque point représente une souris individuelle, et la ligne en pointillé indique la limite de détection. La significativité statistique a été évaluée à l'aide du test ANOVA par permutation ($p < 0,05$; *), ($p < 0,0001$; ***).

3. Caractérisation structurale de CrtA^{Bp}

3.1. Identification d'un site conservé par radiocristallographie

CrtA^{Bp} a été produite sous forme recombinante chez *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité à l'aide d'une étiquette polyhistidine. Sa structure a ensuite été résolue par cristallisation en collaboration avec le Dr Pascal Arnoux (CEA Cadarache). CrtA^{Bp} présente une structure typique d'un TBDT sous forme d'un tonneau avec 22 brins β et un domaine plug du côté N-terminal qui bouche le tonneau (Fig. 40). Une molécule de citrate provenant du tampon de cristallisation a été retrouvée dans la protéine dans un site situé dans une cavité ouverte vers le côté extracellulaire, rappelant les sites de fixation de ligand chez d'autres TBDTs (Fig. 40). L'analyse des séquences des orthologues de CrtA a révélé que six résidus retrouvés autour du citrate sont hautement conservés dans la famille définie par notre analyse SSN, surtout His358 et Glu337 (Tableau V). La conservation de ce site suggère qu'il pourrait être le site de fixation du cuivre dans CrtA^{Bp}. En plus de l'histidine et du glutamate qui peuvent lier le cuivre, ce site est constitué également de résidus tryptophane, arginine, glutamine et

tyrosine, moins connus pour coordonner le cuivre. Ces données suggèrent que ce site lierait le cuivre en complexe avec un ligand.

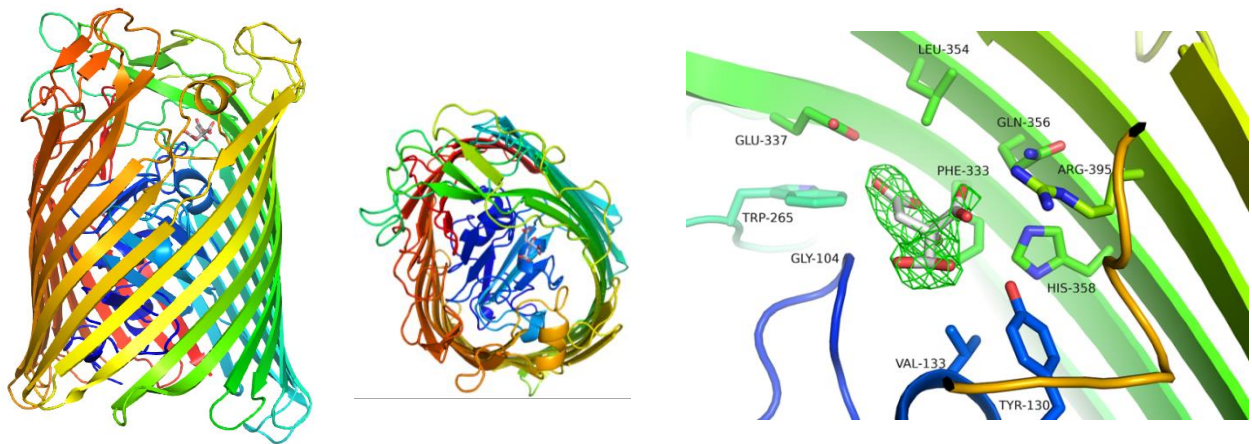


Figure 40. Structure aux rayons X de CrtA^{Bp} avec une molécule de citrate dans la cavité. Les résidus entourant le citrate sont montrés.

Tableau V. Conservation dans la famille CrtA des six résidus du site de liaison identifié.

Résidu	Conservation	Localisation
Y130	85/88	Plug
W265	86/88	Boucle β5- β6
E337	88/88	Brin β7
Q356	79/88	Brin β8
H358	88/88	Brin β8
R395	71/88	Brin β9

Pour étudier le rôle de ce site, les six résidus conservés ont été mutés en alanines (mutant CrtA_{MM}). Ces mutations n'ont pas affecté la stabilité de CrtA^{Bp}. La production de la protéine mutante a été vérifiée par Western blot (Fig. 41A).

Un mutant *Bp-crtA_{MM}ΔcydAB* a été construit, et il a présenté un défaut de croissance en condition de limitation en cuivre semblable à celui de *Bp-ΔcrtAΔcydAB* (Fig. 41B, C). La substitution de l'histidine 358 en sérine (mutant *Bp-crtA_{H358S}ΔcydAB*) suffit pour phénocopier le mutant de délétion, indiquant l'importance de ce résidu dans la fonction de CrtA^{Bp} (Fig. 41B, C). Ces résultats montrent que ce site conservé est important pour la fonction de CrtA^{Bp} et que

cette histidine joue un rôle crucial. Elle pourrait intervenir dans l'interaction directe avec le cuivre.

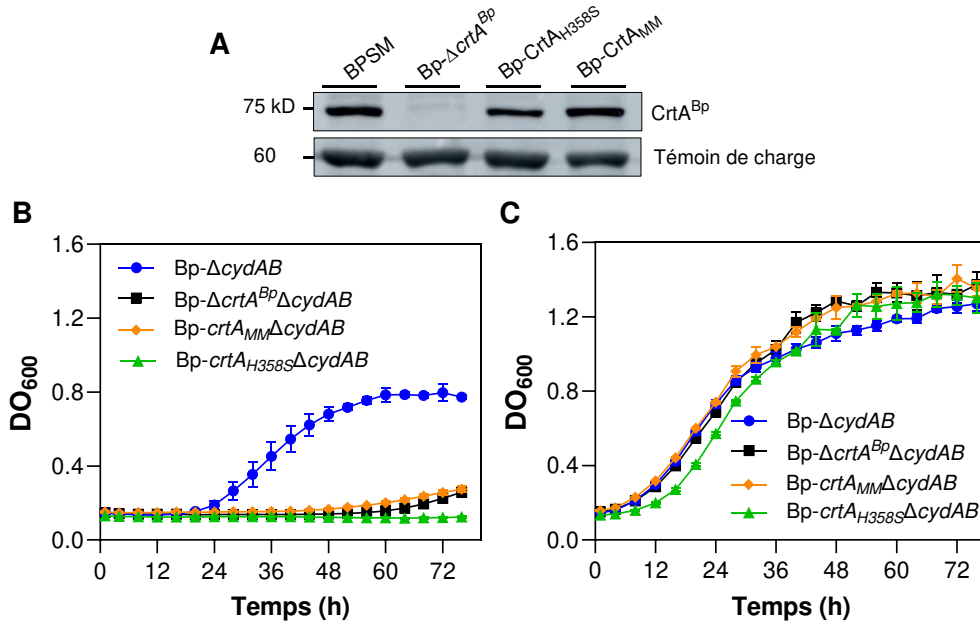


Figure 41. Importance du site conservé pour l'importation du cuivre. (A) Vérification d'expression de CrtA_{MM} et CrtA_{H358S} par immunoblot. (B, C) Croissance de Bp- $\Delta cydAB$, Bp- $\Delta crtA^{Bp} \Delta cydAB$, Bp-CrtA_{MM} $\Delta cydAB$ et Bp-CrtA_{H358S} $\Delta cydAB$ en limitation en cuivre (B) ou après supplémentation en cuivre (C). Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques.

Au sein du site putatif de liaison, un second résidu, Glu337, est strictement conservé dans la famille CrtA. Afin d'évaluer son rôle potentiel, ce résidu a été substitué par une alanine (Bp-CrtA_{E337A} $\Delta cydAB$). Un second mutant a également été construit, dans lequel l'His358 est conservé mais les résidus environnants, incluant Glu337, ont été remplacés par des alanines (Bp-CrtA_{5Ala} $\Delta cydAB$). La production de CrtA chez ces mutants a été vérifiée par immunoblot et leur croissance a été analysée dans les mêmes conditions que précédemment (Fig. 42).

Le mutant Bp-CrtA_{E337A} $\Delta cydAB$ présente un défaut de croissance comparable à celui observé pour le mutant de délétion de *crtA*, suggérant que Glu337 contribue de manière importante au transport. À l'inverse, le mutant Bp-CrtA_{5Ala} $\Delta cydAB$ montre une croissance améliorée, proche de celle de la souche sauvage. Ce résultat est surprenant, puisque ce second mutant comporte également la substitution E337A, qui dans le premier mutant, induit un fort défaut de croissance. La mutation E337A a été confirmée par séquençage dans les deux souches.

Cette incohérence expérimentale ne permet donc pas de conclure clairement sur le rôle du Glu337. Néanmoins, l'ensemble des données obtenues soutient l'hypothèse que ce site conservé correspond bien au site de liaison du complexe cuivre-ligand au sein de CrtA.

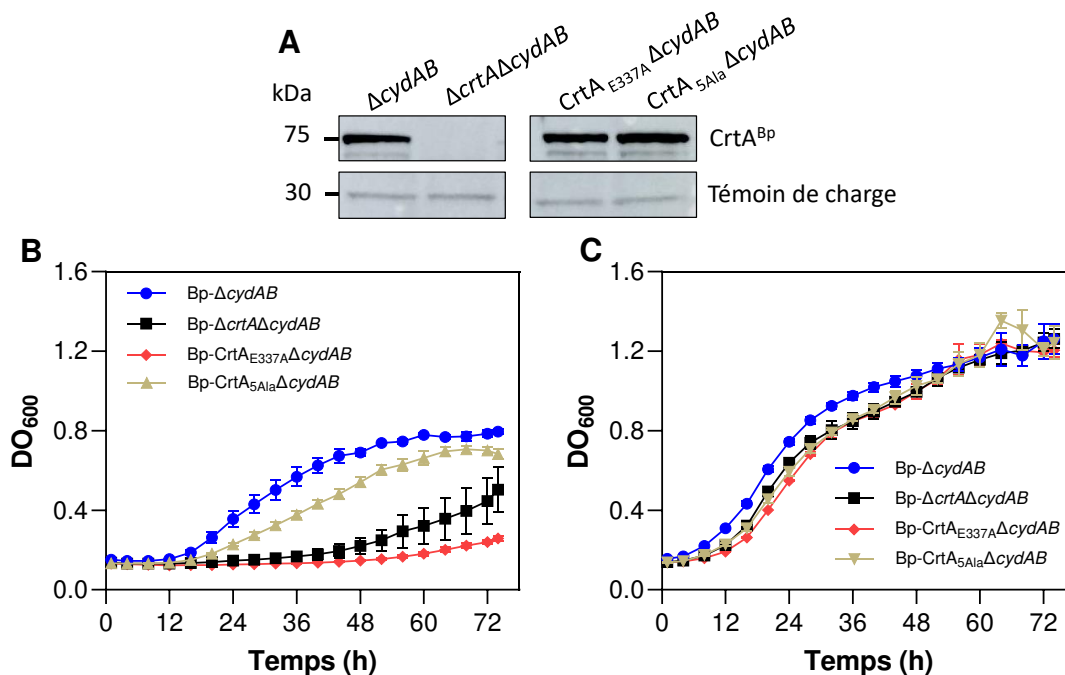


Figure 42. Importance du résidu Glu337 dans l'importation du cuivre par CrtA. (A) Vérification d'expression de CrtA chez les mutants par immunoblot. (B, C) Croissance de *Bp-ΔcydAB*, *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, *Bp-CrtA_{5Ala}ΔcydAB* et *Bp-CrtA_{E337A}ΔcydAB* en limitation en cuivre (B) ou après supplémentation en cuivre (C). Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques, représentatifs de trois réplicats biologique.

3.2. Interaction de CrtA^{Bp} avec le cuivre par l'intermédiaire d'une histidine

Afin d'identifier les résidus impliqués dans la coordination du Cu(II) par CrtA^{Bp}, nous avons analysé son interaction avec la protéine CrtA^{Bp} purifiée à l'aide d'une étiquette TwinStrep par résonance paramagnétique électronique (EPR) en collaboration avec le Dr. Giuseppe Sicoli (Université de Lille). La technique EPR repose sur la détection des transitions de spin de l'électron non apparié du Cu(II) lorsqu'il est soumis à un champ de radiation électromagnétique externe. Les variations d'énergie observées dépendent de l'environnement chimique du cuivre et se traduisent par un spectre révélant la nature des atomes coordonnant le métal. Le spectre obtenu pour le complexe CrtA^{Bp}- Cu(II) (1:1) est

présenté en Fig. 43A. Le profil spectral observé est typique d'une interaction du Cu(II) avec l'azote d'un seul noyau imidazole (Fig. 43B) (Silva et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le Cu(II) est coordonné par au moins une histidine au sein de CrtA^{Bp}. L'histidine représente un des plus forts coordinateurs du cuivre.

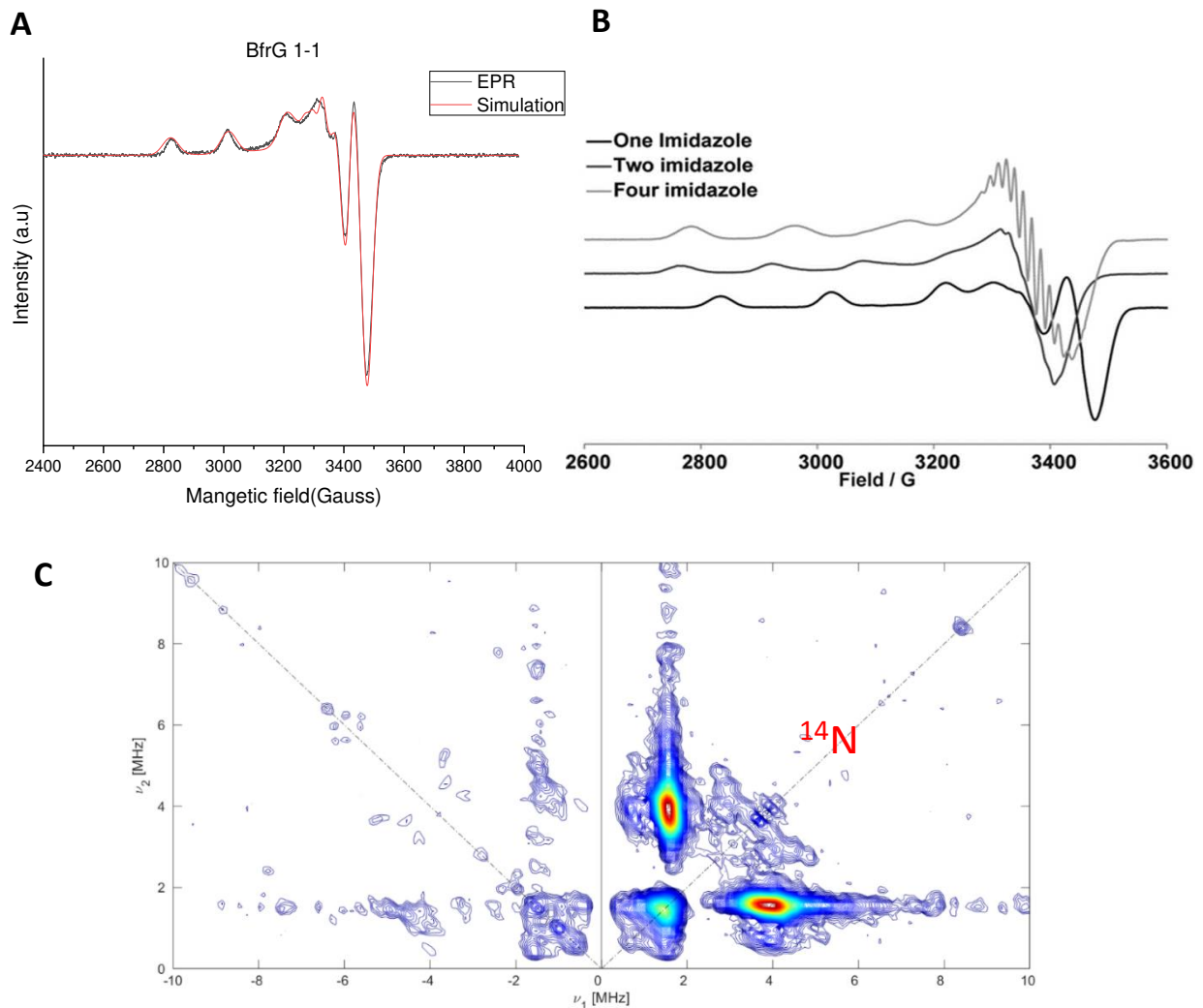


Figure 43. Confirmation de l'interaction de CrtA^{Bp} avec Cu(II) par spectroscopie EPR. (A) Spectre EPR de CrtA^{Bp} en présence de Cu(II). (B) Spectres EPR de complexes modèles de Cu(II) coordonné par 1, 2 ou 4 imidazoles (Silva et al., 2014). Ces spectres servent de référence pour le spectre montré en A. (C) Analyse HYSCORE de CrtA^{Bp}- Cu(II), révélant des corrélations hyperfines correspondant au noyau ¹⁴N.

Le complexe a aussi été analysé par la technique HYSCORE (EPR 2D) (Fig. 43C). Ce spectre, présentant deux axes ν_1 et ν_2 correspondant aux fréquences de transition des noyaux voisins du Cu(II) (azote, hydrogène, etc). Ces transitions, caractéristiques de la nature des noyaux, génèrent des signaux bidimensionnels symétriques par rapport à la diagonale ($\nu_1 = \nu_2$). Des

signaux caractéristiques de l'azote ^{14}N (1-5 MHz) ont été détectés, confirmant l'interaction du Cu(II) avec un ou plusieurs atomes d'azote.

Dans le site identifié par cristallographie, il existe une histidine invariante (His358) dans la famille CrtA. Pour déterminer si cette histidine participe à la coordination du Cu(II), CrtA^{Bp} mutée pour les six résidus ou pour l'His358 seule, ont été produites et analysées par EPR (Fig. 44).

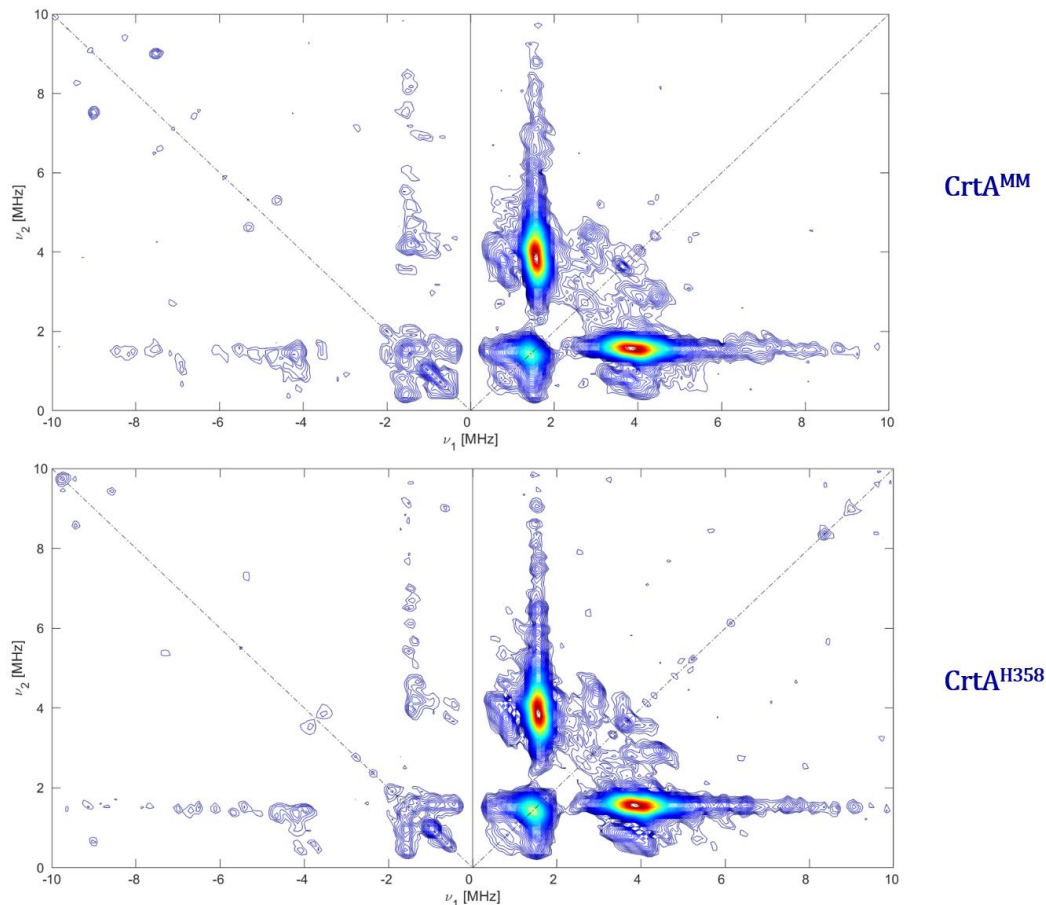


Figure 44. Spectres HYSCORE montrant les signaux d'interaction de CrtA^{MM} et CrtA^{H358S} avec Cu(II).

Les signaux ^{14}N restent visibles chez CrtA^{MM} et CrtA^{H358S}, indiquant que le Cu(II) demeure coordonné à au moins un atome d'azote, indépendamment de l'His358. Ces observations suggèrent l'existence d'un second site de liaison du cuivre.

L'analyse structurale de CrtA^{Bp} a en effet mis en évidence un second site potentiel de coordination du cuivre, composé d'une méthionine et de trois histidines non conservées (Fig.

45). Ce site, formé par les résidus His231, His257, His261 et Met259, est situé sur la face externe de la protéine. Bien que ce site soit probablement non accessible *in vivo* en raison de la présence des lipides membranaires, il deviendrait accessible dans la protéine purifiée. Il est donc plausible que les signaux d'interaction avec le ^{14}N détectés par EPR représentent un artefact lié à une liaison à ce site de surface grâce aux trois histidines. Rétrospectivement ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la cavité de CrtA lie du Cu chélaté et non nu, alors que dans ces expériences d'EPR nous avons fourni du CuSO_4 en quantité stoechiométrique à la protéine purifiée. Aucun ligand du Cu(II) n'était donc disponible.

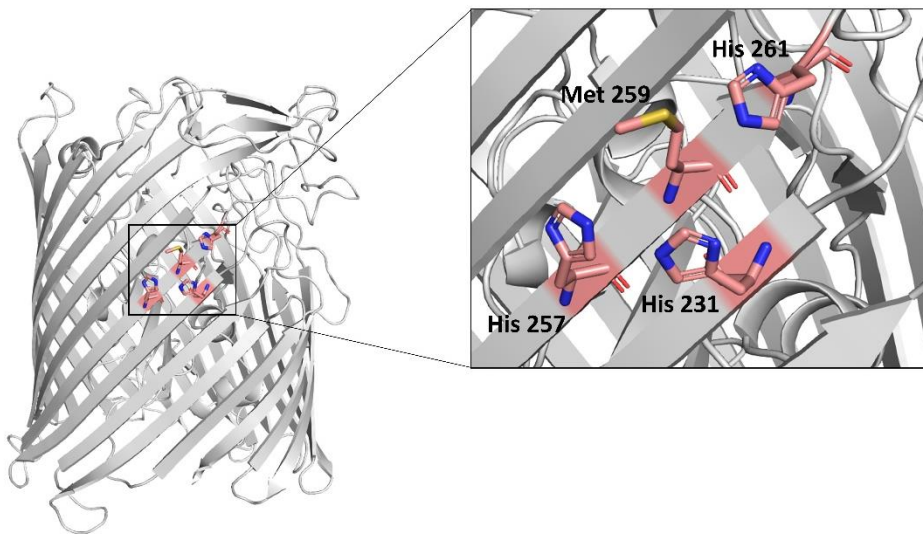


Figure 45. Présence d'un site constitué d'une méthionine et de trois histidines à la surface externe de CrtA^{BP} , formant un site non pertinent de coordination.

4. Recherche du ligand de CrtA^{BP}

4.1. Métallophores produits par *B. pertussis*

B. pertussis produit un seul sidérophore connu. Il s'agit de l'alcaligine, un hydroxamate impliqué dans le transport du Fe(III) via le transporteur FauA. Sa biosynthèse est strictement régulée par le répresseur Fur et n'a lieu qu'en condition de carence en fer. Le milieu SS contient environ $35 \mu\text{M}$ de fer. Nous avons réalisé une analyse RNAseq de *B. pertussis* sauvage issue d'une culture en milieu SS en condition standard, l'expression de l'opéron de biosynthèse de l'alcaligine (*alcABCDE*) ainsi que celle du gène du régulateur *AlcR* étaient très faibles par rapport à celle de *crtA* (Tableau VI) et n'a pas été affectée par l'addition du

chélateur BCS. Ce dernier est spécifique au Cu(I) et n'interfère pas avec le fer. Cela a été confirmé par des analyses transcriptomiques réalisés par A. Rivera-Millot (Rivera-Millot, 2020).

Un second cluster de biosynthèse est présent dans le génome de *B. pertussis*, en aval de l'opéron codant *CrtA* (*bp2922*). Il s'agit de l'opéron *bp2924-bp2925-bp2926-bp2927*, qui code un peptide de synthèse ribosomale modifié de façon post-traductionnelle (RiPP). La fonction de ce RiPP n'a pas encore été caractérisée chez *B. pertussis*. Toutefois, des travaux menés dans notre laboratoire par la Dr. Laura Leprévost sur un homologue de ce RiPP chez *Caulobacter vibrioides* ont montré que ce RiPP est capable de lier le Cu(I) et le Cu(II), et qu'il contribue à la passivation du cuivre afin de protéger la bactérie de sa toxicité. Ce RiPP a été nommé « bufferine ». Par analogie, le RiPP de *B. pertussis* a également été désigné bufferine, son opéron sera appelé *bufABCD* ci-dessous, avec *bufA* codant le précurseur de la bufferine.

La proximité génétique entre *bufABCD* et *crtA*, ainsi que son lien potentiel avec le cuivre suggèrent que la bufferine pourrait constituer le ligand reconnu par *CrtA*. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'un des premiers chalkophores identifiés, la méthanobactine, est un RiPP transporté par le TBDT MbnT (H. J. Kim et al., 2004).

Contrairement à *CrtA*^{Bp}, l'expression de la bufferine n'est pas régulée par le cuivre mais dépend du système de régulation de la virulence, *BvgAS*. Le gène *bufA* est fortement exprimé dans la phase de virulence (*Bvg*⁺), mais son expression est totalement réprimée dans les phases intermédiaire (*Bvg*ⁱ) et avirulente (*Bvg*⁻). En conditions de laboratoire, ces phases sont induites respectivement par l'addition de 20 mM ou 40 mM de *MgSO*₄. À l'inverse, *crtA* est principalement exprimé en phase *Bvg*ⁱ et *Bvg*⁻, avec une expression basale en phase *Bvg*⁺. Ainsi, *CrtA* et la bufferine ne sont pas exprimés de façon maximale simultanément (Tableau VI).

Tableau VI Expression des gènes chez *B. pertussis* cultivée avec 20 mM MgSO₄. Les résultats sont représentatifs de trois réplicats biologiques.

Gène	Nom	Expression (RPKM)
<i>bp2921</i>	-	215
<i>bp2922</i>	<i>crtA</i>	428
<i>Bp2923</i>	<i>cruR</i>	94
<i>bp2456</i>	<i>alcA</i>	8
<i>bp2457</i>	<i>alcB</i>	6
<i>bp2458</i>	<i>alcC</i>	6
<i>bp2459</i>	<i>alcD</i>	2
<i>bp2460</i>	<i>alcE</i>	6
<i>bp2461</i>	<i>alcR</i>	13
<i>bp2924</i>	<i>bufA</i>	4
<i>bp2925</i>	<i>bufB</i>	1
<i>bp2926</i>	<i>bufC</i>	0
<i>bp2927</i>	<i>bufD</i>	0

Dans les expériences d'étude de phénotype de *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, les cultures ont été réalisées en présence de 20 mM de MgSO₄ (ce qui induit la phase Bvg^I). Dans ces conditions qui maximisent l'expression de *crtA*, celle de l'opéron *buf* est totalement réprimée (Tableau VI), ce qui remet en question l'hypothèse selon laquelle la bufferine constituerait le ligand de CrtA.

Afin d'examiner le rôle potentiel de ces deux métallophores, des mutants ont été construits : l'un inactivé pour le cluster de biosynthèse de l'alcaligine, et l'autre portant un codon STOP en début du gène *buf*. Cette stratégie de mutagenèse avait comme objectif d'arrêter l'expression de la bufferine sans impacter la séquence nucléotidique. En effet, des travaux antérieurs effectués au laboratoire par Elodie Lesne avaient montré que la délétion complète de l'opéron *buf-bp2925-bp2926-bp2927* affectait l'expression de *crtA* et de *bp2921*, suggérant la présence d'un mécanisme de régulation encore inconnu entre ces deux opérons divergents.

Dans les deux mutants, l'opéron *cydAB* a également été délété afin de rendre les souches dépendantes du cuivre pour leur croissance. Leur phénotype a été comparé à ceux de *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB* en condition de limitation en cuivre (15 μM BCS). Pour le mutant de la bufferine, les cultures ont été conduites en phase *Bvg*⁺ (sans MgSO₄) afin d'assurer sa production dans les souches contrôles *Bp-ΔcydAB* et *Bp-ΔcrtAΔcydAB* (Fig. 46 A,B).

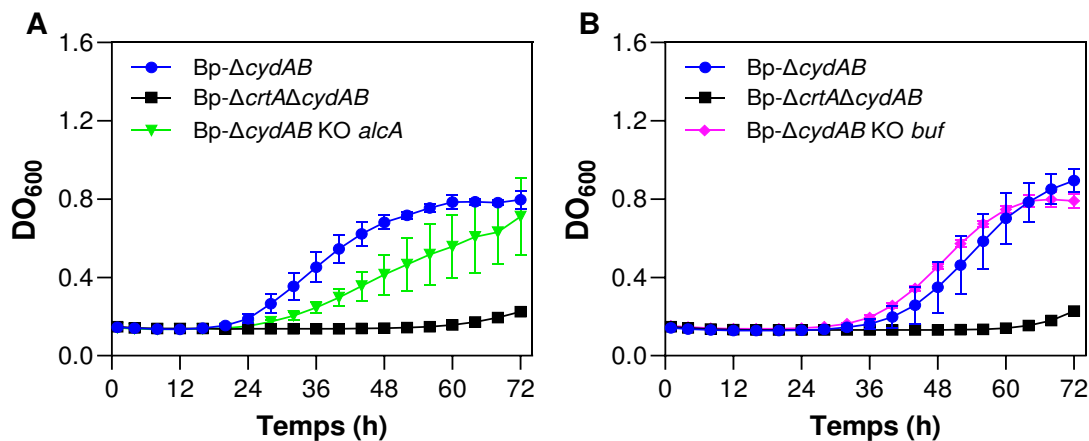


Figure 46. L'alcaligine et la bufferine ne sont pas nécessaires à l'acquisition du cuivre par *CrtA* chez *B. pertussis*. A, croissance de *Bp-ΔcydAB*, *Bp-ΔcrtAΔcydAB* et *Bp-ΔcydABKOalcA* en présence de 15 μM BCS. B, croissance de *Bp-ΔcydAB*, *Bp-ΔcrtAΔcydAB* et *Bp-ΔcydABKObuf* dans un milieu SS supplémenté avec 15 μM BCS. Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques, représentatifs de trois réplicats biologique.

L'étude de la croissance en limitation en cuivre a montré que ni la souche déficiente en alcaligine ni la souche déficiente en bufferine ne reproduisent le phénotype observé pour *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, ce qui indique que ces métallopeptides ne sont pas impliqués dans l'importation du cuivre par *CrtA*. La croissance intermédiaire de *Bp-ΔcydABKOalcA* s'explique très probablement par la moins bonne acquisition du fer chez cette souche, en raison de l'absence du seul sidérophore produit par *B. pertussis*.

4.2. CruR : une lipoprotéine codée par l'opéron de *crtA*

CruR est une lipoprotéine codée par le premier gène de l'opéron codant *crtA*. Elle agit comme un régulateur post-transcriptionnel contrôlant l'expression de *crtA* et de *bp2921*. Certains TBDTs impliqués dans l'acquisition du fer, tels que TbpA et LbpA, fonctionnent en association avec des lipoprotéines membranaires (TbpB et LbpB) qui reconnaissent spécifiquement leurs

ligands (transferrine ou lactoferrine) et le transmettent au transporteur. Dans ce contexte, nous avons envisagé que CruR puisse exercer une fonction similaire.

La fonction régulatrice de CruR s'exerce au niveau cytoplasmique. Bien que la protéine possède un peptide signal, celui-ci n'est pas nécessaire à son rôle de régulation (Roy et al., 2022). La présence de ce peptide signal reste donc inexpliquée. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle CruR pourrait également intervenir dans l'importation du cuivre, nous avons introduit deux mutations frameshift, situées respectivement au début et à la fin de la séquence codant le peptide signal, dans le but d'empêcher l'exportation de la protéine en affectant au minimum la séquence nucléotidique, qui intervient dans la régulation (Roy et al., 2022). L'opéron *cydAB* a également été délété pour obtenir une souche dépendante du cuivre (Bp-CruR_{FS} Δ *cydAB*) et comparer sa croissance à celle de Bp- Δ *cydAB* et Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB* (Fig.47).

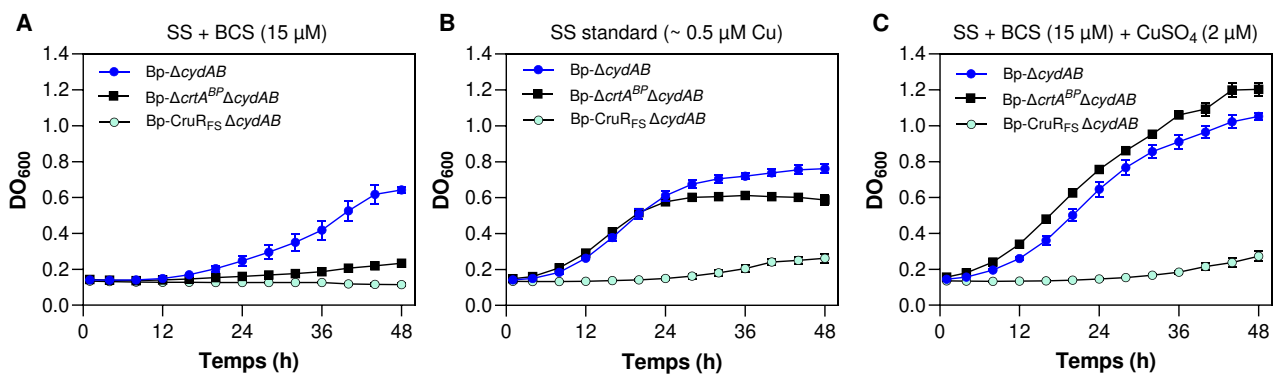


Figure 47 Effet du blocage d'exportation de CruR sur la croissance de la souche déletée pour *cydAB*. Suivi de croissance de Bp- Δ *cydAB*, Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB* et Bp-CruR_{FS} Δ *cydAB* dans le milieu SS en limitation en cuivre par BCS (A), en condition standard (B) ou après ajout de 2 μ M de CuSO₄ en présence de BCS (C). Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques, représentatifs de trois réplicats biologique.

La croissance du mutant Bp-CruR_{FS} Δ *cydAB* était très impactée en milieu liquide. Dès la préculture, sa croissance était plus faible que celle de Bp- Δ *cydAB* et Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB*. Ce mutant était incapable de croître quelle que soit la concentration en cuivre disponible dans le milieu (Fig. 43). Cette limitation sévère de croissance n'a pas permis de poursuivre l'analyse de son rôle potentiel dans l'importation du cuivre.

Une hypothèse pour expliquer ce phénotype est que la rétention de CruR dans le cytoplasme pourrait entraîner une forte carence intracellulaire en cuivre. CruR est capable de détecter de très faibles concentrations de cuivre et de le lier grâce à son motif CysXXCys. Il est donc envisageable que le peptide signal soit nécessaire pour éviter que CruR reste cytoplasmique et chélate le cuivre disponible dans ce compartiment. Une observation qui plaide contre le rôle de CruR comme partenaire de CrtA est la faible co-occurrence des gènes *crtA* et *cruR* dans les génomes bactériens.

4.3. Recherche *in silico* de métallophores associé à la famille CrtA

B. pertussis possède quelques TBDTs encore non caractérisés, ce qui laisse supposer l'existence de métallophores codés par le génome mais non encore identifiés. Afin d'explorer cette possibilité, nous avons réalisé une analyse des génomes des bactéries possédant un homologue de *crtA* à l'aide du logiciel AntiSMASH qui détecte les clusters biosynthétiques de gènes de type NRPS, RiPP etc. L'objectif était d'identifier d'éventuels clusters de gènes de biosynthèse associés à cette famille de transporteurs. Cependant, aucun cluster commun n'a été détecté. Ceci suggère que cette famille de TBDT ne possède pas un ligand spécifique. Alternativement ce ligand pourrait être un xénométallophore que les bactéries qui possèdent des orthologues de CrtA trouvent dans leurs niches naturelles parce qu'il est produit par une ou des espèces qui partagent ces niches.

4.4. Recherche de composés organiques capable d'interagir avec CrtA^{Bp}

Le phénotype de croissance observé chez le mutant Bp- Δ *crtA* apparaît dans des conditions de culture en laboratoire, ce qui montre que le ligand reconnu par CrtA dans ces conditions n'est pas une protéine ou un métabolite de l'hôte ni un xénométallophore. Le ligand pourrait être une petite molécule organique présente dans le milieu de culture ou sécrétée par la bactérie au cours de sa croissance.

Pour explorer cette hypothèse, une liste de composés organiques potentiellement sécrétés ou présents dans le milieu et capables d'interagir avec le Cu a été établie (acides organiques, acides aminés, vitamines, nucléosides, etc.). L'interaction de ces composés avec CrtA^{Bp} purifiée a été testée par analyse de la dénaturation thermique, en suivant la fluorescence

intrinsèque du tryptophane aux longueurs d'onde 330 et 350 nm grâce à l'instrument Prometheus Panta (Nano temper). Ce travail a été effectué avec l'aide du Dr P. Arnoux.

CrtA^{Bp} a une température de dénaturation (T_m) de 71.55 ± 0.04 °C. L'ajout de $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 semble déstabiliser la protéine, puisque son T_m passe à 70.48 ± 0.16 °C. Chacun des composés sélectionnés a ensuite été testé pour évaluer son effet stabilisant sur le T_m de CrtA^{Bp} en présence de cuivre (Tableau VII). CrtA^{Bp} est une protéine très stable et nous nous attendons à ce que son interaction avec ces petites molécules n'impacte que légèrement son T_m . L'analyse de ces petits changements est possible grâce au Prometheus Panta qui est très sensible aux variations de T_m , avec un niveau de précision de 0.1 °C.

Le citrate a montré l'effet stabilisant le plus marqué avec une augmentation de T_m de 0.75 °C avec $50 \mu\text{M}$ de citrate et de 0.95 ± 0.16 °C avec $100 \mu\text{M}$. D'autres composés connus pour avoir une affinité plus élevée pour le cuivre (l'histidine ou l'ascorbate) n'ont pas eu d'effet notable. À noter que l'isocitrate, malgré une structure très proche du citrate, n'a exercé aucun effet stabilisant. De plus, une molécule de citrate a été retrouvée dans la cavité de CrtA^{Bp} après cristallisation, renforçant l'idée d'une interaction entre le citrate et la protéine.

Tableau VII Stabilité thermique de CrtA^{BP} purifié : forme apo, avec Cu(II), et avec Cu(II) + ligand.

Condition	Tm (°C)	ΔTm (°C)	Constante de stabilité (Log K ₁)	Référence
CrtA ^{BP}	71.55			
CrtA ^{BP} + Cu(II)	70.48			
CrtA ^{BP} + Cu(II)/(Ligand)	Acétate	70.1	-0.38	5.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Fumarate	70.11	-0.37	2.5 (Dawson. 1986)
	Glutarate	70.12	-0.36	3.16 (Irving & Williams, 1953)
	Hématine	70.12	-0.36	
	Acide nicotinique	70.22	-0.26	2.59 (Dengle et al., 2020)
	Cytidine	70.26	-0.22	13.98 ± 0.05 (Tyagi et al., 2003)
	α-Cétoglutarate	70.29	-0.19	5.0 (Yang et al., 2003)
	Pyridoxine	70.3	-0.18	5.09 (Zaid et al., 2011)
	Succinate	70.33	-0.15	2.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Lactate	70.35	-0.13	2.6 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Uridine	70.35	-0.13	4.13 ± 0.20 (Knobloch et al., 2005)
	L-Citruline	70.37	-0.11	7.92 (Clarke & Martell, 1970)
	Acétoacétate	70.37	-0.11	
	Vitamine B12	70.4	-0.08	
	Glycérophosphate	70.44	-0.04	
	Malate	70.44	-0.04	3.4 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Hydroxybutyrate	70.44	-0.04	
	Isocitrate	70.45	-0.03	
	Ascorbate	70.46	-0.02	21.5 (Mahata et al., 2019)
	Oxalate	70.48	0	4.4 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Hypoxanthine	70.49	0.01	7.5 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	L-Glutamate	70.51	0.03	7.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Adénosine	70.56	0.08	8.5 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Thiosulfate	70.56	0.08	10.27 (Dean & Lange, 1992)
	Phénylalanine	70.58	0.1	8.3 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Aconitate	70.59	0.11	
	Taurine	70.6	0.12	3.56 ± 0.07 (Petrova & Neudachina, 2013)
	Tryptophane	70.64	0.16	8.3 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	L-Histidine	70.67	0.19	10.2 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	L-Cystathionine	70.67	0.19	
	L-Arginine	70.68	0.2	7.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)
	Thiamine	70.71	0.23	
	L-Proline	70.71	0.23	8.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)
L-Ornithine	70.73	0.25	6.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)	
Riboflavine	70.82	0.34	6.5 (Dawson,Eliott et al., 1986)	
Glutathion	70.83	0.35	7.52 (Singh et al., 2001)	
L-Lysine	70.84	0.36	7.6 (Dawson,Eliott et al., 1986)	
Citrate	71.23	0.75	5.9 (Dawson,Eliott et al., 1986)	

$$\Delta Tm = Tm_{CrtA^{BP} + Cu(II) + Ligand} - Tm_{CrtA^{BP} + Cu(II)}$$

4.5. Recherche du ligand de CrtA^{Bp} par suivi de croissance en carence en cuivre

Le rôle du citrate comme ligand potentiel de CrtA^{Bp} a été évalué par étude de croissance en conditions de limitation en cuivre. Si le citrate est le ligand, son ajout au milieu de culture devrait favoriser la croissance de la souche Bp- Δ *cydAB* exprimant *crtA*. Cependant, aucun effet positif n'a été observé (Fig. 48B), indiquant que le citrate n'aide pas à importer le cuivre par CrtA même s'il est capable d'interagir avec la protéine.

L'acide nitrilotriacétique (NTA), un chélateur synthétique structurellement proche du citrate mais présentant une affinité plus élevée pour le cuivre ($\log K(\text{Cu-NTA}) = 13,1$; Fig. 48A), a ensuite été testé. L'ajout de NTA a amélioré de façon reproductible la croissance de Bp- Δ *cydAB* en condition de limitation en cuivre, mais n'a eu aucun effet sur la souche Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB*. Ces résultats suggèrent que NTA facilite l'accès au cuivre par Bp- Δ *cydAB*, de façon plus efficace qu'un éventuel ligand présent dans le milieu de culture. CrtA^{Bp} semble être capable de transporter le complexe Cu-NTA. Cela suggère que le NTA mime le ligand de CrtA^{Bp}, et c'est pour cette raison nous avons considéré NTA comme un pseudoligand (Fig. 48C).

Pour tester la spécificité de cet effet, d'autres chélateurs du cuivre ont été évalués. L'éthylènediamine disuccinate (EDDS) partage avec le NTA la présence de groupements carboxylates et d'atomes d'azote (Fig. 48A) et il a une forte affinité pour le cuivre ($\log K(\text{Cu-EDDS}) = 18,4$). L'ajout d'EDDS a complètement inhibé la croissance des deux souches. Cela indique que l'EDDS a complexé le Cu(II) disponible dans le milieu, empêchant ainsi l'accès de la bactérie à ce métal, et renforce l'idée d'un effet spécifique du NTA (Fig. 48D).

Le triéthylènetétramine (Trien), un chélateur spécifique du Cu(II), a également été testé. Contrairement au NTA, il ne possède pas de groupements carboxylates mais quatre atomes d'azote, formant un complexe Cu(II)-Trien très stable ($\log K(\text{Trien-Cu}) = 20,4$). L'ajout de Trien a reproduit l'effet du NTA : en condition de limitation en cuivre, Bp- Δ *cydAB* a démarré sa croissance plus tôt, tandis qu'aucun effet n'était observé pour le mutant Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB* (Fig. 48E). Ces résultats suggèrent que CrtA pourrait également utiliser le complexe Cu-Trien comme ligand. Toutefois, compte tenu de la différence structurelle marquée entre NTA et Trien, ce résultat met en question la spécificité de CrtA^{Bp}.

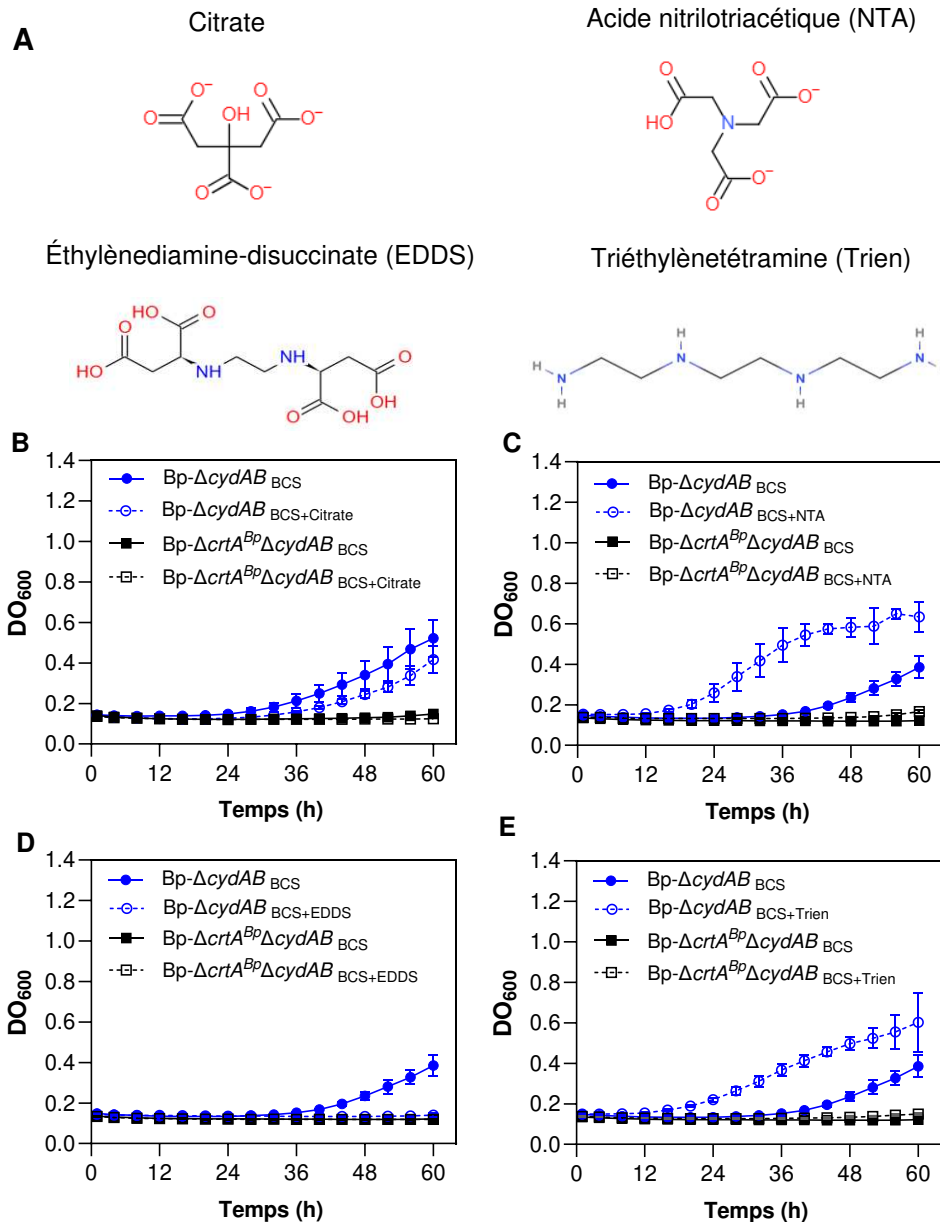


Figure 48. Effet de chélateurs de Cu(II) sur la croissance de Bp-ΔcydAB et Bp-ΔcrtAΔcydAB en limitation en cuivre. (A) Structure des chélateurs de Cu(II) utilisés : Citrate, NTA, Trien et EDDS. (B-E) phénotype de croissance de Bp-ΔcydAB et Bp-ΔcrtAΔcydAB avec BCS à 20 μM ou BCS plus le chélateur de Cu(II) à 500 μM. Ces résultats sont représentatifs de trois réplicats biologiques.

En collaboration avec la Dr. Manon Mirgaux (Université Libre de Bruxelles), des simulations d'interaction entre CrtA^{Bp} et le complexe Cu-Trien ont été réalisées (25 modèles générés avec Alphafold3). Dans seulement un cas sur 25, le complexe a été retrouvé dans la cavité de CrtA. Dans tous les autres modèles, le complexe reste à l'extérieur du transporteur (Fig. 49A). La structure fermée du complexe Cu-Trien, dans laquelle seuls des groupements CH₂ sont

exposés, limite ses interactions possibles avec les résidus du site de fixation du ligand (Fig. 49B). Ces données suggèrent que le complexe Cu-Trien n'est pas directement importé par CrtA^{Bp}.

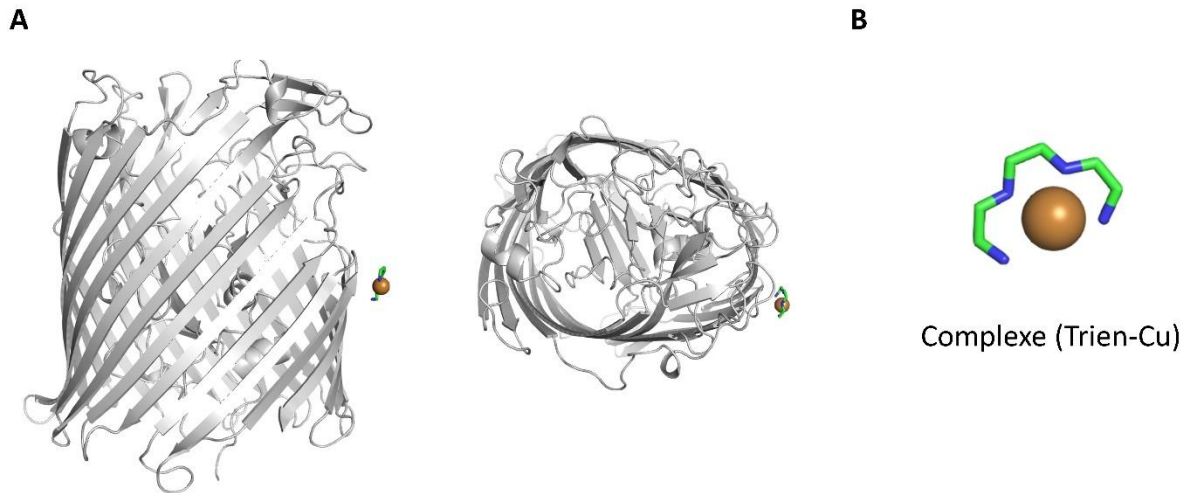


Figure 49. Modèle AlphaFold3 représentatif de l'interaction de CrtA^{Bp} avec le complexe Cu-Trien. (A) Vue membranaire et extracellulaire de CrtA^{Bp} avec le complexe Cu-Trien situé à la surface externe du transporteur. (B) modèle du complexe Cu-Trien généré par AlphaFold3.

Afin d'expliquer l'effet positif du Trien sur la croissance de Bp- Δ *cydAB* en limitation en cuivre, nous avons étudié plus en détail la croissance de cette souche en présence de Trien seul.

Comme le Trien est spécifique au Cu(II), nous avons enlevé l'ascorbate du milieu de culture pour éviter la réduction du cuivre. Dans ces conditions, Bp- Δ *cydAB* était incapable de croître (Fig. 50A). Ce défaut de croissance n'était pas lié à l'absence d'ascorbate lui-même, puisque nous avons montré précédemment que l'absence d'ascorbate n'affecte pas la croissance (Fig. 36). Cela suggère que dans ces conditions le complexe Cu-Trien n'est pas internalisé et que le cuivre devient inaccessible à la bactérie en présence de Trien.

Pour approfondir ces observations, l'ascorbate a été remplacé par d'autres réducteurs : le glutathion réduit (GSH) et le TCEP (tris(2-carboxyéthyl) phosphine) (Fig. 50 C et D). En présence de ces réducteurs Bp- Δ *cydAB* a démarré sa croissance plus tôt qu'en présence d'ascorbate (Fig. 50 B), probablement parce que les pouvoirs réducteurs de GSH et de TCEP sont plus faibles que celui de l'ascorbate. Cependant, l'ajout de Trien a bloqué la croissance dans ces

conditions. Ces résultats indiquent que l'importation du cuivre en présence de Trien n'est possible que lorsque l'ascorbate est présent dans le milieu.

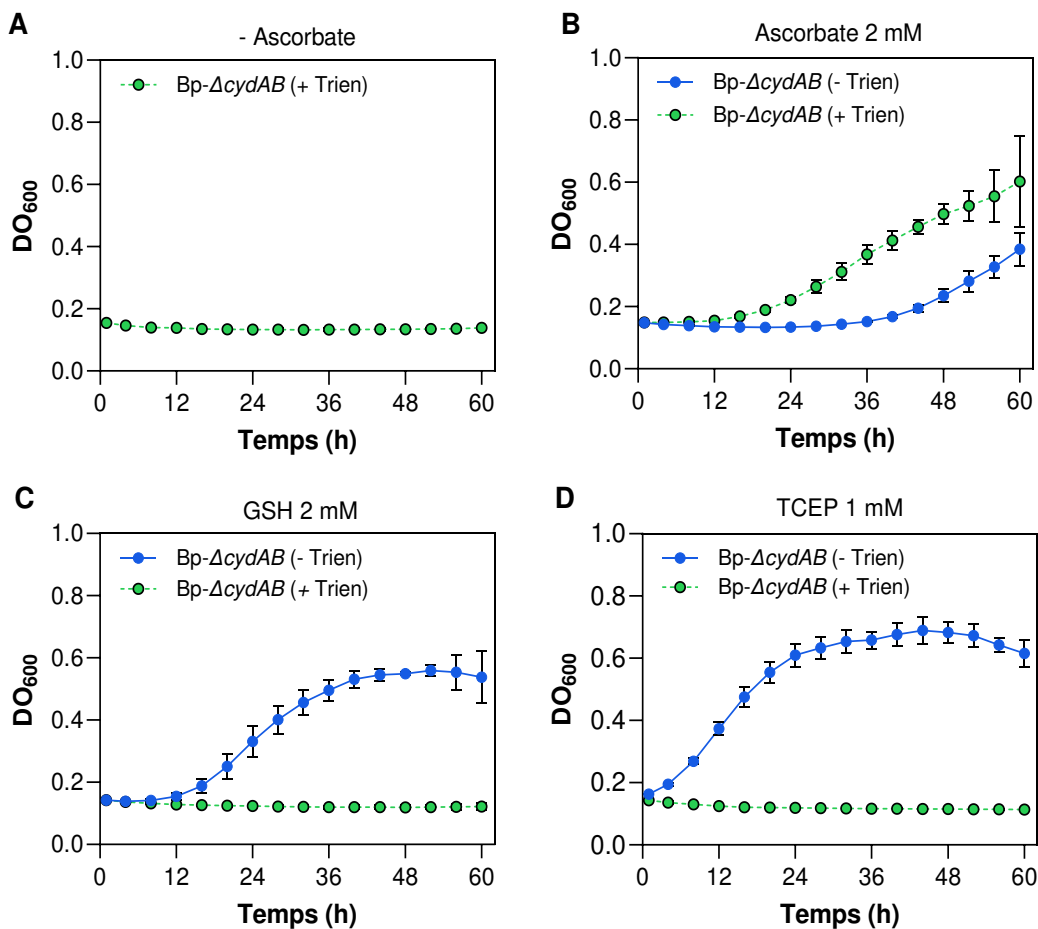


Figure 50. Effet du Trien sur la croissance du mutant Bp- Δ cydAB en condition de limitation en cuivre. La limitation en cuivre a été induite par l'ajout de 20 μ M de BCS. (A) En absence d'ascorbate, l'ajout de 500 μ M de Trien seul inhibe la croissance de Bp- Δ cydAB. (B) En présence de 2 mM d'ascorbate comme réducteur, l'ajout de 500 μ M de Trien favorise la croissance de Bp- Δ cydAB, suggérant une meilleure acquisition du cuivre. (C, D) Lorsque l'ascorbate est remplacé par 2 mM de glutathion réduit (C) ou 1 mM de TCEP (D), le Trien empêche totalement la croissance. Résultats représentatifs de trois réplicats biologiques.

Ces données conduisent à l'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire Cu-Trien-ascorbate, qui pourrait être reconnu et importé par CrtA^{Bp}.

Nos résultats suggèrent donc que dans des conditions de culture *in vitro*, le transporteur CrtA^{Bp} n'est pas strictement spécifique et peut transporter différents complexes de Cu(II), y

compris avec des composés non physiologiques. Il présente néanmoins une certaine sélectivité puisque les complexes EDDS-Cu et Trien-Cu sans ascorbate ne sont pas importés.

4.5.1. Effet direct de NTA sur l'importation de cuivre par CrtA^{Bp}

L'ICP-MS/AES est une méthode couramment utilisée pour étudier le transport des métaux en mesurant la concentration intracellulaire en métal. Nous n'avons pas pu réaliser ce test dans les conditions où le phénotype de croissance lié à la délétion de *crtA* est observé, c'est-à-dire chez les souches délétées pour *cydAB*. En effet, le mutant Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB* nécessite l'ajout de cuivre pour assurer sa croissance. Dans ces conditions, le cuivre peut pénétrer de manière non spécifique via les porines, ce qui empêche une interprétation précise des résultats. De plus l'expression de l'opéron contenant *crtA* est inhibée par la présence de Cu.

Des essais antérieurs effectués dans le laboratoire comparant les concentrations intracellulaires en cuivre de la souche sauvage et Bp- Δ *crtA* n'ont révélé aucune différence significative entre les deux souches. Une explication probable est la forte concentration de cuivre utilisée (100 μ M), à laquelle le cuivre entre probablement par des voies non spécifiques, masquant ainsi l'effet du transporteur CrtA.

Nos résultats précédents ont suggéré que dans les conditions de culture *in vitro* CrtA peut utiliser le NTA comme ligand pour importer le cuivre. Nous avons donc effectué le test ICP-MS de la façon suivante : nous avons comparé la concentration intracellulaire en cuivre dans BPSM et Bp- Δ *crtA* à T_0 (avant addition de cuivre) et après 5 minutes d'incubation avec 10 μ M de cuivre en présence de 500 μ M de NTA (Fig. 51). À T_0 , les deux souches présentaient des concentrations intracellulaires similaires en cuivre. Après 5 min d'incubation avec les deux composés, la concentration intracellulaire en cuivre a augmenté dans les deux souches, mais la souche parentale BPSM présentait une accumulation significativement plus importante que Bp- Δ *crtA*^{Bp}, montrant le rôle positif du NTA sur l'importation du Cu par CrtA.

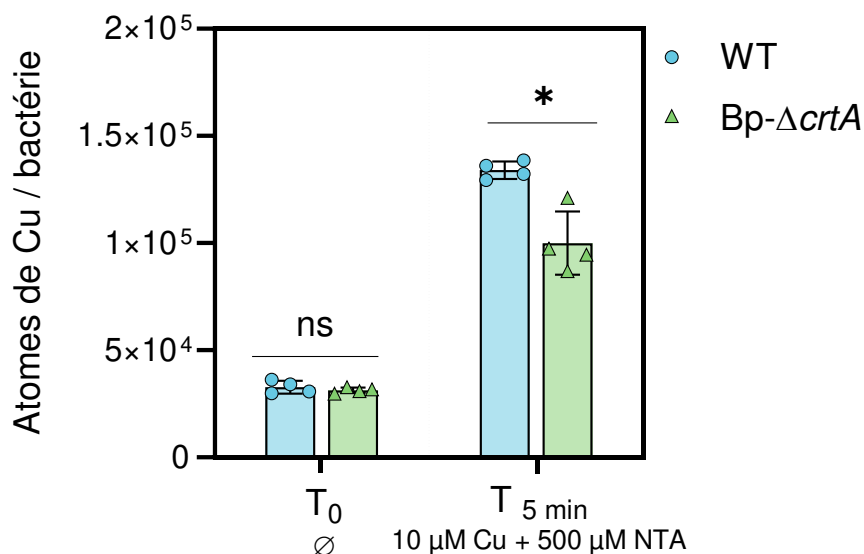


Figure 51. Dosage de la concentration du cuivre intracellulaire chez *B. pertussis* sauvage et Bp- Δ *crtA* par ICP-AES. Mesure à T₀ avant ajout de cuivre ou après 5 min d'incubation avec 10 μ M CuSO₄ en plus de 500 μ M de NTA. Les données correspondent à la moyenne \pm écart type de quatre réplicats biologiques. Résultat analysé par le test de Mann-Whitney ($P < 0.05$).

Cependant, la quantité de cuivre a augmenté également chez le mutant Bp- Δ *crtA*^{Bp} entre les temps T₀ et T₅. Cela peut être lié à plusieurs raisons : (i) une concentration de cuivre relativement élevée favorisant l'entrée non spécifique via les porines, (ii) une formation incomplète du complexe Cu-NTA (le cuivre se fait réduire par l'ascorbate dans le milieu avant de se lier au NTA qui lie le cuivre oxydé), (iii) une expression sous-optimale de *crtA*, puisque bactéries avaient été précultivées dans un milieu standard (0,5 μ M de cuivre), alors que l'induction maximale d'expression de *crtA* est causée par la carence en cuivre.

Afin d'optimiser les conditions expérimentales, nous avons répété l'expérience avec des bactéries pré-carencées en cuivre par l'ajout de BCS (20 μ M). Avant le test, le BCS a été éliminé par lavage avec du milieu SS frais. La concentration de cuivre ajoutée a été réduite à 2 μ M, et le complexe Cu-NTA a été préformé préalablement en mélangeant 500 μ M de NTA à 2 μ M de CuSO₄ avec agitation pendant 2 h à température ambiante.

Le dosage ICP-MS a ensuite été réalisé à T₀ et après 5 minutes d'incubation avec Cu seul ou Cu-NTA (Fig. 52). Même après pré-carence, une faible quantité de cuivre intracellulaire persistait à T₀, suggérant un certain stock de cuivre dans les bactéries. L'ajout de 2 μ M de cuivre libre (CuSO₄) a entraîné une augmentation similaire du cuivre intracellulaire dans les

deux souches. En revanche, en présence du complexe Cu-NTA, une augmentation légère mais significative de la teneur intracellulaire en cuivre a été observée uniquement chez BPSM, mais pas chez Bp- $\Delta crtA^{Bp}$. Cette différence très légère reste cohérente avec les essais précédents, et indique que CrtA permet l'import du complexe Cu-NTA, confirmant ainsi que le NTA agit comme un pseudo-ligand de CrtA.

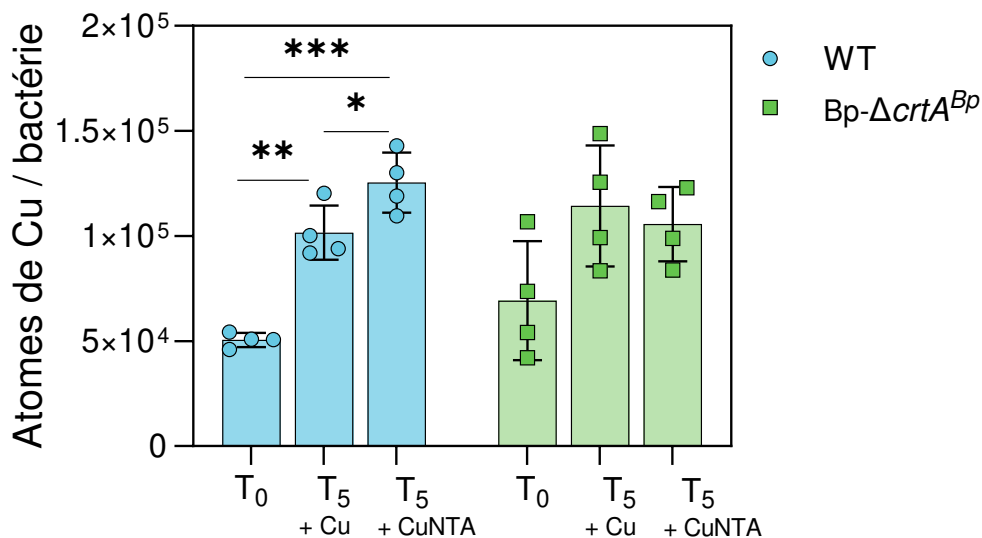


Figure 52. Dosage de la concentration du cuivre intracellulaire par ICP-AES chez *B. pertussis* sauvage et Bp- $\Delta crtA^{Bp}$ précaférencées en cuivre. Mesure à T₀ avant ajout de cuivre ou après 5 min d'incubation avec 2 μ M de cuivre ou bien avec le complexe Cu-NTA (2 μ M Cu/500 μ M de NTA). Les données correspondent à la moyenne \pm écart type de quatre réplicats biologiques. Résultat analysé par le test de Kruskal-Wallis (P<0.05).

4.6. Criblage *in silico* de ligands de CrtA^{Bp}

Les résultats présentés précédemment suggèrent que CrtA peut reconnaître et transporter des complexes de Cu(II) avec des ligands non physiologiques tels que NTA ou Trien-Ascorbate. Cela indique que CrtA n'est probablement pas strictement spécifique à un seul ligand. Afin d'évaluer sa capacité à reconnaître d'autres composés, nous avons établi une liste de 44 molécules comprenant des sidérophores appartenant à différentes familles, des chalcophores, divers métabolites (acides organiques, acides aminés et vitamines), ainsi que des sidérophores conjugués à des antibiotiques. En collaboration avec les Drs Manon Mirgaux

et René Wintjens (Université Libre de Bruxelles), un criblage *in silico* a été réalisé avec AlphaFold3 pour simuler l'interaction entre CrtA et ces molécules en présence de cuivre.

Les composés ont été classés selon la fiabilité des prédictions obtenues à partir de 25 modèles générés pour chaque molécule, ainsi que selon la position du complexe par rapport à celle du citrate observé en cristallographie.

Cette analyse met en évidence une préférence de CrtA pour les molécules comportant des groupes carboxylates, souvent associés à des atomes d'azote. Cette tendance ne semble pas liée à la charge du site de fixation, qui ne comporte qu'une seule arginine, d'autant plus que certaines molécules contenant des carboxylates n'ont pas été bien classées. Les résultats du criblage AF3 concordent avec les données expérimentales obtenues. L'analyse détaillée est présentée dans l'article n°1 publié dans « Journal of Biological Chemistry ».

5. [Article N°1: A new family of TonB-dependent copper transporters linked to respiratory oxidase function](#)

A new family of TonB-dependent copper transporters linked to respiratory oxidase function

Received for publication, September 11, 2025, and in revised form, December 17, 2025 Published, Papers in Press, January 20, 2026
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2026.111180>

Majda Hachmi¹, Manon Mirgautx², René Wintjens², Chloé Carassus³, Pascal Arnoux³, Gauthier Roy¹, Alex Rivera-Millot¹, Stéphanie Slupek¹, Anne-Sophie Debrie¹, Véronique Alaimo⁴, Gabriel Billon⁴, Loïc Coutte¹, Rudy Antoine^{1,*}, and Françoise Jacob-Dubuisson^{1,*}

From the ¹University of Lille, Inserm, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France; ²Université Libre de Bruxelles, Faculty of Pharmacy, Department of Research in Drug Development, Unit of Microbiology, Bioorganic and Macromolecular Chemistry, Bruxelles, Belgium; ³Aix Marseille University, CEA, CNRS, BIAM, Saint-Paul-lez-Durance, France; ⁴CNRS, UMR8516 Laboratoire de Spectroscopie pour les Interactions, la Réactivité et l'Environnement, Université de Lille, Lille, France

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Ursula Jakob

Copper is an essential metal notably found in respiration complexes for its redox properties. It is also toxic hence its cellular trafficking is tightly controlled. Bacteria have developed a number of defense systems against copper excess, but its acquisition pathways remain poorly characterized. Ubiquitous in Gram-negative bacteria, TonB-dependent transporters (TBDTs) are outer membrane β -barrel proteins that mediate the proton motive force-dependent import of various nutrients to the periplasm. Here, we characterized a TBDT that imports copper in the whooping cough agent *Bordetella pertussis*, CrtA^{BP} (formerly BfG), which is a prototype of a new sub-family of TBDTs. Our data indicate that CrtA^{BP} is dedicated to the import of copper for heme-copper respiratory oxidoreductases. We revealed that CrtA^{BP} imports chelated rather than free copper, solved the crystal structure of CrtA^{BP} and identified a conserved ligand binding site. By combining bacterial growth experiments, biophysical approaches and AlphaFold3 modeling we sketched out the features of copper-ligand complexes for CrtA^{BP}. In contrast with ferrisiderophore-specific TBDTs, no high-affinity chalkophore ligand of CrtA^{BP} could be identified, implying two nonmutually exclusive models. In the host, CrtA^{BP} might use a xenometallophore produced by another species present in the same niche to acquire copper. *In vitro* however, CrtA appears not to have high-affinity ligands but to import copper chelated by small molecules notably harboring carboxylate groups, which might represent a paradigm of 'scavenger' TBDTs with low ligand selectivity. We identified an essential, invariant histidine residue that might serve as a selectivity filter for copper-chelate complexes.

Copper (Cu) is used by organisms living in oxygen-rich environments as an important cofactor for redox centers and electron transfer reactions in various processes, including energy generation. Heme-copper oxidoreductase (HCO) cytochrome c oxidases are notably the most frequent cuproproteins in aerobic bacteria (1). Bacteria also employ Cu in superoxide dismutases to neutralize reactive oxygen species produced by phagocytic cells (2). However, the use of copper is associated with dangers. Cu (I) in excess can inactivate essential iron-sulfur cluster enzymes, generate reactive oxygen species and induce protein misfolding and aggregation (3, 4). There is hardly any free copper available in cells, and its intracellular trafficking relies on metal-mediated protein-protein interactions (5).

Bacteria strictly regulate their intracellular copper homeostasis. Various defense systems protect Gram-negative bacteria against its toxicity including extrusion, periplasmic oxidation of Cu(I) into Cu(II) and sequestration in the periplasm or the cytoplasm (3). In the context of infection, host nutritional immunity encompasses both metal intoxication of microorganisms, well documented for Cu, and their starvation of metals such as Fe, Mn and Zn, a concept that has recently emerged for Cu as well (6–8). However, little is known about copper acquisition in prokaryotes. Cu influx through the cytoplasmic membrane is notably mediated by small mechanosensitive channels (9) or specific transporters (10, 11). Across the outer membrane, passive diffusion *via* porins is considered the primary Cu(II) import pathway in diderm bacteria although this is likely insufficient under copper-limiting conditions (12, 13). Few Cu-specific outer membrane transporters have been identified. They belong to the TonB-dependent transporters (TBDT) superfamily, characterized by a conserved scaffold *i.e.*, a C-terminal 22-stranded β -barrel domain and an N-terminal plug domain that obstructs the barrel. TBDTs mediate the transport of various nutrients using the proton motive force delivered by the inner membrane TonB-ExbBD complex (14). Among copper-importing TBDTs, OprC of *Pseudomonas aeruginosa*

* For correspondence: Rudy Antoine, rudy.antoine@pasteur-lille.fr;
Françoise Jacob-Dubuisson, francoise.jacob@cnrs.fr.

Present addresses for: Gauthier Roy, Institute for Molecular Infection Biology (IMB), Faculty of Medicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany; A. Rivera-Millot, Aix Marseille Université, CNRS, BIP, UMR 7281, IMM, Marseille, France.

New TonB-dependent copper transporter

and MbnT of *Methylosinus trichosporium* import naked copper ions and copper ions in complex with modified peptides called methanobactins, respectively (15, 16). Copper can also be imported in complex with the broad-spectrum siderophore yersiniabactin through the YbtA/FyuA TBDT (17).

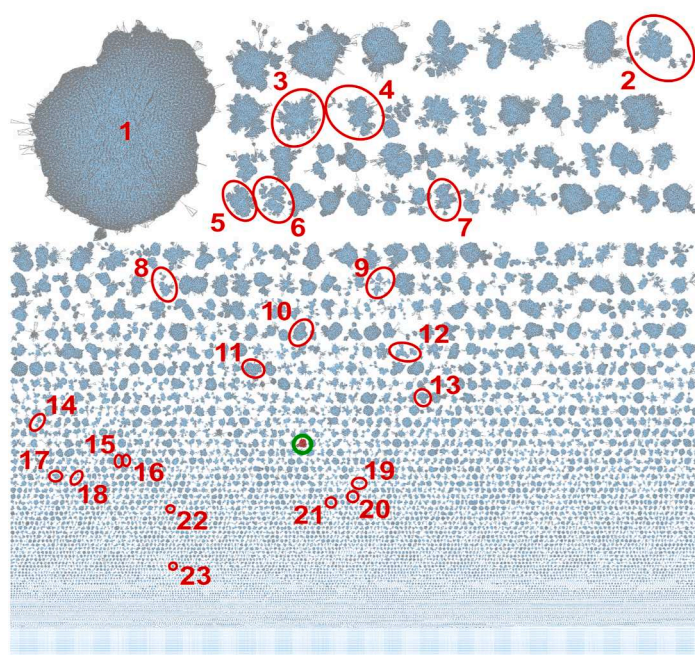
Bordetella pertussis is a strictly aerobic, Gram-negative bacterium responsible for whooping cough. It produces virulence factors controlled by the two-component system BvgAS to colonize the human upper respiratory epithelium (18, 19). With respect to copper homeostasis *B. pertussis* has streamlined its mechanisms of protection compared with environmental bacteria, most likely because its exposure is low in its restricted niche (20, 21). Transcriptomic analyses have revealed a strong repression of the three-gene operon *cruR-bfrG-bp2921* by copper excess. This regulation is post-transcriptionally mediated by the first gene of the operon coding for the upstream open reading frame CruR (22). CruR homologs are encoded in copper-related operons in various species (22). The second gene encodes BfrG (renamed CrtA^{Bp} in this study), one of the 15 TBDTs of *B. pertussis* and the only one to respond to copper (22). Unlike the genes of FauA, BhuR and BfeA, whose products transport Fe(III) in complex with alcaligin, heme and enterobactin, respectively, the *cruR-crtA-bp2921* promoter lacks a Fur-binding site (23). The third gene of the operon, *bp2921*, codes for a cytoplasmic membrane protein with two large periplasmic domains, which belongs to the PepSY_TM family (Pfam PF03413). The function of the *bp2921* gene product in *B. pertussis* is

unknown, but its distant *P. aeruginosa* FoxB homolog was shown to be a reductase of Fe(III) in complex with the siderophore ferrioxamine (24). Here we discovered that BfrG/CrtA^{Bp} is a TBDT that plays a role in copper acquisition most likely for respiratory HCOs.

Results

BfrG/CrtA^{Bp} is the prototype of a family of TonB-Dependent Transporters

To determine the position of BfrG/CrtA in the TBDT family tree, we built a sequence similarity network. The representative node network showed hundreds of distinct sequence clusters, a small one of which includes BfrG/CrtA (circled in green in Fig. 1). This sequence cluster is distinct from all the clusters of TBDTs of known structure, from those of known *B. pertussis* TBDTs, and from those characterized in *P. aeruginosa*, including OprC (Figs. 1, S1 and Tables S1 and S2). However, PA0434 of *P. aeruginosa* (OptJ/CrtA^{Pa}), which is produced in response to low copper availability (25, 26) belongs to the same sequence cluster as BfrG/CrtA (Fig. S1). As the expression of these proteins is controlled by copper, we propose to name them 'CrtA' (copper-responsive transporter A), hence that of *B. pertussis* will be hereafter called CrtA^{Bp}. On the premise that transporters of the same cluster are isofunctional, CrtA-type TBDTs likely have a distinct specificity.



N° Cluster	Names	Ligands
1	SusC	Glycans
	RagA	Peptides
2	FemA	Aeruginic Acid, Dihydroaeruginic acid, Ferric-Pyochelin
	BauA	Ferric Preacinetobactin-Acinetobactin
3	FoxA	Ferrioxamine B, Nocardamine, Bisucaberin
	FetA	Ferric-Enanthiopyochelin
4	FpvA	Ferric-Pyoverdine
	FauA	Alcaligin*
	FhuE	Coprogen
5	PqqU/YncD	Pyrroloquinoline Quinone
6	PiuA	Monocatecholates*
	PiuD	
7	OprC	Copper, (Silver)
8	BtuB	Cobalamin*
9	FptA	Ferric-Pyochelin
10	FepA	
	PfeA	Azotochelin, Ferric-Enterobactin, Protochelin
	PirA	
11	Fiu	Ferric-Catecholate*
12	ZnuD	Zinc, (Cadmium)
13	BtuB	Cobalamin*
14	HasR	Heme
15	BtuB	Cyanocobalamin
16	FrpB (FetA)	Iron, Ferric-Catecholate*
17	TbpA	Serotransferrin
18	FyuA	Ferric-Yersinabactin*
19	FecA	Citric Acid
20	PhuR	Protoporphyrin IX
21	FhuA	Ferrichrome, Phenylferrirocen, (microcin J25)
22	ShuA	Heme*
23	Cir	(Colicin I)*

Figure 1. Sequence similarity analysis of the TBDT superfamily. The representative node network (AST value = 180) shows the full diversity of the superfamily. To make the analysis possible sequence redundancy was reduced to < 70% (approx. 300,000 proteins left out of > 2 10⁶). The sequence cluster that contains CrtA^{Bp} and its orthologs is circled in green. The numbered clusters (circled in red) are those for which X-ray structures are available (see Table S1 for the pdb ID numbers). The list at the right provides all unique crystallized proteins found in the indicated sequence clusters and their cocrystallized ligands. The asterisks indicate examples of known ligands that were not cocrystallized with their respective TBDTs. The parentheses indicate nonnatural or parasitic ligands. The BtuB proteins of Bacteroidota (clusters eight and 13) and Pseudomonadota (cluster 15) form separate clusters according to this analysis. See Fig. S1 for the *B. pertussis* and *P. aeruginosa* TBDTs and for the known copper-importing TBDTs, and Table S2 for the Genbank ID numbers of all TBDTs found in the labeled clusters.

CrtA orthologs are 707 to 911 residues long and mostly found in β - and γ -Proteobacteria. We built a sequence logo which showed no conserved Cys and Met residues and only two conserved His residues, known to preferentially bind Cu(I) and Cu(II), respectively (Fig. S2). We determined the genetic environments of *crtA* orthologs using a Rodeo-type approach (21). In > 75% of the genetic loci, *crtA* genes are followed by genes coding for PepSY_TM-type proteins homologous to the *bp2921* gene product in *B. pertussis* (Fig. 2 and Table S3). More than 40% of the operons harbor *cruR* orthologs in first position, indicating that copper regulation of these operons is widespread (22). ExbBD- and TonB-coding genes were found in some cases, indicating that the corresponding TBDTs may use specific TonB complexes. Genes for the copper chaperones PCuAC and ScoI involved in HCO assembly (27, 28) were found in a few operons (Fig. 2 and Table S3).

Search for a role of CrtA^{Bp}

To investigate the potential involvement of CrtA^{Bp} in copper import, we used a mutant strain harboring an in-frame deletion of *crtA*, *Bp-ΔcrtA^{Bp}* (22). We checked the absence of a polar effect of the deletion on the following *bp2921* gene by RT-qPCR (Fig. S3), and we also verified the absence of extraneous mutations by whole genome sequencing. We then compared the growth of *Bp-ΔcrtA^{Bp}* with that of the wt strain called BPSM, in standard medium or with a specific Cu(I) chelator, bathocuproine disulfonate (BCS), added to the cultures to cause copper limitation (21). No growth difference was observed between the mutant strain and its parent (Fig. 3, A and B). To assess the possibility that *crtA* is in decay in the

B. pertussis genome, we inspected this gene in all sequenced isolates. It was identical to that of BPSM in 98% cases, appeared to be inactivated by a frameshift mutation in three cases only and was absent from a single strain (Table S4). This strong conservation supports the idea that CrtA^{Bp} plays a role in *B. pertussis*.

We thus tested if CrtA^{Bp} might be required *in vivo* by performing a colonization experiment. Mice were inoculated intranasally with BPSM or *Bp-ΔcrtA^{Bp}*. Over the course of the infection, however, similar numbers of WT and mutant bacteria were found in the mice nasal cavities and lungs (Fig. S4). To test the competitiveness of the *Bp-ΔcrtA^{Bp}* strain, we co-infected mice with the mutant strain and its isogenic parent in equal numbers. Under these conditions, *Bp-ΔcrtA^{Bp}* was cleared faster than BPSM from both the mice nasal cavities and lungs (Fig. 3, C and D). Thus, although CrtA is not essential, it appears to contribute to bacterial fitness *in vivo*.

Link with respiration

The *crtA^{Bp}* gene is close to the HCO operon *cyoABCD* (*bp2930–33*). As HCOs are major cuproproteins in *B. pertussis* (20), we asked if CrtA^{Bp}'s role might be related to HCO function. *In silico* analyses of *crtA*-harboring genomes showed that they all also harbor HCO-coding genes, and most also have PCuAC- and ScoI-coding genes, indicating that these bacteria assemble HCO complexes (Table S3).

B. pertussis possesses two HCOs, the cytochrome bo oxidase CyoABCD and the cytochrome aa3 oxidase CtaCDFGE, as well as a copper-independent cytochrome bd ubiquinol oxidase, CydAB (29). We separately deleted the corresponding three operons and tested the growth of the mutant strains in copper-limiting or copper-replete conditions. The absence of *cydAB* severely impacted growth in copper limitation, unlike that of either of the other two operons, and growth was rescued by copper supplementation (Fig. 4, A and B). CydAB is thus essential for growth in copper-limiting conditions, whereas in its absence the HCOs sustain growth provided that copper is present.

Taking advantage of the dependence of *Bp-ΔcydAB* on copper, we deleted *cydAB* in *Bp-ΔcrtA* and monitored the growth of the resulting strain in copper-limiting (+BCS) or copper-replete (+CuSO₄) conditions. After 24 h *Bp-ΔcydAB* started growing in the presence of BCS, unlike *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, whereas the addition of CuSO₄ supported the growth of both strains (Fig. 4, C and D). The growth phenotype of *Bp-ΔcrtAΔcydAB* was complemented by the expression of *crtA^{Bp}* from a plasmid, although partially (Fig. S5). The long lag in the growth curve of *Bp-ΔcydAB* under copper-limiting conditions was reduced if ascorbate was removed from the medium (Fig. S6). We interpret these results as follows. At the start of the culture ascorbate reduces all available Cu(II), and Cu(I) is chelated by BCS. This starves bacteria of copper and hampers growth. Progressive oxidation of ascorbate over time in the strongly aerated cultures makes Cu(II) gradually available, allowing bacterial growth to resume. In copper-replete conditions (Fig. 4D) *Bp-ΔcrtAΔcydAB* and *Bp-*

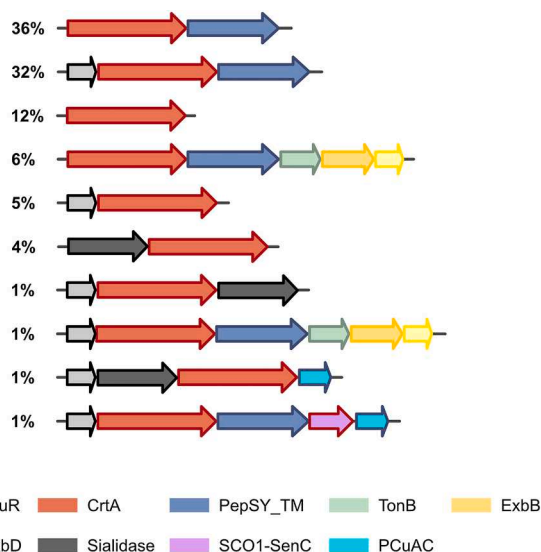


Figure 2. Genetic organizations of the operons harboring *crtA* orthologs. The CrtA-coding genes are shown in red, the genes most frequently found in genetic association with them are represented in other colors, and the types of proteins encoded are provided below. The frequency at which each genetic organization is found is indicated as a percentage (relative to the number of genomes included in this analysis). See Table S3 for genomic analyses of the bacterial strains that harbor *crtA* genes.

New TonB-dependent copper transporter

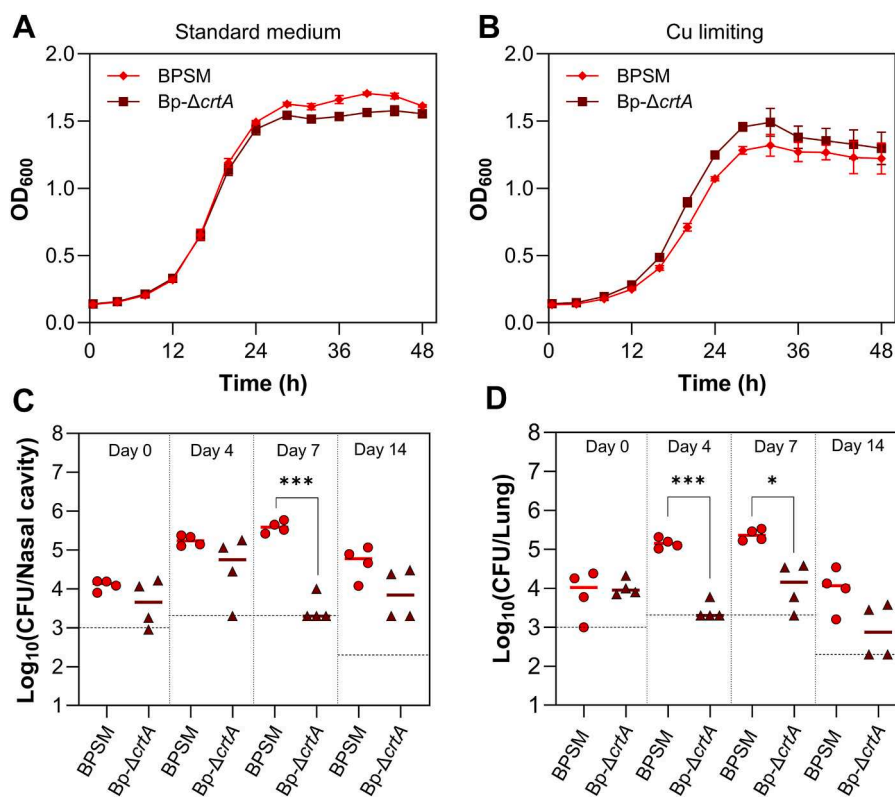


Figure 3. Role of CrtA *in vitro* and *in vivo*. A and B, BPSM and *Bp-ΔcrtA* were grown in SS medium (A) or under Cu limitation caused by the addition of 50 μM BCS (B). The use of BCS, a Cu(I) chelator, was justified by the reducing power of the SS medium (which contains 2 mM ascorbic acid), making available copper in the Cu(I) form. All growth curves are representative of three biological replicates, with the means and standard deviations (SD) calculated on four technical replicates. C and D, following coinfection of mice with WT *B. pertussis* and *Bp-ΔcrtA*, bacterial loads were quantified in the nasal cavities (C) and lungs (D). The two strains were mixed and co-inoculated in equal numbers, using a BPSM variant harboring a gentamycin resistance gene for colony-forming units counts on plates. Each point represents an individual mouse, and the dashed lines indicate the limits of detection. Statistical significance was determined using a non-parametric permutation-based ANOVA (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

ΔcydAB grew similarly, most likely thanks to nonspecific import of Cu(II). Collectively, these results indicated that CrtA^{Bp} imports Cu(II) and appears to be dedicated to HCOs in *B. pertussis*.

Structure of CrtA^{Bp} and role of the conserved binding site

We determined the structure of recombinant CrtA^{Bp} by X-ray crystallography in two crystal forms (Table S5). CrtA^{Bp} adopts a typical TBDT fold, composed of a 22-strand β barrel comprising residues 178 to 732, obstructed by an N-terminal plug domain encompassing residues 42 to 171 and containing a typical 4-stranded mixed β sheet. The long extracellular β5-β6 and β9-β10 loops fold over the top of the short β20 to β6 barrel strands (Fig. 5A). Together with the β13-β14 and β21-β22 loops, they somewhat restrict access to the channel. The structure of the P2₁ crystal form of CrtA^{Bp} solved to 2.9 Å resolution shows the stabilization of two β-octylglucoside (βOG) molecules used to solubilize the protein, which delineate the membrane-spanning region (Fig. 5A). A P1 crystal form obtained using a citrate-containing buffer and solved to 2.3 Å resolution shows the stabilization of a citrate molecule in a conserved cavity on the extracellular side of CrtA^{Bp} (Fig. 5, B–D). Although the presence of citrate in CrtA^{Bp} might be a crystallization artefact, its position globally

corresponds to those of Fe(III)-siderophore complexes in their respective receptors (30, 31). Furthermore, it was located in the vicinity of residues highly conserved in the CrtA family, namely E337, Q356, H358, R395, W265 and Y130 (Fig. S2). Y130 is part of the plug, W265 belongs to the β5-β6 loop, E337 is in β7, H358 and Q356 in β8 and R395 in β9. Their conservation suggests that they might form a ligand binding site (Fig. 5, C and D). Attempts to soak the crystals with copper or to co-crystallize CrtA with a Cu-citrate complex were unsuccessful.

To probe the importance of this putative binding site, we replaced all six conserved residues with Ala in *B. pertussis*, yielding *Bp-CrtA_{MM}* (for Multiple Mutant). The substitutions did not affect the production of the transporter as shown by Western blot analysis (Fig. 6A). Comparison of the growth phenotype of *Bp-CrtA_{MM}ΔcydAB* with those of *Bp-ΔcydAB* and *Bp-ΔcrtAΔcydAB* under copper-limiting conditions showed that *Bp-CrtA_{MM}ΔcydAB* phenocopied the deletion mutant (Fig. 6, B and C). To verify that the substitutions did not affect the folding and/or the stability of the protein, we produced recombinant WT and mutant CrtA^{Bp} and performed thermal unfolding analyses. Similar melting temperatures (T_m) of 71 °C were measured for both proteins, ruling out structural disruptions caused by the substitutions.

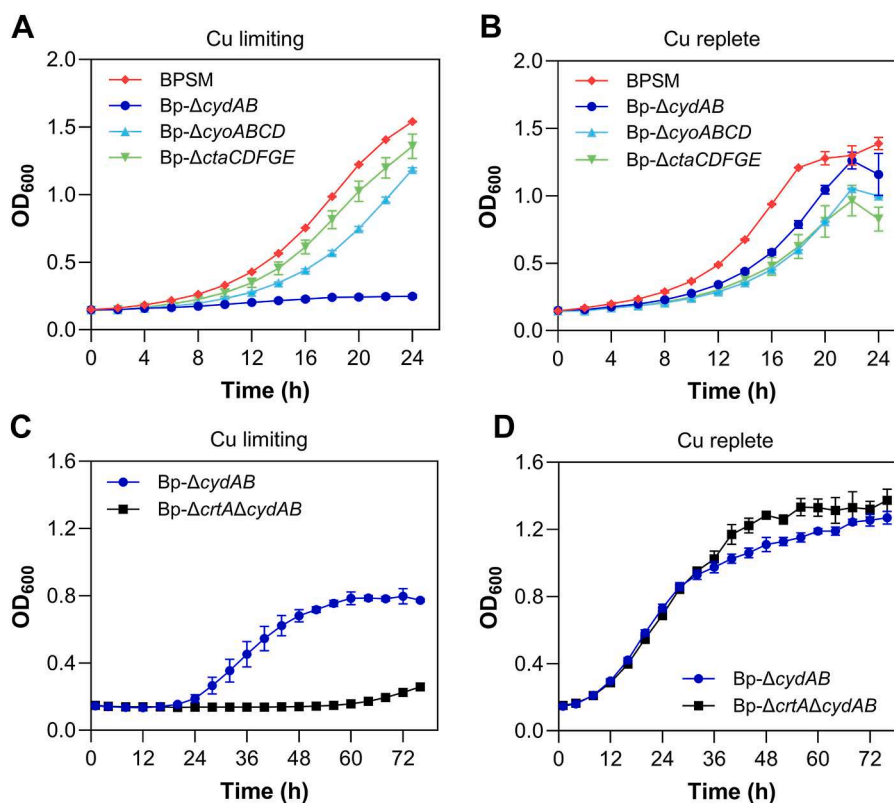


Figure 4. Growth phenotypes of respiratory mutants. A and B, growth of BPSM, *Bp-ΔcydAB*, *Bp-ΔcyoABCD* and *Bp-ΔctaCDFGE* in SS medium supplemented with either 50 μ M BCS (copper-limiting condition) (A) or 50 μ M CuSO_4 (copper-replete condition) (B). Unlike the two copper-dependent HCO mutants, *Bp-ΔcydAB* did not grow under copper-limiting conditions, indicating that *CydAB* function is essential when copper is unavailable. C and D, the copper-independent cytochrome bd ubiquinol oxidase deletion mutant *Bp-ΔcydAB* and the double mutant *Bp-ΔcrtAΔcydAB* were grown with 15 μ M BCS (C) or 15 μ M BCS + 2 μ M CuSO_4 (D). In (C), ascorbate present in the SS medium (2 mM) reduces Cu(II) to Cu(I), which is insoluble and chelated by BCS. The long lag phase for *Bp-ΔcydAB* likely corresponds to the time necessary for Cu(I) to be gradually re-oxidized in aerated cultures, making Cu(II) available for growth (see Fig. S6 for the effect of ascorbate and BCS on growth). Representative curves of three biological replicates are shown, with the means and SD calculated on three or four technical replicates.

Because His residues are prone to coordinate Cu(II) ions, we also introduced a single His358 to Ser substitution and assessed the growth phenotype of the resulting strain, *Bp-CrtA_{H358S}ΔcydAB*. The single His358-Ser substitution was sufficient to phenocopy *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, demonstrating the pivotal role of the invariant His residue for *CrtA^{Bp}* function (Fig. 6, B and C).

Search for *CrtA^{Bp}* ligands

The serendipitous presence of citrate in the *CrtA^{Bp}* cavity suggested that the transporter imports Cu(II) in a chelated form. Iron-specific TBDTs use endogenous siderophores or xeno-siderophores available in the same niche as Fe(III) ligands (32) or acquire Fe(III) from host-derived proteins (33). As for *CrtA^{Bp}*, the growth phenotypes shown above suggested that in laboratory conditions it imports Cu(II) in complex with a molecule present in the medium. *B. pertussis* synthesizes two metallophores, the siderophore alcaligin (34) and the chalkophore bufferin (35). However, inactivation of either operon in the *Bp-ΔcydAB* background did not phenocopy *Bp-ΔcrtAΔcydAB* (Fig. S7). *In silico* searches of *crtA*-harboring genomes failed to identify shared biosynthetic gene clusters encoding other known metallophores (Table S3).

The absence of endogenous metallophore candidates suggested that in laboratory conditions *CrtA^{Bp}* might import Cu chelated by a metabolite. To test this hypothesis, we selected a number of small organic molecules capable of binding Cu(II) and potentially secreted by *B. pertussis* or present in the medium, and we performed thermal unfolding analyses of recombinant *CrtA^{Bp}* with copper-ligand complexes (Table S6). The *T_m* of *CrtA^{Bp}*, 71.55 ± 0.04 °C, decreased to 70.48 ± 0.16 °C in the presence of 50 μ M CuSO_4 . Copper is known to destabilize proteins and to cause their aggregation (4). A few compounds increased the *T_m* of *CrtA^{Bp}* in the presence of Cu, suggesting the formation of ternary complexes (Table S6). Citrate had the largest effect, reproducibly increasing the *T_m* by 0.95 ± 0.16 °C at 100 μ M (Fig. 7A). This effect was specific as it was not observed for other compounds with higher affinities for Cu(II). Of note, citrate serves as a metallophore for Fe(III) uptake by the TBDT *FecA* (36).

Identification of a pseudoligand

We tested the effect of citrate on growth of *Bp-ΔcydAB* in copper-limiting conditions but observed no improvement (Fig. 7B). As the synthetic Cu(II) chelator nitrilotriacetic acid (NTA) is structurally related to citrate and was reported to act

New TonB-dependent copper transporter

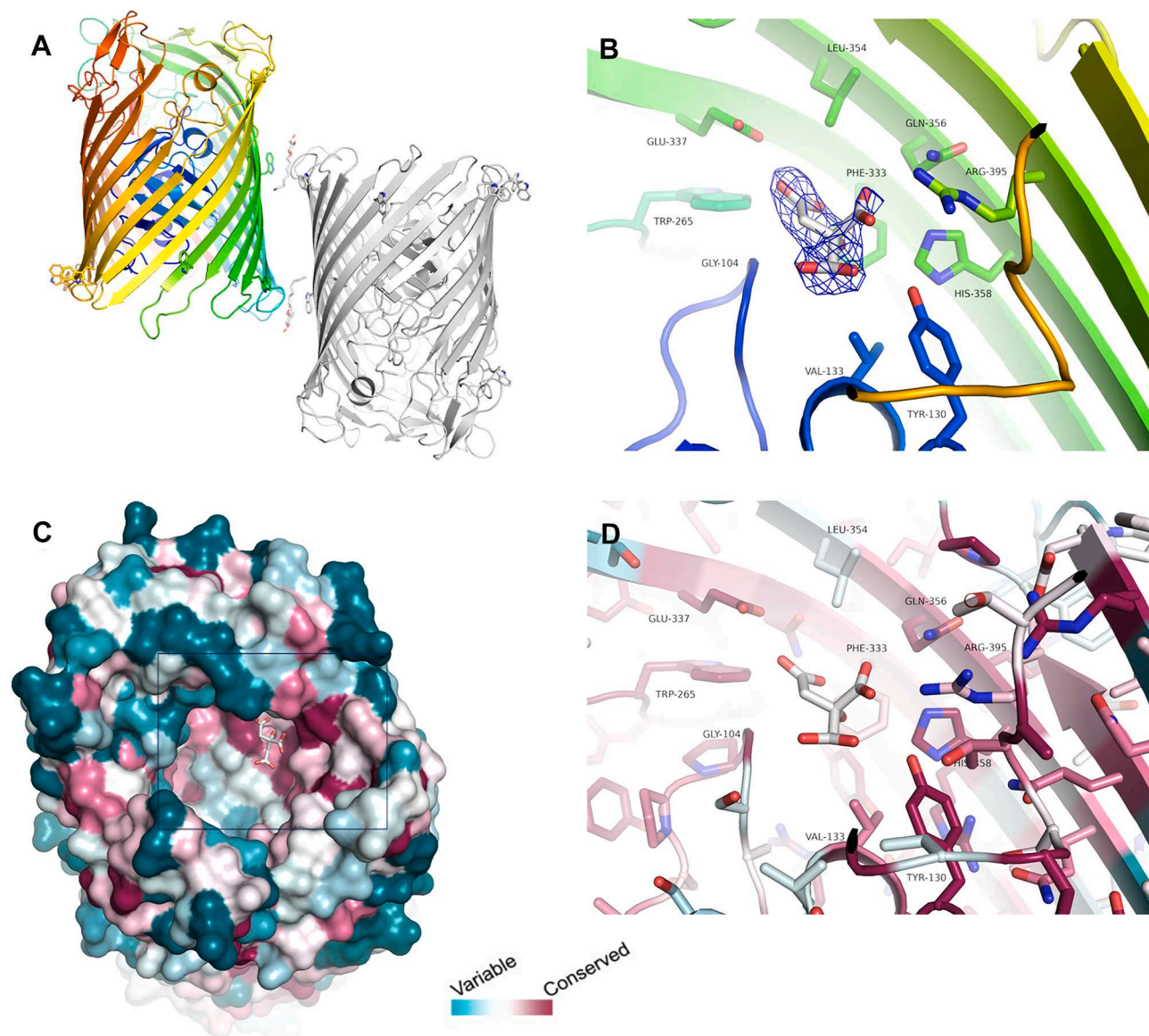


Figure 5. X-ray structure of CrtA^{BP}. *A*, crystal structure of the two molecules present in the asymmetric unit of the $P2_1$ space group. One molecule is colored from blue at the N-terminus to red at the C-terminus while the other is shown in gray. Two β OG molecules used during protein purification are visible and help to delineate the membrane-spanning region, along with Trp residues shown as sticks. *B*, structure of CrtA^{BP} from crystals obtained in the presence of citrate ($P1$ space group), showing a citrate molecule stabilized on the extracellular side. The electron density around citrate is depicted as of an $F_o - F_c$ omit map contoured at 2σ . Side chains of residues within 4 Å of the citrate are shown as sticks. *C*, surface representation of CrtA^{BP} as viewed from the extracellular side (*i.e.*, from the top if we refer to the position of the colored monomer in *panel A*), colored according to sequence conservation as defined in consurf. The citrate binding site appears to be relatively well conserved. The square indicates the region magnified in *panel D*) showing a close-up view of the citrate binding site with carbon atoms colored by sequence conservation score. Only residues within 4 Å of the citrate are labeled, several of which are conserved.

like a siderophore for iron import in *P. aeruginosa* (37), it was also tested. NTA reproducibly improved *Bp-ΔcydAB* growth and decreased the lag phase, suggesting that CrtA^{BP} could import a Cu(II)-NTA complex (Figs. 7C and S8). A natural Cu(II) chelator used as control, ethylenediamine di-succinate (EDDS) (38) instead impaired *Bp-ΔcydAB* growth (Fig. 7D), indicating that the effect of NTA is specific.

We compared the affinities of purified CrtA^{BP} for Cu(II)-citrate and Cu(II)-NTA complexes using a ratiometric fluorescence assay. A K_d value around 200 μ M was determined for the interaction of CrtA^{BP} with NTA-Cu(II), whereas the

affinities for NTA alone and for citrate-Cu(II) were millimolar (Fig. 7E). We also tested the CrtA_{MM} mutant protein in the same assay. Although an interaction with the NTA-Cu complex was detected, the binding curve reflected a different mode of binding than with the wt CrtA protein (Fig. S9). The growth phenotype of *Bp-CrtA_{MM}ΔcydAB* in NTA-supplemented medium was also tested (Fig. S9). It was similar to that of *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, most likely because the binding of NTA to the mutant protein is nonproductive *i.e.*, unable to induce the conformational changes involved in transport.

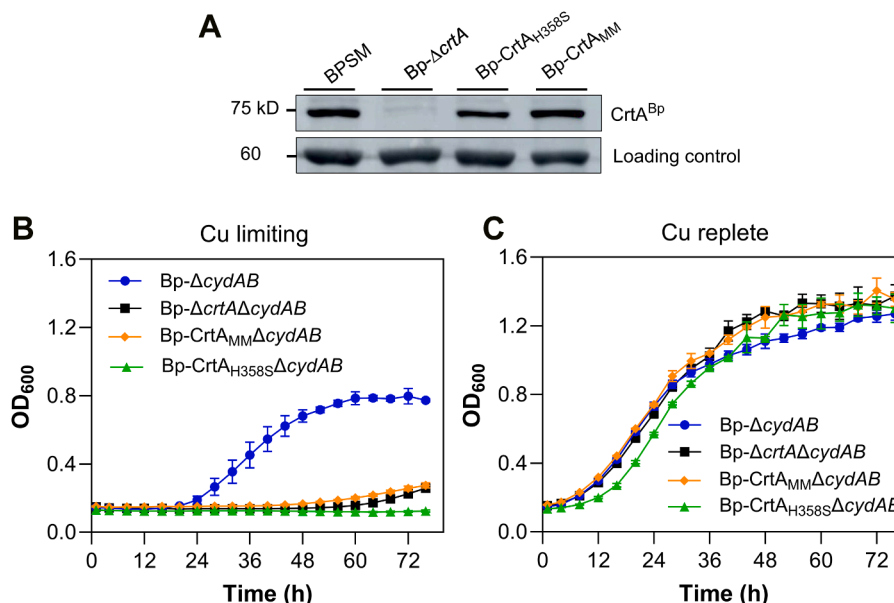


Figure 6. Importance of the ligand binding site for Cu uptake. *A*, expression of CrtA_{MM} and CrtA_{H358S} from the natural locus in *B. pertussis*. Clarified cell lysates of BPSM, *Bp-ΔcrtA*, *Bp-CrtA_{H358S}* and *Bp-CrtA_{MM}* were analyzed by immunoblotting using anti-CrtA^{Bp} antibodies. The loading control is a nonspecific protein band from the same immunoblot. *B* and *C*, *Bp-ΔcydAB*, *Bp-ΔcrtAΔcydAB*, *Bp-CrtA_{MM}ΔcydAB* and *Bp-CrtA_{H358S}ΔcydAB* were grown with 15 μM BCS (*B*) or 15 μM BCS + 2 μM CuSO₄ (*C*). Representative curves of three biological replicates are shown, with the means and SD calculated on three technical replicates.

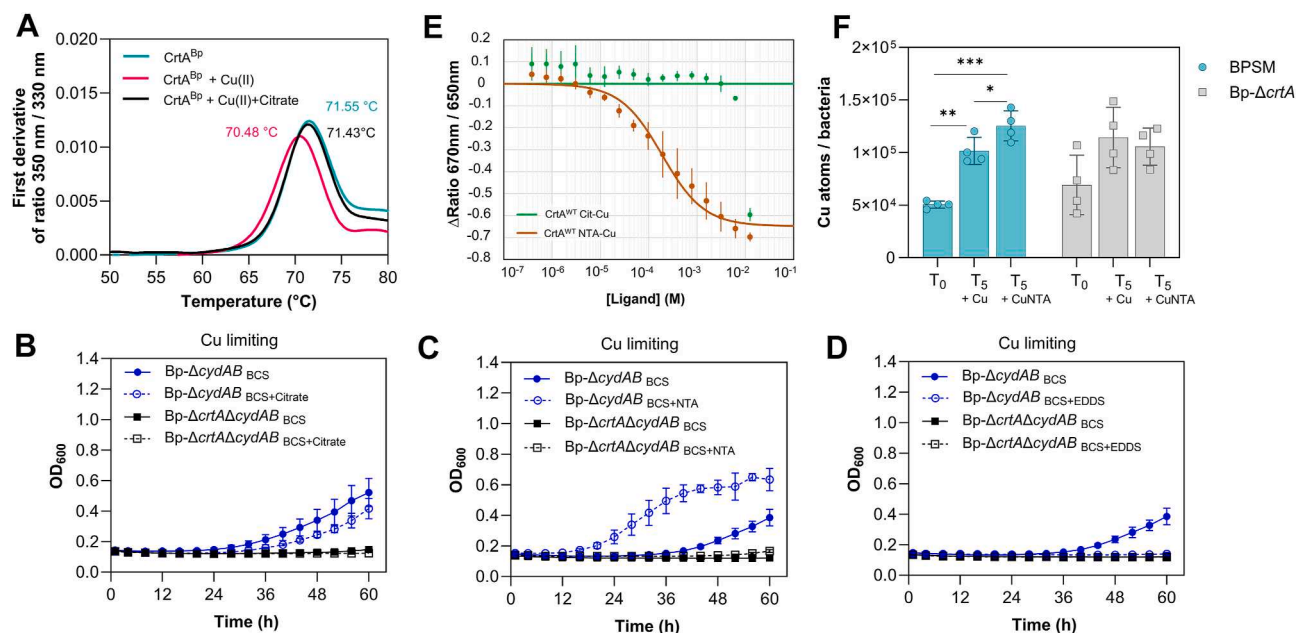


Figure 7. Nitrilotriacetic acid (NTA) is a pseudoligand of CrtA^{Bp}. *A*, citrate offsets the destabilizing effect of Cu(II) on CrtA^{Bp}. Thermal unfolding profiles of purified CrtA^{Bp} were monitored by measuring its intrinsic Trp fluorescence using a Prometheus Panta apparatus (NanoTemper). The first derivative of the fluorescence emission ratio at 350 nm/330 nm (3 biological replicates) was plotted against temperature. The derivatives of the means of three melting curves of CrtA^{Bp} alone (*teal*), CrtA^{Bp} + 50 μM CuSO₄ (*pink*), and CrtA^{Bp} + 50 μM CuSO₄ + 100 μM citrate (*black*) are shown. *B–D*, *Bp-ΔcydAB* and *Bp-ΔcrtAΔcydAB* were grown with 20 μM BCS or 20 μM BCS + 500 μM citrate (*B*), 20 μM BCS + 500 μM nitrilotriacetic acid (NTA) (*C*), or 20 μM BCS + 500 μM ethylenediamine di-succinate (*D*). The BCS concentration was raised to 20 μM in these experiments to prolong the lag phase for the *Bp-ΔcydAB* strain and thus to enhance the potential effects of the ligands. Representative curves of three biological replicates are shown, with the means and SD calculated on three technical replicates. *E*, CrtA^{Bp} binding to NTA or NTA-Cu. Binding was measured through the relative change of fluorescence at 670 nm and 650 nm (spectral shift), with the amplitude of the signal between the apo and liganded proteins indicating the magnitude of the conformational change induced by ligand binding. The means and SD were calculated on three biological replicates. *F*, import of Cu after 5 min incubation of BPSM or *Bp-ΔcrtA* with 2 μM CuSO₄ or 2 μM CuSO₄ + 500 μM NTA. The *Bp-cydAB* mutants could not be used here, because the bacteria were precultured with BCS to maximize *crtA* expression. In BPSM, copper levels increased significantly after Cu addition ($p = 0.0047$) and even more with Cu+NTA ($p = 0.0003$), with a modest but significant difference also observed between T₅+Cu and T₅+Cu-NTA ($p = 0.0212$), suggesting facilitated uptake in the presence of NTA. No significant differences were observed between the three conditions in *Bp-ΔcrtA*. Four biological replicates were used in this experiment, and statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Conover's *post hoc* test for multiple comparisons of mean rank sums. Significant differences are shown: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

New TonB-dependent copper transporter

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) confirmed that NTA increased the uptake of Cu(II) by the parent strain BPSM but not by *Bp-ΔcrtA* (Fig. 7F). The reason for the modest but reproducible increase of the intracellular concentration of copper over 5 min might be the low affinity of CrtA^{Bp} for the Cu-NTA complex. In the absence of NTA, ICP-MS indicated that Cu(II) was likely imported by a nonspecific pathway in the two strains. Thus, the growth phenotypes, the fluorescence assay and the ICP-MS results indicated that NTA could be considered a pseudoligand of CrtA^{Bp}. The affinity of CrtA^{Bp} for NTA-Cu(II), although lower than those of TBDT-ferrisiderophore complexes (32), appears to suffice to scavenge Cu(II) in the NTA-supplemented medium in laboratory conditions.

Use of AlphaFold3 to identify ligand features

To sketch out the profile of *bona fide* CrtA^{Bp} ligands, AlphaFold (AF3) docking simulations (39) were carried out using structurally diverse compounds, including small carboxylic acids, polycarboxylic acid-type metallophores, other metallophores possibly present in *B. pertussis* niches, and hydroxamate- or catecholate-type siderophores as controls. We also included copper-chelating natural products (40), and Trojan-horse antibiotics to which *P. aeruginosa* was

moderately sensitized by CrtA^{Pa} overexpression (25) (Table S7). We generated 25 models of CrtA^{Bp} in the presence of one Cu ion and one or two molecules of each compound (*i.e.*, Cu:ligand ratios of 1:1 or 1:2). The simulation produced docking results with iPTM scores > 0.6. The analysis pipeline is presented in Fig. S10. Ligands found within 5 Å of the experimental citrate binding site can be sorted into those binding at a 1:1 ratio and those binding at a 1:2 ratio (23 and two compounds in the binding site in > 70% of the models, respectively). All other compounds were not consistently found in the binding site at either ratio. Citrate, NTA, and EDDS were in the binding site at both 1:1 (>70% of the models) and 1:2 ratios (40%, 60% and 64% of the models, respectively). CYS and d-penicillamine were found there at the 1:2 ratio only (>70% of the models).

To refine the selection, we filtered the results according to pose convergence *i.e.*, the consistency of ligand positioning across the 25 models, and to the distance between the ligand's center of mass and the copper ion. At the 1:1 ratio, pose convergence cut-offs of 5 and 2 Å selected 15 and five Cu complexes, respectively, notably those with NTA, citrate, EDDS, vibrioferrin (VIB) and pseudopalmin (PSE), all carboxylate-rich molecules (Fig. 8A). Nevertheless, not all carboxylate-containing compounds were stably positioned by

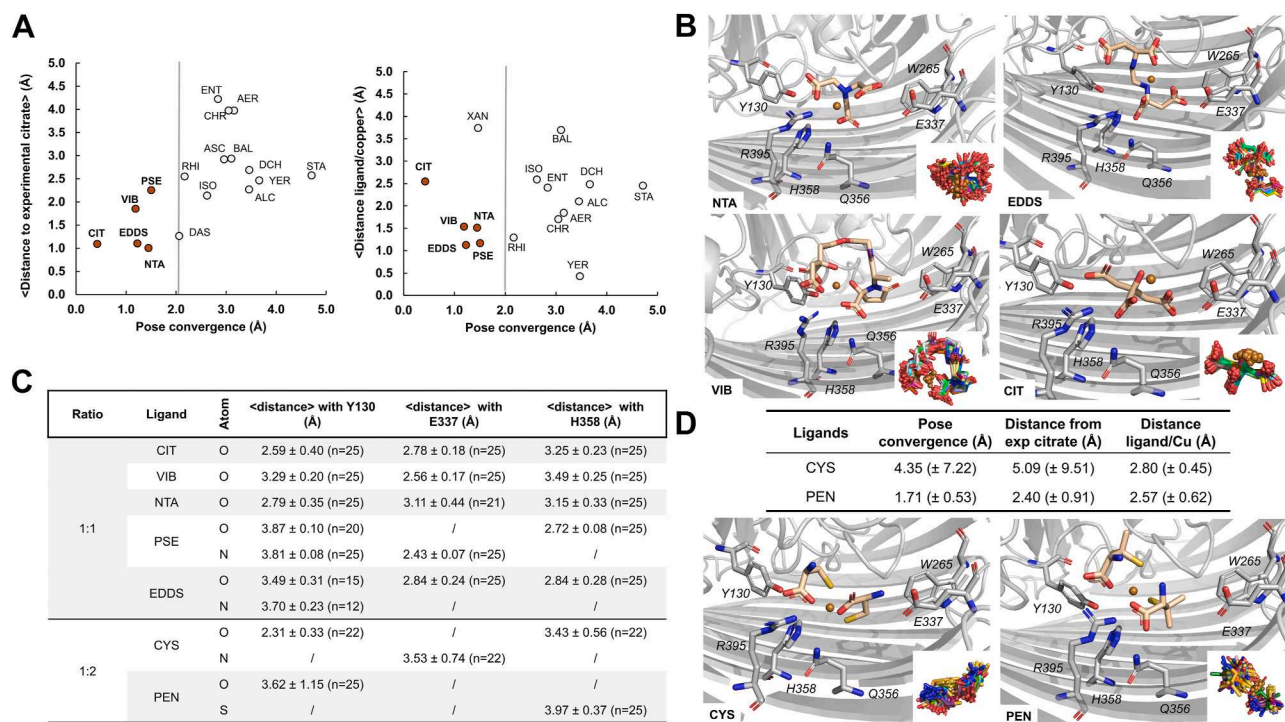


Figure 8. Ligand profiling using AF3. A, analysis of docking results on 25 models per ligand (1:1 ratio). Ligands were first filtered according to their proximity (<5 Å) to the crystallographic binding site (23 ligands). The addition of the pose convergence criterion - positional consistency across models - allows removing six ligands (ACO, CEF, CHA, DFE, SF2 and XAN). The remaining ligands were filtered according to the distance between their center of mass and the copper ion. 15 and five ligands met all criteria with pose convergence values < 5 Å and < 2 Å, respectively. B, predicted Cu-ligand binding poses for NTA, citrate, vibrioferrin (VIB) and ethylenediamine di-succinate. C, average distances (<4 Å) between ligand donor atoms (N, O or S) and three key residues: Y130 (OH atom), E337 (Oε1 atom) and H358 (Nε2 atom). 'n' values indicate the number of models in which the interaction occurred at a distance shorter than 4 Å. D, analyses of the docking results on the models for CYS and penicillamine (1:2 ratio). In panels (A and D), the pose convergence values and the copper-ligand distances were calculated only for the models in which the ligands were in the binding cavity at the given ratio, while the average values for the distances between experimental and ligand positions are based on all 25 models. Panels (B and D) show a representative ligand positioning among the 25 models, with the insets displaying ligand positioning across the 25 models after protein superimposition.

AF3 in the ligand-binding cavity (e.g., isocitrate or staphyloferrin), indicating some degree of specificity.

To pinpoint specific features of the productive CrtA^{Bp}-NTA-Cu complex, we compared it with those formed with EDDS, VIB, PSE or citrate (Fig. 8, B and C). In all five cases, these ligands were at H-bonding distance from several conserved binding-site residues. The copper ion was coordinated by O atoms of the small molecule (VIB and CIT) or both O and N atoms (NTA and EDDS), but with unoccupied coordination site(s), notably oriented towards H358 in the NTA and VIB complexes (Fig. 8C). We probed the CrtA-NTA-Cu complex by building additional models after replacing the carboxylate groups or the N atom of NTA with -NH₂ or -CH groups, respectively. These modifications decreased the convergence in the binding pocket and increased the distances with both Cu and the experimental position of citrate (Fig. S10). Finally, AF3 models of the ternary CrtA_{MMT}-NTA-Cu(II) complex showed a complete loss of ligand stabilization (Fig. S10).

At the 1:2 ratio, only CYS and penicillamine passed the 5-Å pose convergence cut-off. These small thiol-containing compounds provided four coordinating atoms, 2 S and 2 O, for the copper ion and were both positioned at H-bonding distance from several conserved binding-site residues (Fig. 8, C and D).

Discussion

We showed here that CrtA^{Bp} is the prototype of a new TBDDT subfamily involved in copper uptake and appears to be dedicated to providing copper for HCO-mediated respiration. CrtA contributes to bacterial fitness *in vivo*. We solved the structure of CrtA^{Bp} and identified a conserved ligand binding site, with in particular a His residue essential for function. Although ligand identification remains challenging for many TBDDTs, we tried to define the profile of CrtA^{Bp} ligands. In laboratory conditions, the transporter seems to be selective for small Cu-binding organic molecules that notably harbor carboxylate groups. However, the *in vivo* ligand(s) of CrtA remain to be identified.

The strong conservation of CrtA among *B. pertussis* isolates supports its role in *Bordetella* biology. A growth phenotype of the deletion mutant was observed after inactivating the copper-independent oxidoreductase that sustains *B. pertussis* growth under copper restriction conditions. Loss of CydAB makes copper essential for aerobic respiration, and in these conditions the importance of CrtA^{Bp} indicated its role for HCO function. Of note, the HCO complexes were reported to be conditionally essential for *B. pertussis* in an animal model of infection (41). In *P. aeruginosa* crtA^{Pa} was strongly repressed in response to HCN, an endogenously produced poison of the HCOs (42). In contrast, HCN did not affect the expression of OprC, another Cu-importing TBDDT in *P. aeruginosa*. This is consistent with CrtA^{Pa} having specialized in copper provision for HCOs also in that species. The presence of ScoI and PCuAC genes in other crtA-containing operons further suggests that this role might be shared by CrtA orthologs.

Contrary to OprC, reported to transport nonchelated Cu(I) (15), CrtA^{Bp} imports chelated Cu(II). The only two metallophores produced by *B. pertussis* were discarded as possible CrtA ligands. Nevertheless, CrtA^{Bp} allowed growth of *cydAB*-deficient bacteria under copper limitation in laboratory conditions, in the absence of any xenometallophore. This indicated that Cu(II) might be taken up in complex with carboxylate-harboring metabolite(s) present in the milieu. The *B. pertussis* culture medium contains millimolar concentrations of moderately affine copper binders, including CYS, glutathione, glutamate and other amino acids, which might be used by CrtA^{Bp} in the absence of alternatives. In the human airways the concentration of such metabolites increases upon *B. pertussis* infection due to the lytic activity of its toxins (19, 43).

In laboratory conditions, we identified NTA as a pseudo-ligand of CrtA^{Bp}. NTA has a good affinity for Cu(II) thanks to its carboxylate groups and central N atom (44), and AF3 modeling suggested that it was among the best ligands among the compounds tested. The position of the His358 residue in the ligand-binding site could conceivably enable it to contribute to Cu chelation. Nevertheless, the affinity of CrtA for NTA-Cu is much lower than those between TBDDTs and their *bona fide* ligands (45, 46), which most likely explains the need for high concentrations of NTA to enhance bacterial growth in copper-limiting conditions.

Given the apparent absence of specific endogenous metallophores for CrtA-type TBDDTs, two nonmutually exclusive models may be proposed. It is possible that these transporters use xenometallophores present in the natural environments of the CrtA-producing bacteria. In the host, nutritional immunity might restrict the availability of copper, as recently described for *Mycobacterium tuberculosis* (7). To counter copper starvation, CrtA^{Bp} might import copper in complex with a xenometallophore produced by a species of the human respiratory tract microbiota. The use of a siderophore for copper uptake implies that Cu(II) outcompetes Fe(III) for chelation, which is conceivable given the top position of Cu(II) in the Irving-Williams series (47). Metallophores such as yersiniabactin have a broad metal selectivity (17). However, a mixture of siderophores including yersiniabactin induced crtA expression in *P. aeruginosa*, which rather indicates Cu starvation (48) and makes this metallophore an unlikely CrtA^{Pa} ligand candidate. Some other siderophores such as pyochelin can bind a variety of metals in addition to Fe(III), but nonferric complexes are taken up at low rates, implying that selectivity is mostly exerted at the transport step (45). Thus, Cu could be imported by CrtA-type TBDDTs in complex with a xenometallophore only if productive interactions occur between the three partners.

An alternative model posits that ligand recruitment by CrtA^{Bp} might differ from the paradigm of TBDDTs as highly selective transporters, CrtA being instead a 'scavenger' TBDDT. Note that the high-selectivity concept no longer appears to hold true for all TBDDTs anyway (31). Copper is required in much smaller amounts than iron by bacteria (49), except for specific, abundant cuproproteins (16). Consistently, few

New TonB-dependent copper transporter

copper-importing TBDTs have been identified and in fewer species than iron-specific TBDTs. Another major difference is that Cu(II), the form available in oxygenated environments is soluble and therefore might not require high-affinity chelators, unlike insoluble Fe(III). Furthermore, given its strong affinity for organic molecules Cu(II) is necessarily complexed with 'proximity ligands' (47, 49). Together, these elements account for the possibility that CrtA^{Bp} has no high-affinity ligand but scavenges Cu chelated by small molecules with specific features, notably carboxylate groups, though not necessarily in a 1:1 Cu:ligand stoichiometry. By providing a coordination of the metal in the ternary complex, the essential His residue of CrtA might serve as a selectivity filter ensuring that only Cu(II) complexes are imported. An additional filter might be the interactions with plug residues necessary to activate TonB-dependent transport.

Studies on Trojan-horse metallophore-antibiotic complexes have suggested that CrtA^{Pa} might transport several of those, albeit inefficiently (25), although it remains to be seen if these molecules form complexes with copper. Other TBDTs of *P. aeruginosa* also appear to take up these Trojan-Horse compounds (25, 50), suggesting that they too might be more promiscuous than usually considered.

Experimental procedures

In silico analyses

We collected TBDTs from the nonredundant NCBI database (1/1/2025) using the TonB_dep_Rec_b-barrel.hmm profile (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF00593/>), reduced sequence redundancy to 70% using CD-HIT (<http://bioinformatics.org/cd-hit/>), selected a 500 to 1200 residues size range and subjected the remaining 297,770 proteins to sequence similarity network analyses using the Enzyme Function Initiative Enzyme Similarity Tool (EFI-EST) (<https://efi.igb.illinois.edu/efi-est/>). Networks were visualized by Cytoscape using the yFiles Organic Layout (51). To further analyze the CrtA subfamily, all orthologs of CrtA^{Bp} were collected, and the corresponding bacterial genomes were downloaded on a local server. Rodeo-type analyses were performed to extract the genetic environment of *crtA* genes (21), and the genomes were searched for co-occurrence of other genes of interest. An antiSMASH analysis (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) was also performed to identify frequent secondary metabolite gene clusters in these genomes.

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

B. pertussis strains were grown on Bordet-Gengou (BG) blood-agar (48 h, 37 °C), then precultured for 24 h in Stainer-Scholte (SS) medium (initial OD₆₀₀ = 0.25) at 37 °C. For growth assays, SS medium was supplemented with 20 mM MgSO₄ unless otherwise indicated, as we found out that this condition maximizes expression of the operon. BCS was added to 50 μM for BPSM and *Bp-ΔcrtA*, 15 μM for *Bp-ΔcydAB* strains or 20 μM to prolong the lag phase. Cultures were inoculated into 96-well plates (initial OD₆₀₀ = 0.15) and grown at 37 °C under agitation for 60 h using an EnSight

Multimode plate reader (PerkinElmer). CuSO₄ was added at 2 μM where indicated. Streptomycin and gentamicin were added at 100 and 10 μg/ml, respectively. In-frame deletions of *crtA*, *cydAB*, *bp2930-bp2933* (*cyoABCD*), *bp3740-bp3744* (*ctaCDFEG*), *bp2921* and *bp2924* (*bufA1*) were generated by cloning their PCR-amplified flanking regions into pSS1129 (52). Recombinant pSS1129 plasmids were used to transform *Escherichia coli* SM10 to perform allelic exchange by conjugation with BPSM or its derivatives. Genome-wide sequencing of BPSM- Δ *crtA*, BPSM- Δ *cydAB* and BPSM- Δ *crtA* Δ *cydAB* was performed to rule out extraneous mutations. H358S was introduced by site-directed mutagenesis, and for *Bp-crtA*_{MM} synthetic fragments (GeneCust) were used. The *bufA1* mutant was generated by cloning a synthetic gene with a stop codon at Met8 into pSS1129. The *bp3224 to 3225* operon encoding a second cytochrome bd ubiquinol oxidase (not expressed in laboratory conditions) was also inactivated in all strains. Knockouts mutants of *alcA* and *bp3224-25* were constructed by interrupting the genes with a suicide plasmid. The expression plasmid of *crtA*^{Bp}, pT7K-BfrG-twstrep, was constructed by inserting the XbaI-HindIII fragment of pT7-prnCt-Stag (53) into pET24 d (Invitrogen), adding a twin-strep tag sequence in the BamHI site and cloning PCR-amplified *crtA*^{Bp} in BamHI-HindIII. The mutant version of *crtA*^{Bp} was similarly introduced in the expression plasmid. For complementation, the natural regulation system involves a CruR- and Rho-dependent post-transcriptional regulation that could not be reproduced on a plasmid, hence we used a Plac promoter in a low-copy plasmid. The 5' moiety of *crtA*^{Bp} was PCR-amplified, restricted with KpnI and XhoI and used in a three-way ligation with the XhoI-HindIII fragment of pT7K-BfrG-twstrep and KpnI-HindIII restricted pBBR1-MCS5 (54).

Protein expression and purification

E. coli BL21(DE3)-omp5 (55) carrying pT7K-BfrG-twstrep (wt or MM version) was grown in LB at 37 °C until OD₆₀₀ = 0.75 and treated with 1 mM IPTG for 3 h. Cells were harvested, resuspended in lysis buffer (50 mM sodium phosphate pH 7, 300 mM sodium chloride, 0.01 mg/ml DNase, and protease inhibitors (Complete, Roche)) and lysed using a French press. The clarified lysate was ultracentrifuged (100,000g, 1 h, 10 °C). Membrane proteins were extracted sequentially with 0.8% and 1.5% β OG in 50 mM sodium phosphate pH 8, 150 mM NaCl, for 1 h at 30 °C. The second extract was loaded on a 1-ml StrepTrap HP column in this buffer with 1% β OG, and CrtA^{Bp} was eluted with 50 mM biotin in the buffer. CrtA^{Bp}-containing fractions were concentrated by ultrafiltration (50K, Amicon Ultra) and buffer-exchanged to 50 mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl, 1% β OG.

Crystallization and X-ray structure determination

CrtA^{Bp} (10 mg/ml) was subjected to crystallization screens (JCSG+, Stura FootPrint, MEMGold2 ECO) by mixing 0.7 μl protein + 0.7 μl reservoir solution in a sitting-drop setting,

using a TECAN FreedomEVO pipetting robot. Crystals appeared within days. Useful crystals were obtained in 20 mM NaCl, 50 mM MES (pH 5.5), 14% PEG350 MME (form 1) and in 0.1 M Na-Citrate (pH 5.5), 16% PEG4K, 10% isopropanol (form 2). Crystals were soaked in their respective mother liquor + 15% glycerol, mounted on litholoops and directly frozen in liquid nitrogen before evaluation of diffraction quality at the ESRF ID30 B beamline (ESRF, Grenoble). Structures were solved by molecular replacement (Molrep) (56) using an AF3 CrtA^{Bp} model (39) and refined with Buster, from Global Phasing Limited, with the TLS refinement option.

Ligand screening by thermal unfolding analysis of CrtA^{Bp}

The samples were prepared in a final volume of 10 μ l with purified CrtA^{Bp} (6 μ M) alone or with each of the metabolites (50 μ M) and CuSO₄ (50 μ M) in 50 mM Hepes (pH 8), 150 mM NaCl, 1% β OG. Mixtures were loaded into microcapillaries which were placed in Prometheus Panta instrument (NanoTemper Technologies). Thermal unfolding was recorded from 25 °C to 95 °C at a rate of 2 °C/min by measuring intrinsic tryptophan fluorescence (excitation 280 nm, emission 330 and 350 nm). The first derivative of the 350 nm/330 nm fluorescence ratio was plotted using GraphPad Prism v10.

Affinity measurements by ratiometric fluorescence assay

Purified CrtA^{Bp} (wt and MM) proteins were labeled with fluorescent dye RED-NHS (NanoTemper) and incubated in 50 mM Hepes (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% β OG for 30 min at room temperature in the dark. Initial binding between CrtA^{Bp} and each ligand was verified prior to affinity measurements *i.e.*, 40 nM of protein was mixed with an equal ligand concentration. For titration, labeled CrtA^{Bp} (20 nM) was mixed with serially diluted ligands. Binding was measured using the Monolith X instrument (NanoTemper), and the spectral shift between 670 nm and 650 nm was analyzed with MO.Control software v2.5.4 (NanoTemper). All experiments were performed in triplicates.

AF3 modeling

The smiles of the compounds in their predicted protonation state (pH 7) were generated by the Marvin-Sketch program. Residues 37 to 732 of CrtA^{Bp} were used to build the model. Surface His residues were modified to Gln to avoid nonrelevant copper binding. For each simulation, a Cu(II) atom was independently added to one or two copies of the ligand. At the 1:2 ratio model analyses focused on 16 small compounds unable to provide full coordination to the metal. Calculations were performed on the Hercules2 and the Lyra clusters (Consortium des Equipements en Calcul Intensif), for the GPU-based model inference using NVidiaA40 or NVidia A6000GPU. Five randomly selected seed numbers were used, generating at least 25 models per model inference. Docking results were filtered by two performance metrics: the pose convergence (\AA), which represents convergence of docking

results measured by mean pairwise root mean square deviation across generated models with the DockRMSD program (57); and the distances (\AA) measured between the ligand's center of mass and that of citrate in the reference structure, and between the ligand's center of mass and the position of the Cu ion.

Intracellular copper quantification

Four precultures of BPSM and Bp- Δ crtA were grown in SS medium with 50 μ M BCS until OD₆₀₀ \approx 2 and used to inoculate cultures at OD₆₀₀ = 0.1 in SS medium with 20 mM MgSO₄ and 20 μ M BCS. After 20 h, cells were harvested by centrifugation, washed in prewarmed SS medium and resuspended in Chelex-treated SS medium. For T₀, 8-ml suspensions were mixed with ice-cold stop solution (PBS, 5 mM BCS, 5 mM Trien, a Cu(II) chelator) and placed on ice. For T₅, 2 μ M CuSO₄ or 2 μ M CuSO₄ + 500 μ M NTA (preformed complex) were added to bacteria, and the stop solution was added after a 5-min incubation. Bacteria were centrifuged (10,000 \times g, 10 min, 4 °C), washed twice with ice-cold PBS + 5 mM Trien, dried (99 °C, 3 h), resuspended in 700 μ l 65% nitric acid and incubated at 80 °C overnight. After cooling, 6.3 ml of Chelex-treated water was added and samples were filtered (0.45 μ m). ⁶³Cu levels were measured using a single quadrupole mass ICP-MS 7850 spectrometer (Agilent) with He as collision gas and Kinetic Energy Discrimination to eliminate spectral interferences. An external calibration curve was performed using a 100 mg/L Cu standard solution in 5% HNO₃ (Analytichem) and ⁷⁴Ge as internal standard. All solutions were prepared in ultrapure Milli-Q water and acidified at 2% with nitric acid (67–69%, ultrapure trace metal grade). Statistical analyses were performed as described (58).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed where required. For the animal experiments, statistical significance was determined using a nonparametric permutation-based ANOVA (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). For the ICP-MS experiment, statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Conover's *post hoc* test for multiple comparisons of mean rank sums (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Other experiments

For immunoblot analyses, *B. pertussis* cultures (10 ml, OD₆₀₀ \approx 1.5) grown in SS medium + 50 μ M BCS were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8) using a Ribolyser (speed 6, 50 s, four cycles). The clarified lysates were ultracentrifuged (100,000g, 1 h, 4 °C) to isolate membranes. After SDS-PAGE to separate the proteins and transfer to nitrocellulose, CrtA^{Bp} was detected using a guinea pig polyclonal antibody raised against the recombinant protein (1:2500) and anti-guinea pig-HRP (1:5000). Detection was performed with the Amersham ECL Prime Western Blotting System using the Amersham Imager 600 (GE). For RT-qPCR, 8 ml of *B. pertussis* liquid cultures

New TonB-dependent copper transporter

with 50 μ M BCS were harvested at OD₆₀₀=1 by centrifugation at 4 °C after adding 2 ml of a phenol:ethanol solution (5:95, v/v). Total RNA was extracted using Tri-Reagent (Invitrogen), followed by a DNase I treatment (Sigma Aldrich). Reverse transcription was performed with the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). qPCR was carried out on a Roche LightCycler 480 Instrument II using the Takyon Low-ROX SYBR kit (Eurogentec). The experiments were conducted with biological replicates and three technical replicates, and *bp2921* expression levels were normalized to those of the housekeeping gene *bp3416*. Single-strain experimental infections of mice were performed as described (21). For the co-infection experiment BPSM and *Bp-DcrtA^{Bp}* were grown in liquid SS medium supplemented with BCS to prevent intracellular copper accumulation and mixed in equal numbers (5×10^4 of each strain in 20 ml) for nasal inoculation. The two strains were differentiated by their antibiotic resistance markers (59). The study protocol was approved by the Ethical Committees of the Region Nord-Pas-de-Calais and the Ministry of Research under the agreement number APAFIS #51236 to 2024041114331031 v7.

Data availability

This article contains [supporting information](#). All relevant data are within the article and its supporting information files. The raw data can be shared upon request to francoise.jacob@crns.fr. This article contains X-ray crystallographic data. The structures were deposited in the RCSB database (pdb 9RVQ and 9RVX).

Supporting information—This article contains supporting information (60–72).

Acknowledgments—We thank T. Brickman and S. Armstrong for the gift of alcaligin, J. Chatagnon, Z. Edo, L. Hofmann and S. Cauchi for help with animal experiments, handling the Ensign apparatus and statistical analyses, respectively, and R. Hartkoorn and J.-F. Collet for discussion. We thank the Proteintec platform at the BIAM and Marina Siponen for her help with spectral shift and nanoDSF experiments. We thank F. Wautelet for helping install AF3 on the Hercules2 cluster of the CÉCI high-performance computing infrastructure platform.

Author contributions—M. H. and J. D. writing—review & editing; M. H., M. M., R. W., P. A., G. B., L. C., R. A., and F. J. D. writing—original draft; M. H., M. M., P. A., A. R. M., and R. A. visualization; M. H., M. M., R. W., P. A., G. B., and F. J. D. validation; M. H., M. M., R. W., P. A., G. R., R. A., and F. J. D., methodology; M. H., M. M., C. C., P. A., G. R., A. R. M., S. S., A. S. D., V. A., G. B., L. C., R. A., and F. J. D. investigation; M. H., M. M., P. A., R. A., and F. J. D., formal analysis; M. H., M. M., R. W., P. A., G. R., A. R. M., R. A. and F. J. D. conceptualization; R. W., P. A., G. R., G. B., and F. J. D. supervision; F. J. D. project administration.

Funding and additional information—M. H. was supported by a doctoral fellowship from Lille University. M. M. and R. W. are research Fellow and Research Associate of the Belgian Fund for

Scientific Research (FNRS), respectively. This work was funded by the Institut de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Lille University. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or in the decision to submit this work for publication.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article

Abbreviations—The abbreviations used are: β OG, β -octylglucoside; BCS, bathocuproine disulfonate; Cu, copper; EDDS, ethylenediamine di-succinate; CYS, cystine; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; NTA, nitrilotriacetic acid; OM, outer membrane; HCO, heme-copper oxidoreductase; PSE, pseudopalin; SD, standard deviation; SS, Stainer-Scholte; TBDT, TonB-dependent transporters; VIB, vibrioferrin.

References

1. Ridge, P. G., Zhang, Y., and Gladyshev, V. N. (2008) Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* **3**, e1378
2. Battistoni, A. (2003) Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1326–1329
3. Solioz, M. (2018) *Copper and Bacteria. Evolution, Homeostasis and Toxicity*, Springer Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland
4. Zuily, L., Lahrach, N., Fassler, R., Genest, O., Faller, P., Seneque, O., et al. (2022) Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones. *mBio* **13**, e0325121
5. Fu, Y., Chang, F. M., and Giedroc, D. P. (2014) Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3605–3613
6. Besold, A. N., Gilston, B. A., Radin, J. N., Ramsomair, C., Culbertson, E. M., Li, C. X., et al. (2018) Role of Calprotectin in withholding zinc and copper from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **86**, e00779-17
7. Buglino, J. A., Ozakman, Y., Hatch, C. E., Benjamin, A., Tan, D. S., and Glickman, M. S. (2025) Chalkophore-mediated respiratory oxidase flexibility controls *M. tuberculosis* virulence. *Elife* **14**, RP105794
8. Murdoch, C. C., and Skaar, E. P. (2022) Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 657–670
9. Ghnamah, Y., Palmer, C. D., Livnat-Levanon, N., Grupper, M., Rosenzweig, A. C., and Lewinson, O. (2025) Prokaryotic mechanosensitive channels mediate copper influx. *Protein Sci.* **34**, e70205
10. Ekici, S., Turkarslan, S., Pawlik, G., Dancis, A., Baliga, N. S., Koch, H. G., et al. (2014) Intracytoplasmic copper homeostasis controls cytochrome c oxidase production. *mBio* **5**, e01055-13
11. Palmer, C. D., Ghnamah, Y., Livnat-Levanon, N., Lewinson, O., and Rosenzweig, A. C. (2025) The *Escherichia coli* AZY operon links copper uptake to antibiotic resistance. *Commun. Biol.* **8**, 458
12. Gonzalez-Sanchez, A., Cubillas, C. A., Miranda, F., Davalos, A., and Garcia-de Los Santos, A. (2018) The *ropAe* gene encodes a porin-like protein involved in copper transit in *Rhizobium etli* CFN42. *Microbiologyopen* **7**, e00573
13. Speer, A., Rowland, J. L., Haeili, M., Niederweis, M., and Wolschendorf, F. (2013) Porins increase copper susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **195**, 5133–5140
14. Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., and Buchanan, S. K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 43–60
15. Bhamidimarri, S. P., Young, T. R., Shanmugam, M., Soderholm, S., Basle, A., Bumann, D., et al. (2021) Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *Plos Biol.* **19**, e3001446

16. Dassama, L. M., Kenney, G. E., Ro, S. Y., Zielazinski, E. L., and Rosenzweig, A. C. (2016) Methanobactin transport machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 13027–13032
17. Koh, E. I., Hung, C. S., Parker, K. S., Crowley, J. R., Giblin, D. E., and Henderson, J. P. (2015) Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system. *Metallomics* **7**, 1011–1022
18. Coutte, L., Antoine, R., Slupek, S., Solans, L., Derop, J., Bonnefond, A., *et al.* (2020) Combined RNA-seq and ChIP-seq analyses of the BygA virulence regulator of *Bordetella pertussis*. *mSystems* **5**, e00208-20
19. Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F., and Cotter, P. A. (2014) *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 274–288
20. Antoine, R., Rivera-Millot, A., Roy, G., and Jacob-Dubuisson, F. (2019) Relationships between copper-related proteomes and lifestyles in beta Proteobacteria. *Front. Microbiol.* **10**, 2217
21. Rivera-Millot, A., Slupek, S., Chatagnon, J., Roy, G., Saliou, J.-M., Billon, G., *et al.* (2021) Streamlined copper defenses make *Bordetella pertussis* reliant on custom-made operon. *Commun. Biol.* **4**, 1–12
22. Roy, G., Antoine, R., Schwartz, A., Slupek, S., Rivera-Millot, A., Boudvillain, M., *et al.* (2022) Posttranscriptional regulation by copper with a new upstream open reading frame. *mBio* **13**, e0091222
23. Brickman, T. J., Anderson, M. T., and Armstrong, S. K. (2007) *Bordetella* iron transport and virulence. *Biomaterials* **20**, 303–322
24. Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I. J., and Tidow, H. (2021) Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2101952118
25. Luscher, A., Moynie, L., Auguste, P. S., Bumann, D., Mazza, L., Pletzer, D., *et al.* (2018) TonB-Dependent receptor repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for uptake of siderophore-drug conjugates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00097-18
26. Prem Suriya, J., Mosbahi, K., Atanaskovic, I., Kleanthous, C., and Walker, D. (2023) Outer membrane translocation of pyocins *via* the copper regulated TonB-dependent transporter CrtA. *Biochem. J.* **480**, 1035–1049
27. Canonica, F., Hennecke, H., and Glockshuber, R. (2019) Biochemical pathway for the biosynthesis of the Cu(A) center in bacterial cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **593**, 2977–2989
28. Trasnea, P. I., Utz, M., Khalfouli-Hassani, B., Lagies, S., Daldal, F., and Koch, H. G. (2016) Cooperation between two periplasmic copper chaperones is required for full activity of the cbb3 -type cytochrome c oxidase and copper homeostasis in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* **100**, 345–361
29. McKay, L. S., Spandrio, A. R., Johnson, R. M., Sobran, M. A., Marlatt, S. A., Mote, K. B., *et al.* (2024) Cytochrome oxidase requirements in *Bordetella* reveal insights into evolution towards life in the mammalian respiratory tract. *PLoS Pathog.* **20**, e1012084
30. Cobessi, D., Celia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2005) The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* **347**, 121–134
31. Will, V., Moynie, L., Si Ahmed Charrier, E., Le Bas, A., Kuhn, L., Volck, F., *et al.* (2025) Structure of the outer membrane transporter FemA and its role in the uptake of ferric dihydro-aeruginic acid and ferric aeruginic acid in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **20**, 690–706
32. Schalk, I. J. (2025) Bacterial siderophores: diversity, uptake pathways and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **23**, 24–40
33. Noinaj, N., Easley, N. C., Oke, M., Mizuno, N., Gumbart, J., Boura, E., *et al.* (2012) Structural basis for iron piracy by pathogenic *Neisseria*. *Nature* **483**, 53–58
34. Gorringer, A. R., Woods, G., and Robinson, A. (1990) Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 101–105
35. Leprevost, L., Junger, S., Lippens, G., Guillaume, C., Sicoli, G., Oliveira, L., *et al.* (2024) A widespread family of ribosomal peptide metallophores involved in bacterial adaptation to metal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121**, e2408304121
36. Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295**, 1715–1719
37. Meyer, J.-M., and Hohnadel, D. (1992) Use of nitriloacetic acid (NTA) by *Pseudomonas* species through iron metabolism. *Appl. Microb. Cell Physiol.* **37**, 114–118
38. Tandy, S., Bossart, K., Mueller, R., Ritschel, J., Hauser, L., Schulin, R., *et al.* (2004) Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 937–944
39. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., *et al.* (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**, 493–500
40. Manley, O. M., and Rosenzweig, A. C. (2025) Copper-chelating natural products. *J. Biol. Inorg. Chem.* **30**, 111–124
41. Gonyar, L. A., Gelbach, P. E., McDuffie, D. G., Koepfel, A. F., Chen, Q., Lee, G., *et al.* (2019) In vivo gene essentiality and metabolism in *Bordetella pertussis*. *mSphere* **4**, e00694-18
42. Frangipani, E., Perez-Martinez, I., Williams, H. D., Cherbuin, G., and Haas, D. (2014) A novel cyanide-inducible gene cluster helps protect *Pseudomonas aeruginosa* from cyanide. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**, 28–34
43. Armstrong, S. K. (2015) Bacterial metabolism in the host environment: pathogen growth and nutrient assimilation in the mammalian respiratory tract. *Microbiol. Spectr.* **3**, 231–245
44. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (1986) *Data for Biochemical Research, Third Edition Ed.*, Oxford Science Publications, Oxford
45. Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L., and Schalk, I. J. (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J. Bacteriol.* **191**, 3517–3525
46. Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J. M., *et al.* (2009) FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol. Microbiol.* **72**, 1246–1259
47. Irving, H., and Williams, R. J. P. (1953) The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.*, 3192–3210
48. Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V. P., Kuhn, L., *et al.* (2020) Phenotypic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Mol. Cell Proteomics* **19**, 589–607
49. Helmann, J. D. (2025) Metals in motion: understanding labile metal pools in bacteria. *Biochemistry* **64**, 329–345
50. Moynie, L., Hoegy, F., Milenkovic, S., Munier, M., Paulen, A., Gasser, V., *et al.* (2022) Hijacking of the enterobactin pathway by a synthetic catechol vector designed for oxazolidinone antibiotic delivery in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1894–1904
51. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., *et al.* (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504
52. Stibitz, S. (1994) Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol.* **235**, 458–465
53. De, E., Saint, N., Glinel, K., Meli, A. C., Levy, D., and Jacob-Dubuisson, F. (2008) Influence of the passenger domain of a model auto-transporter on the properties of its translocator domain. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 192–202
54. Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd, *et al.* (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176
55. Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P., and Koebnik, R. (1998) Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 65–72
56. Vagin, A. A., and Isupov, M. N. (2001) Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1451–1456

New TonB-dependent copper transporter

57. Bell, E. W., and Zhang, Y. (2019) DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J. Cheminform.* **11**, 40
58. Iman, R. L., and Conover, W. J. (1979) The use of the rank transform in regression. *Technometrics* **21**, 499–509
59. Solans, L., Debie, A. S., Borkner, L., Aguilo, N., Thiriard, A., Coutte, L., et al. (2018) IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal Immunol.* **11**, 1753–1762
60. Lee, H. S., Hancock, R. E., and Ingraham, J. L. (1989) Properties of a *Pseudomonas stutzeri* outer membrane channel-forming protein (NosA) required for production of copper-containing N₂O reductase. *J. Bacteriol.* **171**, 2096–2100
61. Serventi, F., Youard, Z. A., Maurset, V., Huwiler, S., Buhler, D., Richer, M., et al. (2012) Copper starvation-inducible protein for cytochrome oxidase biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **287**, 38812–38823
62. Hakemian, A. S., Tinberg, C. E., Kondapalli, K. C., Telser, J., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L., et al. (2005) The copper chelator methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b binds copper(I). *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17142–17143
63. Dingle, S., Shivoorkar, M., Parvin, M. N., and Durrani, A. N. (2020) Stability constants of nicotinic acid (vitamin B3) complexes with transition metal ions. *Int. Res. J. Adv. Sci. Hub* **2**, 136–138
64. Tyagi, S., Gencaslan, S., Sheldrick, W. S., and Singh, U. P. (2003) Solution and solid studies of some metal complexes with cytosine and its derivatives. *J. Coord. Chem.* **56**, 1455–1471
65. Yang, X., Bi, S., Wang, X., Liu, J., and Bai, Z. (2003) Multimethod characterization of the interaction of aluminum ion with α -Ketoglutaric acid in acidic aqueous solutions. *Analyt. Sci.* **19**, 273–279
66. Zaid, A. A., Farooqui, M., and Janrao, D. M. (2011) The determination of the stability constants of mixed ligand complexes of ascorbic acid, pyridoxine HCl and some amino acids with some metal ions by potentiometric titration method. *Asian J. Res. Chem.* **4**, 1630–1631
67. Knobloch, B., Linert, W., and Sigel, H. (2005) Metal ion-binding properties of (N3)-deprotonated uridine, thymidine, and related pyrimidine nucleosides in aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7459–7464
68. Clarke, E. R., and Martell, A. E. (1970) Metal chelates of arginine and related ligands. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **32**, 911–926
69. Mahata, S., Mitra, I., Mukherjee, S., Reddy, V. P. B., Ghosh, G. K., Wolfgang, W., et al. (2019) Speciation study of L-ascorbic acid and its chelated Cu(II) & Ni(II) complexes : an experimental and theoretical model of complex formation. *S. Afr. J. Chem.* **72**, 229–236
70. Dean, J. A., and Lange, N. A. (1992) *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Ed, New York, NY
71. Petrova, Y. S., and Neudachina, L. K. (2013) Potentiometric study of complexation between taurine and metal ions. *Russ. J. Inorg. Chem.* **58**, 617–620
72. Singh, P., Garg, B. S., Kumar, D., and Singh, B. K. (2001) Complexation equilibria and evaluation of thermodynamic parameters of bivalent metal complexes of glutathione. *Indian J. Chem.* **40A**, 1339–1343

II. Rôle de CrpH dans l'assemblage des oxydases à hème-cuivre chez *B. pertussis*

1. Etude du mutant de CrpH (Bp2921) chez *B. pertussis*

Bp2921 est la protéine codée par le dernier gène de l'opéron *cruR-crtA-bp2921*. Son expression est donc également régulée négativement par le cuivre. Bp2921 est une protéine de la membrane interne appartenant à la famille PepSY-TM, comportant quatre segments transmembranaires et deux larges boucles périplasmiques délimitant une grande cavité (Fig. 53). Des homologues de Bp2921 ont été décrits chez d'autres bactéries. Ils sont régulés par le fer et fonctionnent comme des réductases du Fe(III) complexé à un sidérophore (Ganne et al., 2017; Josts et al., 2021; Ong & O'Brian, 2023; Peng & Payne, 2017). Notre hypothèse est que Bp2921 serait une réductase de Cu(II) en Cu(I) chez *B. pertussis*. Selon les résultats obtenus dans ce travail, Bp2921 a été renommée CrpH (Copper reduction in the periplasm for HCO).

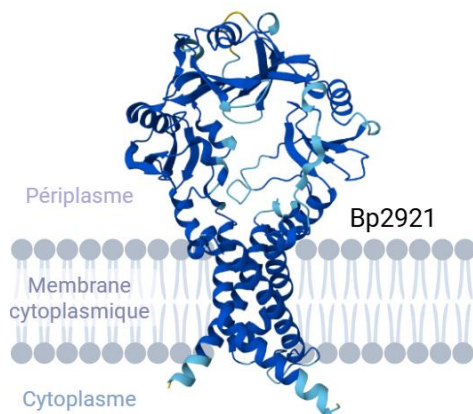


Figure 53. Modèle tridimensionnel de la protéine Bp2921 (CrpH) généré à l'aide d'AlphaFold3. Les couleurs indiquent le niveau de confiance reflétant la fiabilité de la prédiction. Le bleu foncé est le niveau de confiance le plus élevé (Figure créée avec BioRender).

1.1. Phénotype de croissance du mutant Bp- Δ crpH

Pour étudier le rôle de CrpH chez *B. pertussis*, un mutant de délétion a été construit (Bp- Δ crpH). La croissance de Bp- Δ crpH a été comparée à celle de la souche sauvage en condition de culture agitée (forte aération) en milieu SS dépourvu d'ascorbate ou en limitation en cuivre par l'ajout de 500 μ M de Trien. L'ascorbate a été retiré du milieu afin d'éviter la réduction extracellulaire du cuivre qui pourrait suppléer la perte de CrpH. Aucun défaut de croissance du mutant n'a été observé par rapport à la souche sauvage, suggérant que la protéine CrpH n'est pas importante pour la croissance de *B. pertussis* dans ces conditions (Fig. 54A). Cependant, dans les mêmes conditions mais en culture statique (faible aération), Bp- Δ crpH a

montré un fort défaut de croissance (Fig. 54B). Comparé à la culture agitée, la croissance de *B. pertussis* est ralentie en culture statique, mais le mutant Bp- Δ crpH pousse plus lentement et arrive à la phase stationnaire plus vite. Ce résultat suggère que la croissance du mutant est limitée suite à l'inactivation de CrpH. Cette limitation se produit uniquement en condition de culture statique et n'est pas liée à la quantité du cuivre dans le milieu de culture. En effet, l'addition de 2 μ M ou de 100 μ M de CuSO₄ améliore légèrement mais ne permet pas de restaurer la croissance de Bp- Δ crpH (Fig. 54C et D). L'observation de ce défaut de croissance uniquement en absence d'agitation suggère que la fonction de CrpH est liée à l'aération du milieu. Nous avons montré dans la première partie de la thèse que le cuivre importé par CrtA^{Bp} est dédié aux HCOs. Il est donc possible que CrpH soit importante pour la fonction d'une ou plusieurs cytochromes oxydases à cuivre utilisées principalement en faible aération.

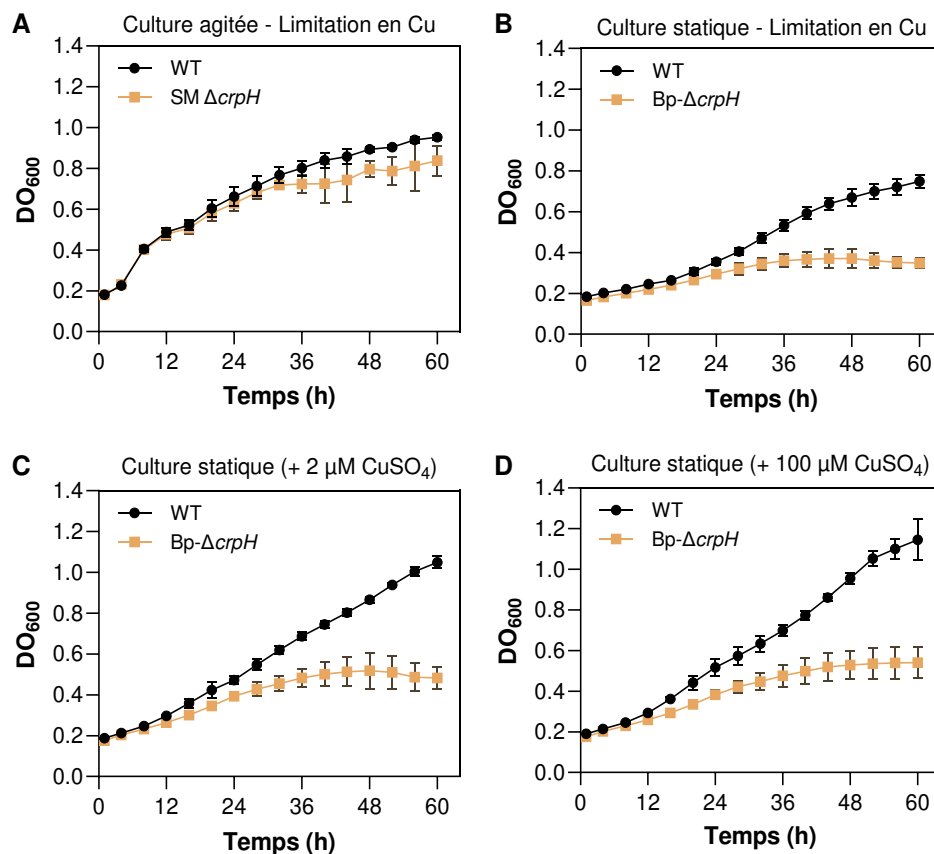


Figure 54. Phénotype de croissance du mutant Bp- Δ crpH. La croissance du mutant a été comparée à celle de la souche sauvage en conditions de culture agitée (A) ou statique (B, C et D). Les deux souches ont été cultivées en plaques 96 puits soit en condition de limitation en cuivre (500 μ M de Trien ; A et B), soit dans un milieu SS supplémenté en CuSO₄ à 2 μ M ou 100 μ M (C et D). Les données présentées correspondent à un résultat représentatif d'au moins trois réplicats biologiques. Les courbes montrent la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

Le fort défaut de croissance du mutant de délétion de *crpH* en culture statique ne peut pas être lié à un effet polaire car *crpH* est le dernier gène de l'opéron, et il a été également observé dans une souche portant un plasmide suicide dans *crpH*. De plus, en forte aération, le mutant pousse quasi normalement, montrant qu'il s'agit d'un défaut conditionnel. Nous avons essayé de compléter le mutant en exprimant *crpH* sur plasmide sous le contrôle de Plac dans pBBR-MCS5 ou Ptac dans pBBi-tac, deux vecteurs à faible nombre de copies. Le plasmide pBBi-Tac permet une expression inducible à l'IPTG. La croissance des souches complémentées a été étudiée en culture statique en limitation en cuivre avec ou sans IPTG (Fig. 55A et B). Cependant aucun effet positif sur la croissance de Bp- Δ *crpH* n'a été observé, bien que la construction génétique dans les deux vecteurs ait été vérifiée par séquençage. Il est vraisemblable que le niveau d'expression et la régulation de *crpH* dans les souches complémentées soient inadaptés pour rétablir la croissance.

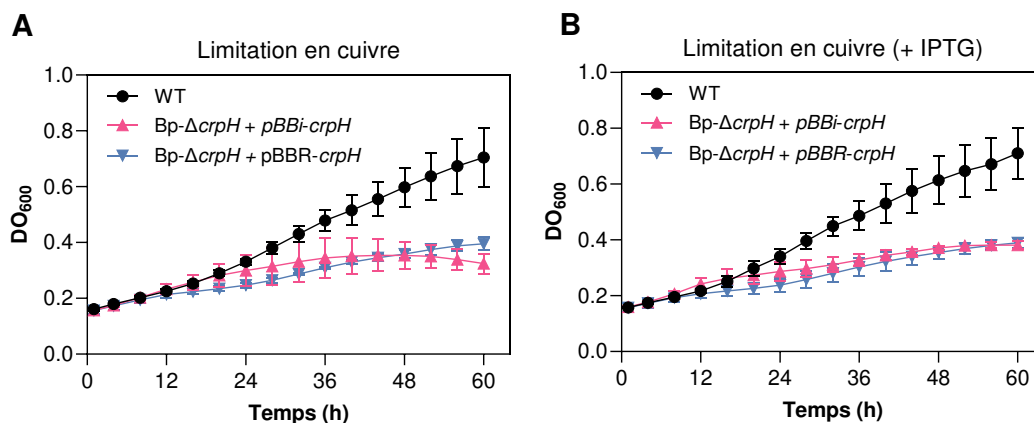


Figure 55. Essais de complémentation du phénotype de croissance de Bp- Δ *crpH*. Le gène *crpH* a été introduit dans la souche Bp- Δ *crpH* sous contrôle des promoteurs lac ou tac, sur deux plasmides différents. La croissance de la souche WT et des deux souches Bp- Δ *crpH* avec un ou l'autre plasmide a été déterminée en culture statique avec 500 μ M de Trien sans (A) ou avec 250 μ M d'IPTG (B). Les données présentées correspondent à la moyenne et l'écart-type de trois réplicats techniques, représentatifs de deux réplicats biologique.

Une autre approche pour compléter serait d'introduire tout l'opéron en un autre endroit du chromosome. Cependant la taille de l'opéron et surtout la forte teneur en G+C de certaines régions rendent cette approche très difficile.

1.2. Étude du transcriptome de *B. pertussis* en culture statique

Pour comprendre la différence de phénotype de croissance de Bp- Δ *crpH* en culture statique et en culture agitée, nous nous sommes intéressés à la variation du transcriptome entre ces deux conditions. La souche sauvage a été également étudiée comme référence. Une analyse transcriptomique par RNA-seq a été réalisée en triplicat sur des cultures agitées de 24 h et des cultures statiques de 48 h, en milieu SS supplémenté de 20 mM de MgSO₄.

L'expression de plusieurs gènes varie entre ces deux conditions de culture. Cependant, nous avons remarqué que davantage de gènes sont affectés chez le mutant Bp- Δ *crpH* que dans la souche sauvage. En culture statique, 210 gènes étaient significativement ($p \leq 0.01$) sous-exprimés chez Bp- Δ *crpH* contre 90 gènes chez WT, et 321 gènes étaient sur-exprimés chez Bp- Δ *crpH* contre 187 chez WT. Cela indique que l'inactivation de CrpH impacte davantage le transcriptome de *B. pertussis*.

Pour étudier les effets spécifiques de la délétion de *crpH*, seuls les gènes dont le statut de régulation est différent entre Bp- Δ *crpH* et WT ont été sélectionnés. Nous avons considéré que les gènes régulés de la même façon dans les deux souches sont indépendants de l'inactivation de CrpH. Cette analyse a permis d'isoler un groupe de 425 gènes, ces gènes ont été classés selon leur Log₂FC en fonction de la significativité (FDR) (Fig. 56).

164 gènes étaient sous-exprimés et 176 gènes étaient sur-exprimés, dont seulement 8 % et 9 % respectivement sont de fonction inconnue. Plusieurs catégories fonctionnelles sont particulièrement touchées. Beaucoup de gènes impliqués dans la structure du ribosome, la traduction (des gènes des sous-unités 30S et 50S, des facteurs d'initiation/élongation de la traduction...) et la transcription sont moins exprimés. De façon intéressante, une réduction d'expression de 13 gènes impliqués dans la respiration a été également observée (Tableau VIII et Fig. 56), dont notamment l'opéron codant pour *bo*-Qox (*cyoABCD*) dont l'opéron (*bp2930-33*) est proche de l'opéron *cruR-crtA-crpH* dans le génome de *B. pertussis*. Cette région semble représenter un 'locus cuivre' qui comprend aussi l'opéron de la bufferine. On observe aussi une baisse d'expression des gènes codant pour les sous-unités de l'ATP synthase (*atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpD* et *atpG*). En parallèle, nous avons remarqué une augmentation d'expression de gènes de chaperons de réponse au stress (*dnaJ*, *dnaK*, *htpG*, *grpE*, *mucD*) et de protéases (*lon*, *clpB*) (Fig.56).

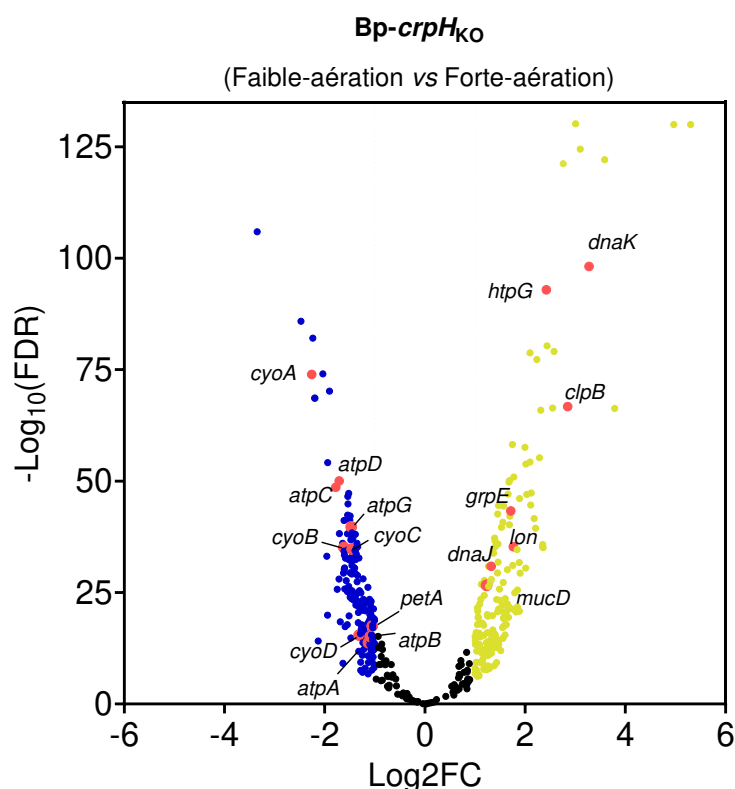


Figure 56. Volcano plot montrant les gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez Bp- Δ *crpH* en culture statique par rapport à la culture agitée. Chaque point correspond à un gène, le \log_2 (fold change) est représenté en abscisse et la significativité statistique ($-\log_{10}$ FDR) en ordonnée. Les gènes sur- et sous-exprimés sont colorés respectivement en jaune et bleu. Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques.

Tableau VIII. Gènes de la respiration sous-exprimés en condition statique chez Bp- Δ *crpH*.

ID Gène	Nom	Fonction	Catégorie	Log ₂ FC
<i>bp3282</i>	<i>atpB</i>	SU a de l'ATP synthase (pompe à protons)	ATP synthase	-1,08
<i>bp3286</i>	<i>atpA</i>	SU alpha de l'ATP synthase (catalytique)		-1,12
<i>bp3287</i>	<i>atpG</i>	SU gamma de l'ATP synthase (axe / tige centrale)		-1,47
<i>bp3288</i>	<i>atpD</i>	SU delta de l'ATP synthase		-1,70
<i>bp3289</i>	<i>atpC</i>	SU epsilon de l'ATP synthase		-1,78
<i>bp3281</i>	-	Facteur d'assemblage de l'ATP synthase		-1,58
<i>bp3812</i>	-	Protéine accessoire de l'ATP synthase		-1,12
<i>bp2930</i>	<i>cyoD</i>	SU-IV de la cytochrome o ubiquinol oxydase	Chaîne de transport d'électrons	-1,31
<i>bp2931</i>	<i>cyoC</i>	SU-III de la cytochrome o ubiquinol oxydase		-1,45
<i>bp2932</i>	<i>cyoB</i>	SU-I de la cytochrome o ubiquinol oxydase		-1,61
<i>bp2933</i>	<i>cyoA</i>	SU-II de la cytochrome o ubiquinol oxydase		-2,25
<i>bp0277</i>	<i>petA</i>	SU-fer-soufre de l'ubiquinol-cytochrome c réductase		-1,05
<i>bp2170</i>	-	SU-II de la cytochrome c oxydase <i>cbb3</i>		-1,40

Une analyse ORA (Over-Representation Analysis) a été réalisée afin d'identifier les catégories fonctionnelles (selon Gene Ontology, KEGG ou autres) enrichies parmi les gènes différentiellement exprimés. Parmi les autres gènes sous-exprimés figurent des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport de polysaccharides, et la biosynthèse d'acides aminés et nucléotides. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée, on trouve en plus des gènes de réponse au stress, des gènes codant pour le transport et le catabolisme d'acides aminés (source de carbone de *B. pertussis*) et des gènes de régulation (Fig. 57).

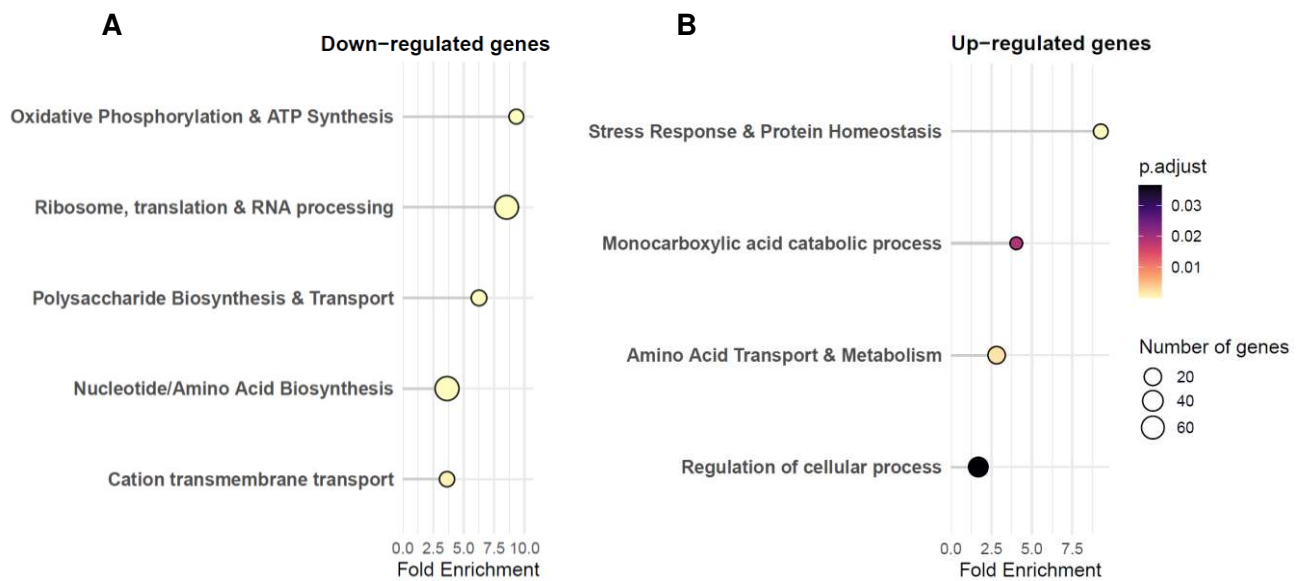


Figure 57. Analyse d'enrichissement fonctionnel (ORA) des gènes sous- ou sur-exprimés spécifiquement chez *Bp-ΔcrpH*. Les gènes enrichis ont été classés sous forme de catégories fonctionnelles. Les cercles aux extrémités représentent le nombre de gènes associés à chaque catégorie et le niveau d'enrichissement correspondant. La couleur des cercles correspond à un gradient du moins au plus significatif selon la p-value ajustée.

Ces résultats montrent qu'en culture statique, le ralentissement de croissance du mutant *Bp-ΔcrpH* est lié à la réduction de l'expression de gènes codant des voies majeures de biosynthèse (ADN, ARN, protéines, polysaccharides...), et de gènes liés au métabolisme respiratoire énergétique. Le ralentissement de biosynthèse pourrait être une réponse adaptative suite à la réduction de la production d'ATP via la respiration. En parallèle, *Bp-ΔcrpH* augmente l'expression d'ABC transporteurs dédiés à l'importation des acides aminés suggérant qu'il essaye de compenser le défaut énergétique en important plus de nutriments. De plus, l'augmentation des facteurs de réponse au stress suggère que *Bp-ΔcrpH* est confronté à une perturbation de l'équilibre entre les processus de synthèse et de dégradation de protéines.

L'effet de la délétion de *crpH* sur *cyoABCD* et *atpABCD* confirme le lien de CrpH avec la respiration chez *B. pertussis* et suggère que sa délétion peut affecter des voies de régulation liées au métabolisme respiratoire. L'ensemble de ces observations suggère que le phénotype de croissance de *Bp-ΔcrpH* en culture statique peut être lié à un déficit énergétique causé par un défaut de fonctionnement d'une ou plusieurs chaînes respiratoires spécifiques à la faible aération.

2. Impact de la délétion de *crpH* sur la respiration en culture statique

2.1. Évaluation du niveau d'ATP dans les souches WT et *Bp-ΔcrpH*

Dans le but d'évaluer l'effet de la sous-expression des gènes de l'ATP synthase chez *Bp-ΔcrpH* en culture statique, les niveaux d'ATP intracellulaire des souches WT et *Bp-ΔcrpH* ont été mesurés à l'aide du kit BacTiter-Glo. Ce test luminescent repose sur l'activité de la luciférase, qui après lyse des bactéries et en présence d'ATP catalyse l'oxydation de la luciférine générant un signal de luminescence proportionnel à la concentration d'ATP. Le test a été réalisé sur des cultures agitées ou statiques en présence de 2 μM de CuSO_4 et le niveau de luminescence a été normalisé à la DO_{600} (Fig. 58).

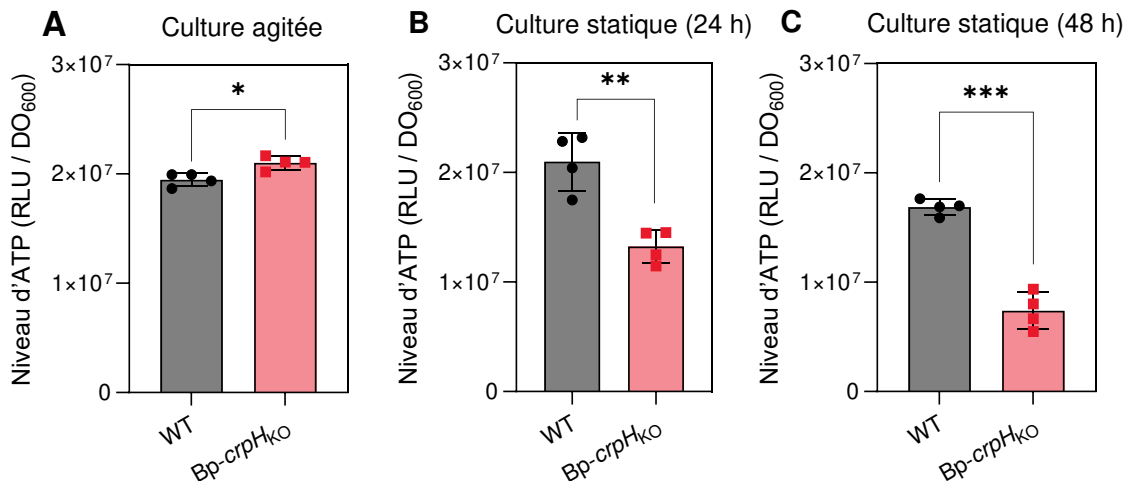


Figure 58. Niveaux d'ATP de *B. pertussis* WT et *Bp-ΔcrpH*. Les mesures sont faites par le test BacTiter-Glo en culture agitée (A) et en culture statique (B, C). La luminescence est exprimée en RLU (Relative light unit) et normalisée à la DO_{600} . *B. pertussis* WT et *Bp-ΔcrpH* ont été cultivées en milieu SS supplémenté de 2 μM de CuSO_4 . Les données représentent la moyenne \pm l'écart-type de quatre réplicats biologiques. La significativité statistique a été évaluée à l'aide du test ANOVA par permutation (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

En conditions de culture agitée, les deux souches présentent des niveaux d'ATP similaires avec une légère différence. En revanche, pour les bactéries issues de cultures statiques après 24 h ou 48 h, Bp- Δ *crpH* contient un niveau intracellulaire d'ATP inférieur à celui de la souche sauvage. Ces résultats confirment les données de l'analyse transcriptomique et sont également cohérents avec l'analyse du phénotype de croissance de Bp- Δ *crpH*, où un défaut de croissance est observé uniquement en culture statique. Ces observations suggèrent que le défaut de croissance est causé par un déficit énergétique, lié probablement à une respiration moins efficace suite à l'inactivation de CrpH.

2.2. Lien entre CrpH et la respiration via les oxydases à hème-cuivre

Afin d'étudier le rôle de CrpH dans la respiration par les HCOs, l'opéron *cydAB* codant pour *bd*-Qox qui est indépendante du cuivre a été inactivé chez la souche sauvage (Bp-KO*cydAB*) et chez le mutant de délétion de *crpH* (Bp- Δ *crpH*KO*cydAB*), et la croissance de ces souches a été étudié en culture statique. En condition de limitation en cuivre par le trien, la croissance des deux mutants était très fortement impactée (Fig. 59). Ce phénotype s'expliquerait par la dépendance de ces mutants au cuivre, car il est essentiel pour l'assemblage des deux HCOs restantes, aa3-Cox et bo-Qox. L'addition de 10 μ M de cuivre au milieu a amélioré la croissance des deux souches, suggérant que l'une ou les deux HCOs ont été assemblées au moins en partie. En revanche, l'effet positif du cuivre était moins important chez le mutant de CrpH. Ce résultat indique que CrpH interviendrait dans l'assemblage des HCOs, ce qui est en accord avec l'hypothèse de son implication dans la respiration de *B. pertussis* en culture statique. Toutefois, la croissance résiduelle observée de Bp- Δ *crpH*KO*cydAB* en présence de cuivre, indique une certaine activité respiratoire par une ou les deux HCOs. Deux hypothèses sont envisageables : Il y a une HCO qui ne dépend pas de CrpH ou bien il existe un autre système qui peut partiellement compenser son absence.

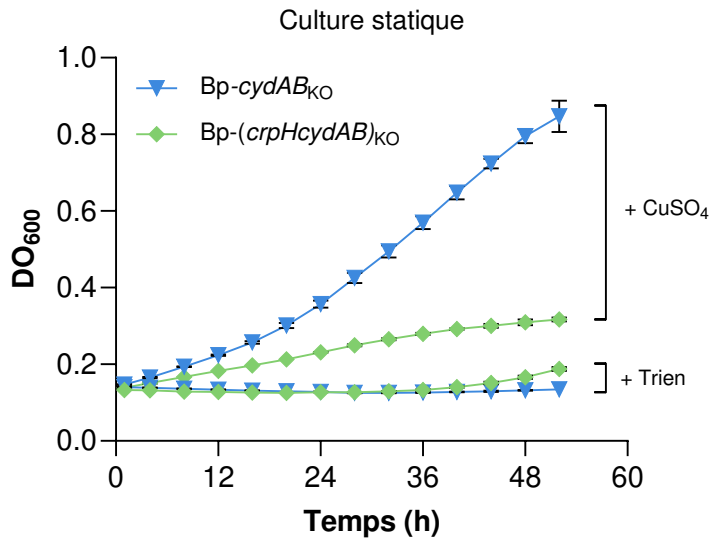


Figure 59. Croissance de Bp-KO*cydAB* et Bp- Δ *crpHKOcydAB* en culture statique. Les cultures ont été faites en milieu SS supplémenté de 500 μ M de Trien ou en présence de 10 μ M de CuSO₄. Les données sont représentatives d'au moins trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

Pour identifier quelle(s) HCO(s) est/sont dépendante(s) de CrpH nous avons inactivé *cyoABCD* (codant pour bo-Qox) ou *ctaCDFGE* (codant pour aa3-Cox) dans le mutant Bp- Δ *crpH*. L'objectif était de ne laisser qu'une seule HCO chez la bactérie et d'évaluer son activité en absence de CrpH. Il faut noter que ces doubles mutants (Bp- Δ *crpHKOcyoABCD* et Bp- Δ *crpHKOctaCDFGE*) contiennent toujours *CydAB* qui est indépendante du cuivre.

La croissance de Bp- Δ *crpHKOcyoABCD* et de Bp- Δ *crpHKOctaCDFGE* a été étudié en culture statique ou agitée en présence de 2 μ M de CuSO₄ et a été comparée à celles de la souche sauvage et des simples mutants : Bp- Δ *crpH*, Bp-KO*cyoABCD* et Bp-KO*ctaCDFGE* (Fig. 60A, B).

En culture statique, les mutants simples des HCOs, Bp-KO*cyoABCD* et Bp-KO*ctaCDFGE* poussent moins bien que la souche sauvage, avec un défaut de croissance comparable à celui de Bp- Δ *crpH*. Cela suggère qu'une croissance optimale en condition de culture statique requiert la présence des deux HCOs.

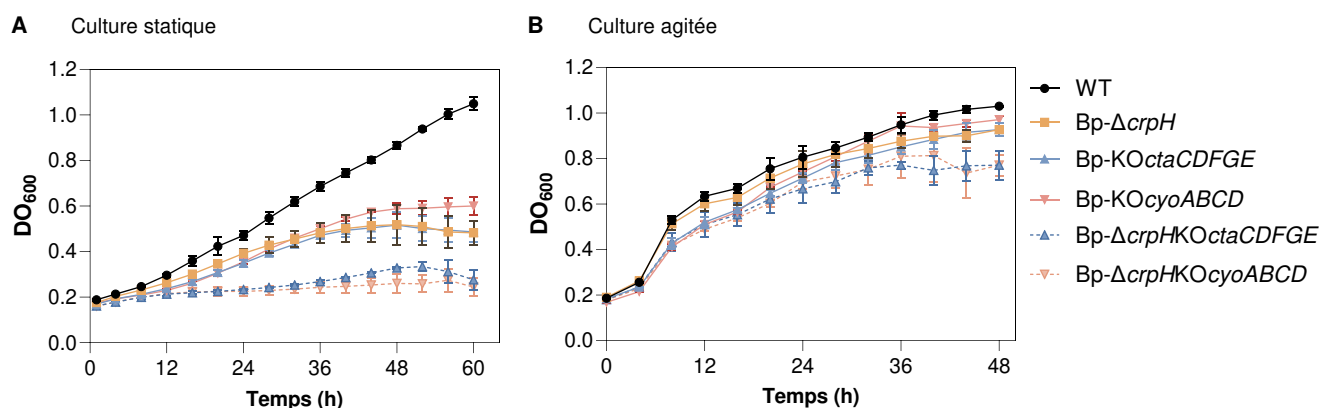


Figure 60. Croissance de BPSM (WT) et de souches mutantes dérivées de BPSM en culture statique et en culture agitée. Les souches mutantes sont Bp- $\Delta crpH$, Bp-KOOctaCDFGE, Bp-KOCyoABCD, Bp- $\Delta crpHKOCyoABCD$ et Bp- $\Delta crpHKOctaCDFGE$. Les six souches ont été cultivées en conditions statique (A) et agitée (B) en milieu SS supplémenté 2 μM de $CuSO_4$. Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

En absence de CrpH, la croissance de Bp- $\Delta crpHKOCyoABCD$ et Bp- $\Delta crpHKOctaCDFG$ s'est montrée nettement plus impactée en culture statique. Ce résultat suggère que dans les deux cas, l'absence de CrpH diminue l'activité de la HCO restante (bo-Qox ou aa3-Cox). Ces doubles mutants contiennent toujours CydAB, mais l'absence de croissance suggère que cette oxydase n'assure pas une respiration efficace en culture statique. Cependant, en condition de culture agitée, ces doubles mutants restaient capables de croître, ce qui confirme une meilleure efficacité de CydAB dans cette condition (Fig. 60B). La capacité de CydAB à assurer la respiration en condition de culture agitée expliquerait l'absence de phénotype de Bp- $\Delta crpH$ dans cette condition (Fig. 54A).

2.3. Analyse quantitative de l'activité aa3-Cox chez *B. pertussis* par le test TMPD

L'activité de la cytochrome c oxydase a été évaluée à l'aide du test N, N, N', N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine (TMPD), un substrat artificiel de cette famille d'oxydases. Une fois oxydé, le TMPD génère une coloration bleue dont l'intensité peut être quantifiée par mesure d'absorbance à 562 nm.

Nous avons appliqué ce test au mutant Bp- $\Delta crpH$, cultivé en milieu SS agité et supplémenté en cuivre (2 μM), puis récolté en milieu de phase exponentielle ($DO_{600} \approx 2$), en parallèle de la souche sauvage (Fig. 61A). Les résultats montrent que dans ces conditions de culture

l'oxydase aa3-Cox demeure fonctionnelle chez le mutant, à un niveau comparable à celui de la souche sauvage.

Afin de vérifier que le rôle de CrpH n'est pas compensé par le cuivre ajouté ou par une accumulation progressive de l'oxydase au cours de la croissance, nous avons répété l'analyse sur une culture non supplémentée en cuivre, arrêtée en début de phase exponentielle ($DO_{600} \approx 0,3$) (Fig. 61B). L'activité aa3-Cox mesurée était plus faible comme attendu dans ces conditions, mais restait similaire dans les deux souches. Un résultat similaire a été également observé dans des conditions de culture statique sans cuivre ajouté (Fig. 61C).

Ces observations indiquent que CrpH n'est pas essentielle à l'activité de l'oxydase aa3-Cox chez *B. pertussis*. Ce résultat est néanmoins surprenant au regard du fort défaut de croissance du double mutant *Bp-ΔcrpHKOcyoABCD* qui suggérait une altération de l'activité aa3-Cox en absence de CrpH. Il est possible que l'inactivation de cette protéine entraîne une diminution modérée de l'activité de l'oxydase aa3-Cox, non détectable lorsque cette HCO fonctionne seulement en supplément de bd-Qox en conditions agitées. En revanche, une diminution d'activité deviendrait fortement délétère en conditions de culture statique lorsque la croissance dépend beaucoup plus de cette HCO.

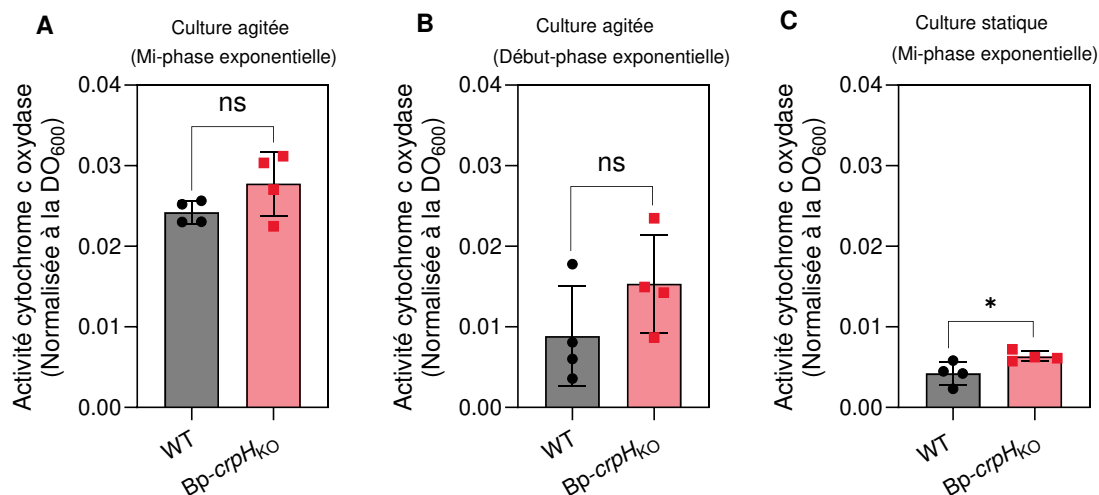


Figure 61. Activité aa3-Cox dans la souche sauvage et le mutant *Bp-ΔcrpH*. L'activité a été déterminée par spectrophotométrie mesurant l'oxydation du TMPD. (A) Cultures agitées en milieu SS supplémenté avec 2 μM de cuivre, récoltées en phase exponentielle. (B) Cultures agitées non supplémentées en cuivre, récoltées en début de phase exponentielle. (C) Cultures statiques non supplémentées en cuivre, récoltées en phase exponentielle. L'activité enzymatique, normalisée à la DO_{600} , est présentée comme la moyenne ± SD de quatre réplicats biologiques. La significativité statistique a été évaluée par ANOVA par permutation (ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$).

2.4. Effet de l'absence de CrpH sur la composition de la chaîne respiratoire

La composition en oxydases terminales de la chaîne respiratoire de la souche sauvage de *B. pertussis* et du mutant Bp- Δ crpH, cultivées en conditions agitées, a été déterminée à partir des spectres de différence des membranes réduites au dithionite et oxydées au peroxyde d'hydrogène (Fig. 62). Les pics correspondants aux hèmes de type b, o et a ainsi que les cytochromes c ont été identifiés sur la base d'une ancienne étude (Ezzell et al., 1981).

Chez la souche sauvage, des pics caractéristiques des cytochromes c (~522 et 550 nm), de l'hème b (~560 nm), de l'hème o (~527 nm) et de l'hème a (~603 nm) sont clairement visibles, indiquant la présence des deux HCOs dans les membranes (Fig. 62A). Comme contrôle, nous avons également analysé les mutants des HCOs. Comme attendu, le mutant Bp-KO α CDFGE, dépourvu de aa3-Cox, présente une forte atténuation des pics à 603 nm (hème a) et à 522/550 nm (cytochromes c), confirmant l'absence de cette oxydase. À l'inverse, chez le mutant Bp-KO γ ABCD, inactivé pour bo-Qox, les signaux à ~527 nm (hème o) et ~560 nm (hème b) sont modestement réduits, tandis qu'une augmentation notable du pic à 550 nm est observée, suggérant une possible compensation par aa3-Cox (Fig. 62A).

Pour le mutant Bp- Δ crpH (Fig. 62B), nous avons remarqué l'absence du pic à 603 nm avec la présence d'un nouveau pic autour de 617 nm, suggérant que l'assemblage de aa3-Cox est affecté par l'inactivation de CrpH. Ce profil est à la fois différent de ceux de la souche sauvage et du mutant de aa3-Cox (Bp-KO α CDFGE). Cette observation semble en contradiction avec le test TMPD, qui indiquait une activité aa3-Cox détectable dans ce mutant. Il est possible que l'inactivation de CrpH perturbe l'assemblage de aa3-Cox mais n'abolisse pas totalement son activité. L'effet de l'absence de CrpH sur les pics correspondant à bo-Qox est moins marqué, bien qu'une légère réduction du signal à 560 nm soit détectée (Fig. 62B).

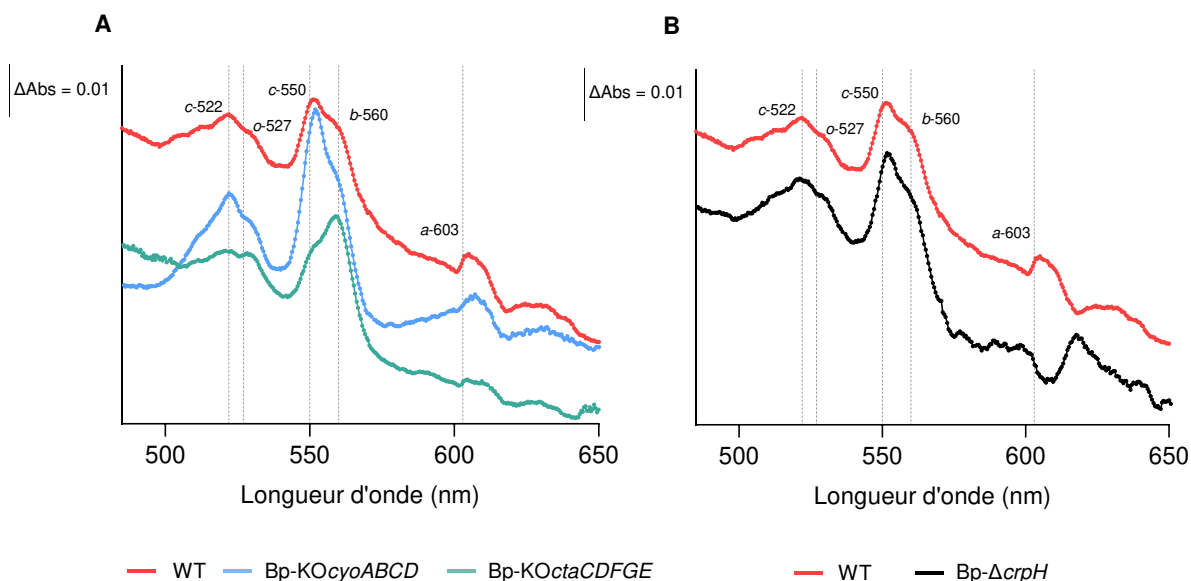


Figure 62. Identification des cytochromes oxydases terminales dans les membranes de *B. pertussis*. La souche sauvage et les mutants *Bp-ΔcrpH*, *Bp-KOcyoABCD* et *Bp-KOctaCDFGE*, ont été comparées par analyse spectroscopique des membranes. Les cultures ont été réalisées en conditions agitées, et les spectres de différence entre les états réduit et oxydé ont permis de déterminer la nature des cytochromes oxydases présentes. Les analyses des membranes de *B. pertussis* WT et *Bp-ΔcrpH* sont représentatives de deux répliquats biologiques.

Les différences spectrales observées entre la souche sauvage et *Bp-ΔcrpH* confirme que CrpH joue un rôle dans l'assemblage des HCOs. L'analyse spectrale des membranes n'a pas pu être réalisée de manière satisfaisante sur des cultures statiques, en raison de la biomasse insuffisante obtenue dans ces conditions, surtout pour le mutant *Bp-ΔcrpH* à cause de son défaut de croissance.

3. Contribution de CrpH à la colonisation du tractus respiratoire murin

Afin d'évaluer le rôle *in vivo* de CrpH, des souris C57BL ont été infectées par le mutant *Bp-ΔcrpH* seul ou par un mélange des souches sauvage et mutante. Les charges bactériennes dans chaque condition ont été déterminées dans les homogénats pulmonaires et nasaux à quatre temps post-infection : 3 heures, 4 jours, 7 jours et 14 jours (Fig. 63). Cette expérience a été réalisée avec l'aide d'Anne-Sophie Debrie au laboratoire.

Au premier point de mesure (3 h), nous avons vérifié que la charge bactérienne administrée était similaire entre les deux souches dans toutes les conditions testées. Dans le cas de mono-infection par *Bp-ΔcrpH*, aucune différence de colonisation par rapport à la souche sauvage n'a

été observée, que ce soit dans la cavité nasale ou dans les poumons. En revanche, lors de la co-infection, entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour, Bp- Δ crpH a montré une capacité réduite de persistance et de réplication par rapport à la souche sauvage. Dans la cavité nasale, bien qu'une tendance soit observée au jour 7, celle-ci n'a pas atteint le seuil de significativité statistique.

Dans l'ensemble, cette diminution du fitness relatif du mutant Bp- Δ crpH en cas de co-infection indique que l'expression du gène *crpH* confère un avantage compétitif *in vivo*.

Compte tenu de son rôle dans la respiration via les HCOs, CrpH pourrait contribuer à une meilleure efficacité respiratoire et à une meilleure production énergétique, favorisant ainsi la survie et la prolifération de *B. pertussis* dans le tractus respiratoire de l'hôte.

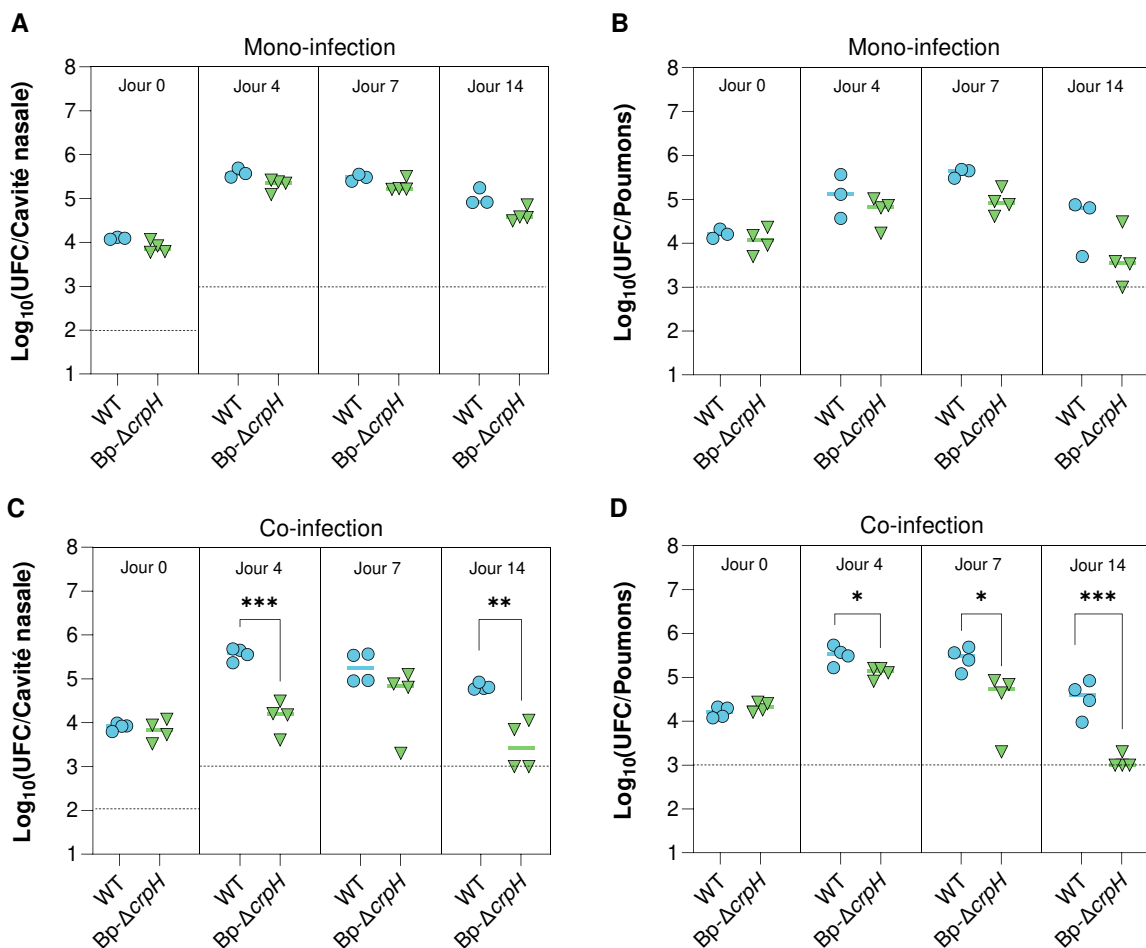


Figure 63. Rôle de CrpH dans un modèle d'infection murin. La charge bactérienne a été quantifiée au niveau de la cavité nasale (A) et des poumons (B) après une mono-infection par *B. pertussis* sauvage ou par le mutant Bp- Δ crpH. La charge bactérienne a également été mesurée dans la cavité nasale et les poumons (C et D) lors d'une co-infection par les deux souches. Chaque point représente une souris individuelle, et la ligne en pointillé indique la limite de détection. La significativité statistique a été évaluée par ANOVA par permutation (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

L'importance de CrpH *in vivo* dans le cadre d'une co-infection a été confirmée lors d'une deuxième expérience (Fig. 64). Les différences de colonisation et de persistance du mutant par rapport à la souche sauvage restent modérées mais elles sont reproductibles.

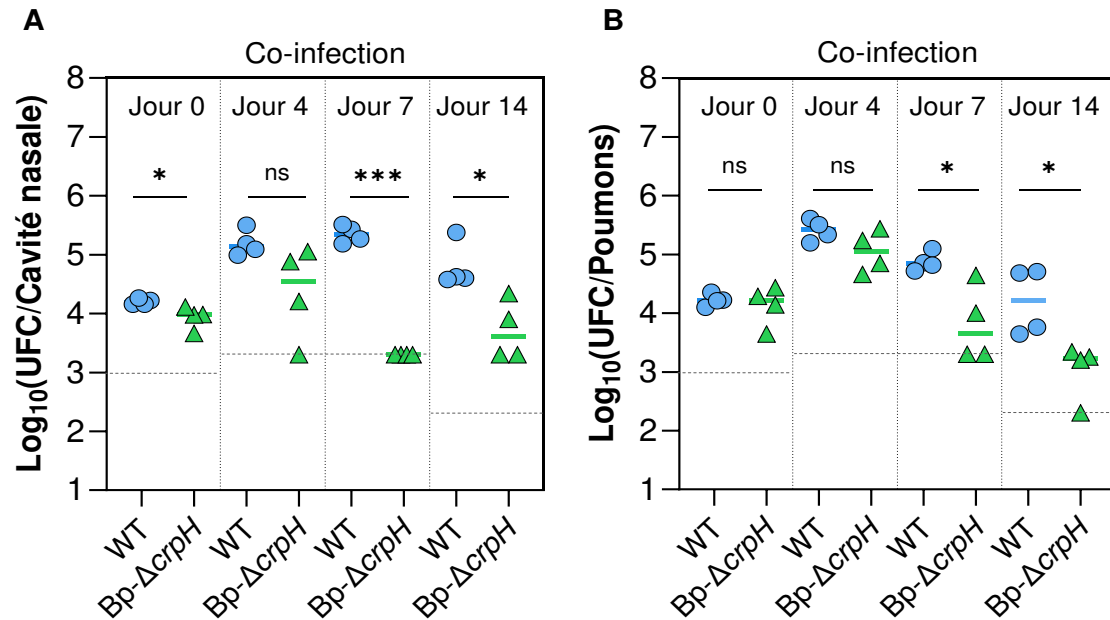


Figure 64. Confirmation de l'importance de CrpH *in vivo*. L'expérience de co-infection par la souche sauvage et le mutant Bp-ΔcrpH a été dupliquée en utilisant le même protocole et la même charge bactérienne. Le mutant Bp-ΔcrpH a montré une compétitivité réduite par rapport à la souche sauvage à la fois au niveau de la cavité nasale (A) et également au niveau des poumons (B). La significativité statistique a été évaluée par ANOVA par permutation (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

4. Fonction moléculaire de CrpH en lien avec le cuivre

4.1. Production de CrpH recombinante chez *E. coli*

Dans le but de caractériser la protéine CrpH, nous avons tenté sa production sous forme recombinante chez *E. coli*. Plusieurs stratégies de clonage ont été explorées en utilisant différents vecteurs d'expression et diverses souches d'*E. coli* dans plusieurs milieux de culture et sous différentes conditions d'induction. Malgré ces approches, aucune production satisfaisante de la protéine n'a pu être obtenue. Une bande correspondant approximativement à la taille attendue de CrpH (54 kDa) a été détectée pendant quelques essais (Fig. 65A), notamment chez *E. coli* UT5600 en milieu d'autoinduction (AIM) et également chez *E. coli* LMG194 sous contrôle du promoteur Para, avec une deuxième bande qui pourrait être une bande de dégradation.

Malheureusement aucun de ces résultats n'a pu être reproduit lors d'essais de production à plus grande échelle. Ces observations suggèrent que la protéine CrpH est instable et se fait dégrader rapidement chez *E. coli*, ou difficile à assembler, ou encore que sa surproduction serait toxique.

Nous avons également essayé de produire uniquement le domaine périplasmique soluble de CrpH, constitué de deux boucles, afin de générer des anticorps contre cette protéine. Cependant, cette tentative n'a pas été concluante et par conséquent des anticorps polyclonaux ont été produits à partir d'un peptide synthétique correspondant à une région spécifique de CrpH.

Face à l'impossibilité d'exprimer la protéine recombinante, nous avons essayé d'étudier CrpH directement chez *B. pertussis*. L'analyse par immunoblotting des extraits membranaires issus des cultures en conditions agitées des souches WT, Bp- Δ crpH et d'un mutant de deux histidines conservées Bp-CrpH_{H200A-H444A}, en utilisant les anticorps anti-peptide, a permis de détecter une bande correspondante à une protéine à une taille approximativement double du monomère de CrpH et absente chez Bp- Δ crpH, suggérant qu'il pourrait s'agir de CrpH (Fig. 65B). Cette bande a été observée plusieurs fois mais était faible, suggérant que CrpH serait présente en faible quantité chez *B. pertussis*, et/ou que les anticorps anti-peptide sont médiocres.

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette bande. La première est que CrpH forme un dimère stable, une propriété déjà décrite pour la protéine VciB de *Vibrio cholerae* de la famille PepSY_TM-like2 (Peng & Payne, 2017). Une autre possibilité est que la bande observée corresponde à un complexe de CrpH avec un autre partenaire protéique.

L'incapacité de produire et purifier CrpH, que ce soit sous forme recombinante ou native, représente une limite expérimentale majeure ayant restreint la possibilité de caractériser plus en détail sa fonction.

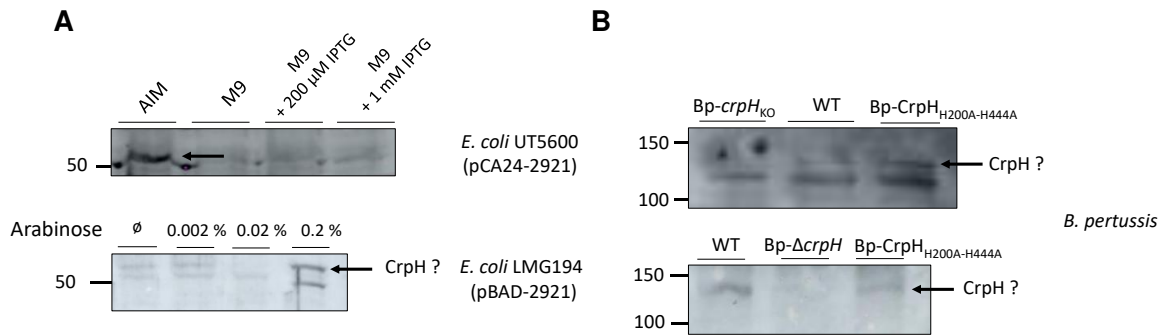


Figure 65. Analyse de l'expression recombinante et native de CrpH chez *E. coli* (A) et *B. pertussis* (B) par immunoblot. Chez *E. coli*, CrpH a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-His dans les extraits membranaires des souches d'*E. coli* UT5600 et LMG194, transformées respectivement avec les plasmides pCA24-2921 et pBad-2921. La production de la protéine a été induite naturellement dans le milieu AIM ou par addition de différentes concentrations d'IPTG ou d'arabinose. Dans les extraits membranaires de *B. pertussis*, une bande absente du mutant de délétion a été détectée entre 100 et 150 kDa à l'aide des anticorps anti-CrpH.

4.2. Relation entre CrpH et l'importation du cuivre chez *B. pertussis*

Des protéines de la famille PepSY_{TM} ou de familles apparentées ont été récemment décrites, notamment FoxB chez *P. aeruginosa* (Josts et al., 2021), VciB (PEPSY_{TM}-like2) chez *V. cholerae* (Peng & Payne, 2017) et FrsB (Cyt b561) chez *B. japonicum* (Ong & O'Brian, 2023). Ces protéines sont généralement en opéron avec un gène de TBDT et participent le plus souvent à la réduction du Fe(III), une étape nécessaire pour libérer le métal du sidérophore après importation du ferrisidérophore par le TBDT. L'activité métallo-réductase semble donc être conservée au sein des protéines de cette famille. En raison de la régulation par le cuivre de CrpH, notre hypothèse est qu'il s'agit d'une réductase de Cu(II) en Cu(I).

CrpH est situé dans le même opéron que le TBDT à cuivre CrtA^{Bp}. Afin de déterminer si l'activité de CrpH dépend du ligand importé par CrtA^{Bp}, la croissance du mutant de délétion de *crtA* a été analysée en condition de culture statique (Fig. 66). La souche Bp- Δ *crtA* a présenté un profil de croissance identique à celui de la souche sauvage, contrairement au mutant Bp- Δ *crpH*. Ce résultat indique que CrpH reste fonctionnelle en absence de CrtA et que son activité ne dépend pas nécessairement du ligand importé par ce transporteur.

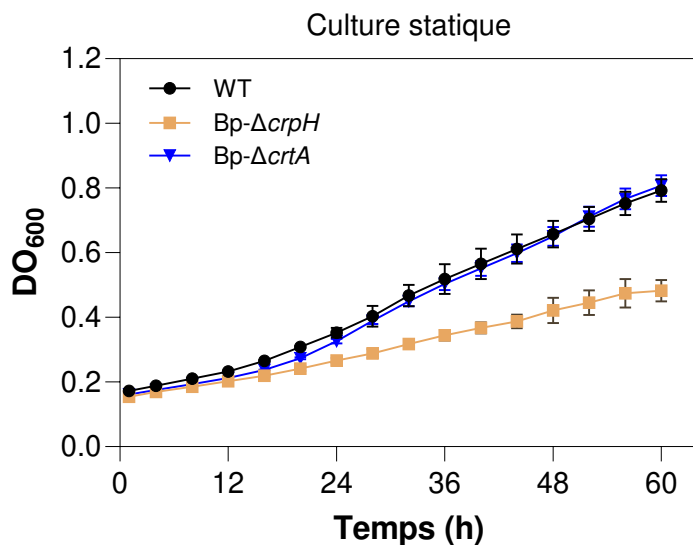


Figure 66. Croissance de *B. pertussis* sauvage et des mutants Bp- Δ crpH et Bp- Δ crtA. Les cultures ont été faites en condition statique en milieu SS, avec limitation en cuivre par 500 μ M de Trien. Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

5. CrpH : un acteur potentiel de la réduction du cuivre chez *B. pertussis*

5.1. Importance des histidines conservées dans la fonction de CrpH

L'alignement de la séquence de CrpH avec celles de protéines homologues a révélé la présence de quatre résidus histidine strictement conservés : H200, H444, H16 et H258. H200 et H444 sont localisées du côté périplasmique des hélices transmembranaires, comme le prédit le modèle structural généré par AlphaFold3 (Fig. 67A).

Pour évaluer leur importance fonctionnelle, ces deux résidus ont été substitués par des alanines, générant la souche mutante Bp-CrpH_{H200A-H444A}. La production de la protéine mutée a été confirmée par immunoblotting en utilisant l'anticorps dirigé contre CrpH (Fig. 65). L'effet de ces substitutions sur l'activité de CrpH a été évalué en comparant le profil de croissance en culture statique de Bp-CrpH_{H200A-H444A} à celui de la souche sauvage et du mutant Bp- Δ crpH (Fig. 67B). Le mutant Bp-CrpH_{H200A-H444A} a présenté le même défaut de croissance que la souche Bp- Δ crpH, indiquant que ces histidines sont essentielles à l'activité de CrpH.

Les histidines conservées sont une propriété commune aux protéines de la famille PepSY-TM, et elles participent à la coordination des hèmes nécessaires pour le transfert d'électron lors de la réaction de réduction. Ce résultat suggère que CrpH coordonnerait au moins un hème indispensable à son activité.

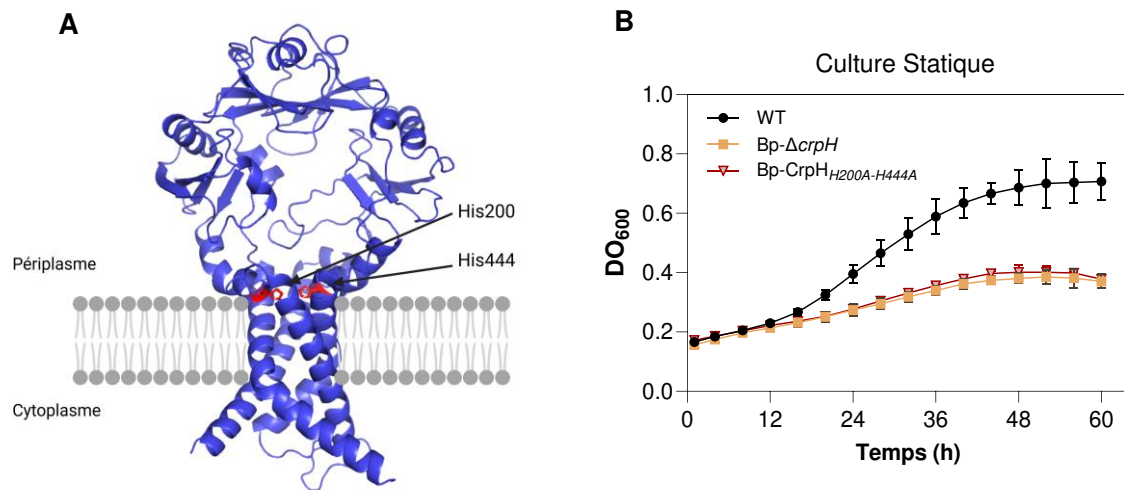


Figure 67. Importance des résidus His200 et 444 pour la fonction de CrpH. (A) Localisation des deux histidines au niveau du côté périplasmique des hélices transmembranaires de CrpH selon le modèle AlphaFold. (B) Suivi de croissance de la souche sauvage de *B. pertussis* et des mutants Bp-ΔcrpH et Bp-CrpH_{H200A-H444A} en culture statique en milieu SS supplémenté de 2 μM de CuSO₄. Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne ± l'écart-type de trois réplicats techniques.

5.2. Redondance partielle entre CrpH et la réductase de cuivre CcoG

Un système de réduction du cuivre a été décrit chez *R. capsulatus*. Il est lié à la biogenèse de cbb3-Cox, un membre de la famille des HCOs (Ekici et al., 2012a). Ce système repose sur une protéine de la membrane interne appelée CcoG. Après importation du Cu(II) à travers la membrane interne via le transporteur CcoA, CcoG catalyse spécifiquement la réduction de Cu(II) en Cu(I) grâce à son site actif localisé dans le cytoplasme (Marckmann et al., 2019). Le Cu(I) est ensuite exporté vers le périplasmique via une ATPase, Ccol, pour être inséré dans le centre Cu_B de cbb3-Cox (Ekici et al., 2012a,b).

Chez *B. pertussis*, un opéron (*bp2169-72*) codant cbb3-Cox est également présent, mais il est non fonctionnel car le premier gène est un pseudogène (McKay et al., 2024). En aval de cet opéron se trouve le gène *ccoG* (*bp2173*). Nos analyses de RNA-seq ont montré que ce dernier est exprimé chez *B. pertussis*. En revanche, l'ATPase Ccol (codée par *bp2168*) est tronquée et

dépourvue du site de fixation d'ATP. La comparaison des transcriptomes de Bp- Δ *crpH* et de la souche sauvage en culture statique a montré que le niveau d'expression de *ccoG* est légèrement plus élevé chez Bp- Δ *crpH* (Fig. 68A). Cette observation pourrait refléter une réponse adaptative de *B. pertussis* visant à compenser l'absence du gène *crpH* par une augmentation d'expression de *ccoG*. Nous avons émis précédemment l'hypothèse qu'un second système pourrait partiellement compenser CrpH, puisque nous avons montré qu'il restait une activité respiratoire liée aux HCO après inactivation de CrpH en culture statique. Afin de confirmer les données de RNA-seq, nous avons comparé par RT-qPCR l'expression de *ccoG* en culture statique chez Bp- Δ *crpH* et la souche sauvage (Fig. 68B). Cependant, cette analyse n'a pas permis de reproduire la différence observée par RNA-seq, *ccoG* étant exprimé à des niveaux similaires dans les deux souches.

Pour approfondir l'hypothèse que CcoG pourrait représenter un second système de réduction capable de compenser partiellement l'absence de CrpH, nous avons inactivé le gène *ccoG* à l'aide d'un plasmide suicide. La croissance du mutant Bp-KO*ccoG* a ensuite été évaluée en culture statique (Fig. 68 D). Un défaut de croissance similaire à celui de Bp- Δ *crpH* a été observé, suggérant que CcoG conserve une fonction chez *B. pertussis* malgré l'absence de *cbb3-Cox*.

Pour tester l'hypothèse que CcoG et CrpH fonctionnent de manière complémentaire, nous avons essayé d'inactiver simultanément les deux gènes pour étudier le phénotype de croissance en culture statique. La construction du double mutant s'est révélée beaucoup plus difficile que celle des simples mutants : la conjugaison visant à inactiver *ccoG* dans Bp- Δ *crpH* a dû être répétée plusieurs fois, et seuls quelques clones transconjugants ont pu être isolés. Un seul clone valide a finalement été obtenu.

Le mutant double Bp- Δ *crpH*KO*ccoG* présente une croissance d'apparence normale sur boîte de gélose au sang. En revanche, en culture liquide agitée (en tube ou en flasques) avec limitation en cuivre, il montre un phénotype d'agrégation (Fig. 68C). En condition statique, la croissance de ce mutant en plaque est quasi nulle même lorsque le milieu est supplémenté en cuivre (Fig. 68D), suggérant que l'inactivation combinée de *crpH* et *ccoG* empêche la respiration dans ce contexte. Ce résultat indique que CrpH et CcoG auraient des fonctions parallèles, partiellement redondantes chez *B. pertussis*, ce qui supporte l'idée que CrpH est

une réductase de cuivre pour les HCO. À l'inverse, en culture agitée, le double mutant a présenté un défaut de croissance très modéré (Fig. 68E). Ces résultats peuvent être interprétés de la façon suivante. Dans les conditions de culture agitée, la respiration assurée par *CydAB* est suffisante pour maintenir la croissance, et par conséquent un défaut de réduction de cuivre affectant l'assemblage des HCO a peu d'impact. En conditions de culture statique, l'efficacité de *CydAB* est réduite et l'inactivation de *CrpH* et de *CcoG* impacte la croissance bactérienne de façon majeure.

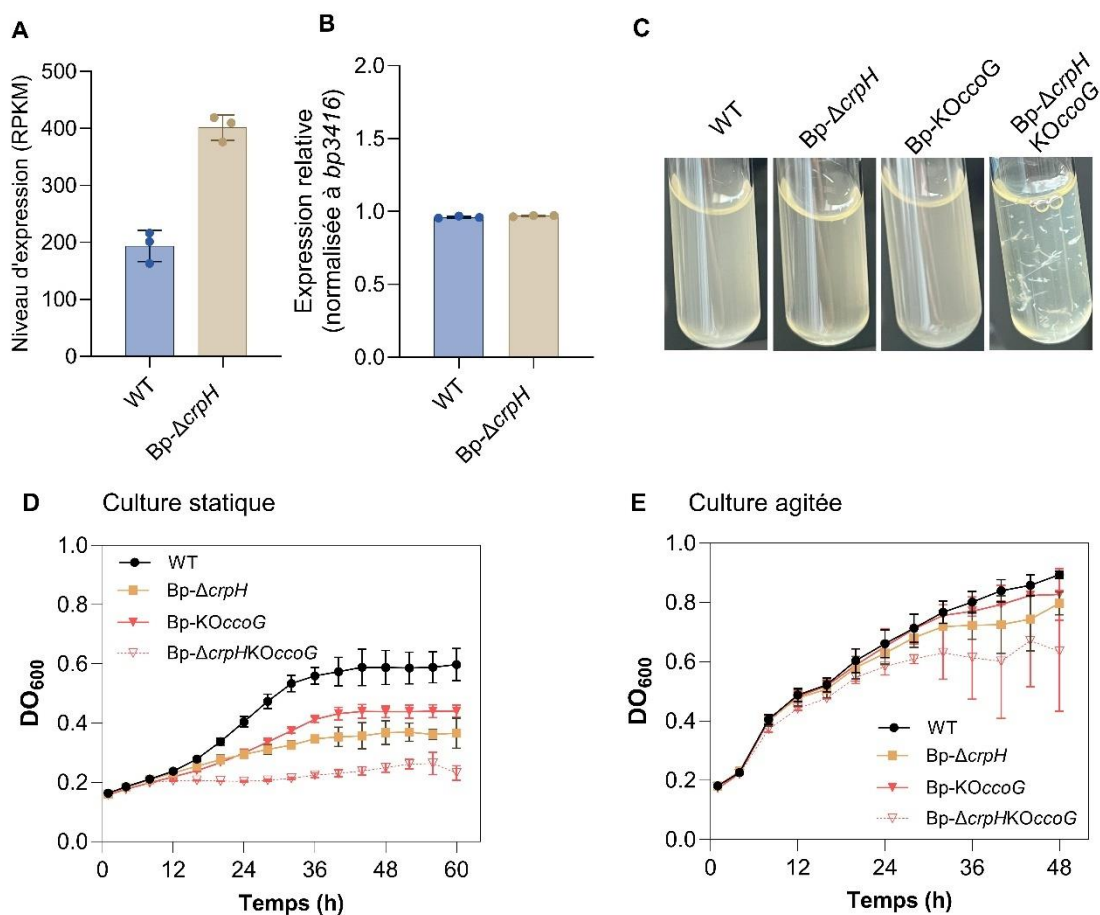


Figure 68. Redondance partielle entre la réductase de cuivre *CcoG* et la protéine *CrpH*. A, B. Analyse de l'expression de *ccoG* en culture statique chez BPSM (WT) ou le mutant Bp- Δ crpH par RNA-seq (A) ou qRT-PCR (B). Phénotype macroscopique de croissance du double mutant Bp- Δ crpHKOccoG en culture liquide en milieu SS supplémenté de 50 μ M de BCS. D, E. Suivi de croissance de BPSM et des mutants Bp- Δ crpH, Bp-KOccoG et Bp- Δ crpHKOccoG en culture statique ou en culture agitée en milieu SS supplémenté de 2 μ M de CuSO_4 . Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

5.3. Effet d'addition d'agent réducteur sur le phénotype du mutant *Bp-ΔcrpH*

Si le rôle de CrpH consiste à réduire le Cu(II) en Cu(I) dans le périplasma, l'importance de cette protéine devrait être atténuée dans des conditions favorisant la réduction du cuivre. Pour tester cette hypothèse, des concentrations élevées d'ascorbate et de glutathion, deux agents réducteurs, ont été ajoutées au milieu de culture afin de convertir le Cu(II) en Cu(I) en milieu extracellulaire. Ces deux composés font normalement partie du milieu de culture SS et sont utilisés par la bactérie, ce qui indique qu'ils sont importés. On doit donc en retrouver dans le périplasma, où s'exerce l'activité de CrpH. La croissance de *Bp-ΔcrpH* et de la souche sauvage a été étudiée en culture statique dans ces conditions (Fig. 69A et B). Cependant, l'ajout d'ascorbate ou de glutathion n'a pas permis de restaurer la croissance du mutant *Bp-ΔcrpH*, suggérant que l'augmentation de la disponibilité en Cu(I) ne compense pas l'absence de CrpH. Contrairement au fer, dont la réduction augmente la solubilité, le cuivre sous forme réduite est insoluble et ne peut pas diffuser librement. Cela suggère que le Cu(I) potentiellement généré par CrpH serait immédiatement complexé par une protéine impliquée dans l'assemblage des HCOs. Alternativement le cuivre serait déjà complexé à une protéine et CrpH permettrait de 'recycler' cette protéine en réduisant son cuivre oxydé. Un tel mécanisme pourrait expliquer pourquoi la réduction exogène du cuivre par les agents réducteurs ne complémente pas le phénotype de croissance du mutant *Bp-ΔcrpH*.

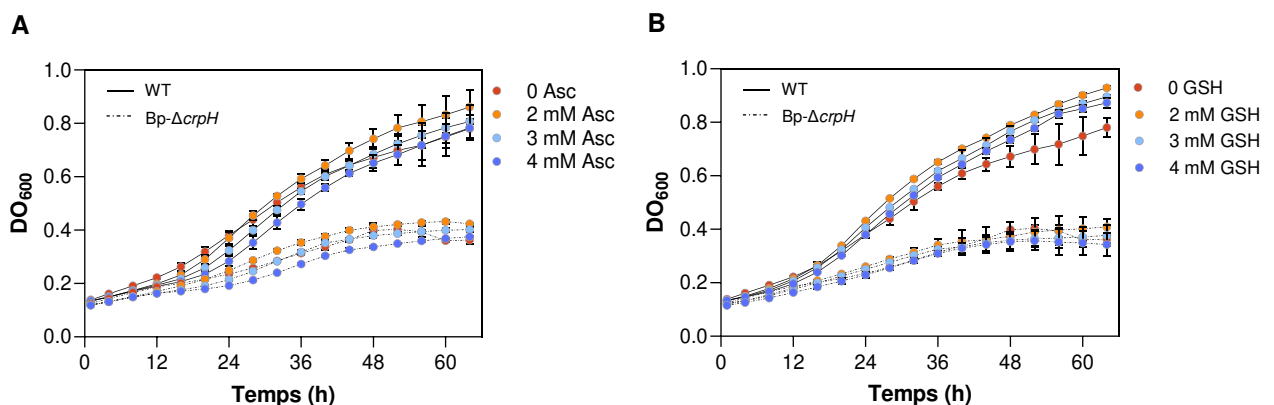


Figure 69. Impact de l'ascorbate ou du glutathion sur la croissance de la souche WT et du mutant *Bp-ΔcrpH*. Les cultures ont été faites en condition statique en milieu SS supplémenté de 2, 3 ou 4 mM d'ascorbate (A) ou de glutathion (B). Les données sont représentatives de trois réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques.

5.4. Rôle des chaperonnes à cuivre PCu_AC et Scol en culture statique

PCu_AC est un chaperon à cuivre périplasmique et Scol est un autre chaperon à cuivre ancré à la membrane interne avec un domaine périplasmique. Ces deux protéines sont capables de fixer le cuivre réduit et oxydé (Canonica, Klose, et al., 2019; Siluvai et al., 2011) et elles jouent un rôle dans le transport du cuivre vers les HCOs (Thompson et al., 2012). Chez certaines bactéries, Scol joue aussi le rôle de réductase du pont disulfure du site Cu_A périplasmique dans aa3-Cox, avant que ces cystéines puissent fixer les ions Cu (Cu(I) et Cu(II)) (Abicht et al., 2014; Mohorko et al., 2012).

B. pertussis possède les gènes pour une protéine PCu_AC (Bp0562) et deux protéines Scol, Scol-1 (Bp-0988) et Scol-2 (Bp3734). Le gène codant Scol-2 est situé à proximité de l'opéron codant pour aa3-Cox (*bp3740-3744*). La cavité de CrpH est très large et pourrait lier un petit domaine protéique. Les chaperons PCu_AC, Scol-1 et Scol-2 représentent donc de bons candidats pour servir de partenaire périplasmique présentant un Cu(II) au site actif de CrpH pour y être réduit. Pour tester cette hypothèse, des mutants délétés des gènes de chacun de ces chaperons ont été construits (*Bp-ΔpCu_AC*, *Bp-Δscol1* et *Bp-Δscol2*). Leur croissance a été étudiée en condition de culture statique par rapport à BPSM et *Bp-ΔcrpH* (Fig. 70A). *Bp-ΔpCu_AC* et *Bp-Δscol2* montrent un léger défaut de croissance par rapport à la souche sauvage, et *Bp-Δscol1* montre un défaut de croissance plus accentué. Cela indique que Scol-1 joue un rôle plus important pour *B. pertussis* que les deux autres protéines en culture statique. En parallèle, nous avons observé que l'activité aa3-Cox est très réduite chez le mutant *Bp-Δscol1* (Fig. 70B). Par conséquent, ces données ne permettent pas de conclure si Scol-1 pourrait être le partenaire de CrpH. Comme Scol-1 est important pour l'activité de aa3-Cox, son défaut de croissance en statique peut être lié à l'absence de cette oxydase. Nous avons montré précédemment que les mutants simples des HCOs provoquent aussi un défaut de croissance semblable. D'autres analyses doivent encore être effectuées pour investiguer s'il y a un lien entre CrpH et Scol-1. Ce dernier pourrait aussi réduire le site Cu_A avant l'incorporation des ions cuivre.

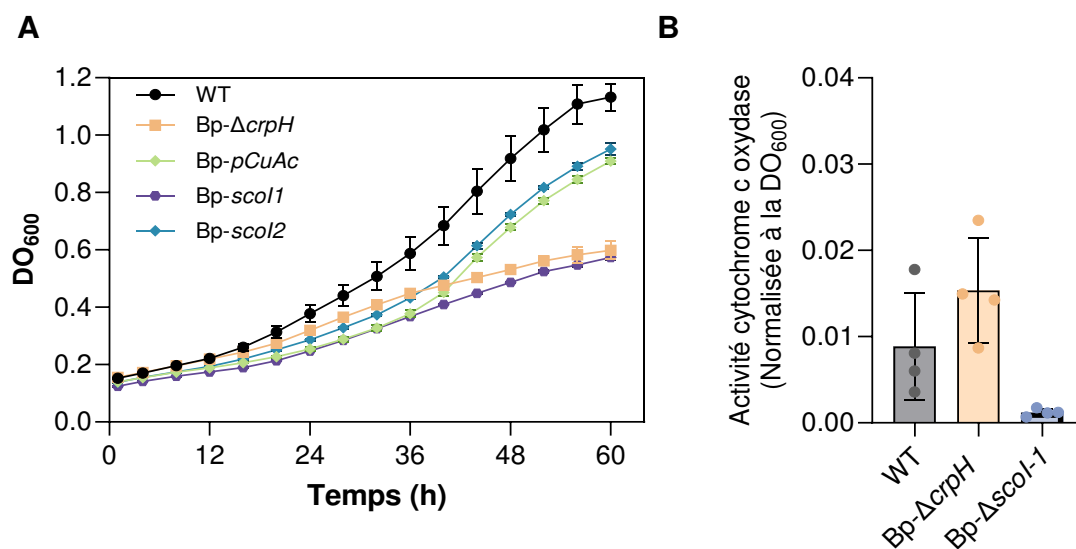


Figure 70 Croissance de la souche WT et de mutants de chaperons du cuivre. (A) Bp- Δ crpH, Bp- Δ pCu_{AC}, Bp- Δ scol1 et Bp- Δ scol2 ont été cultivées en culture statique en milieu SS supplémenté de 2 μ M CuSO₄. Les données sont représentatives de deux réplicats biologiques et correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de trois réplicats techniques. (B) Activité aa3-Cox mesurée par le test TMPD dans la souche sauvage et les mutants Bp- Δ crpH et Bp- Δ scol-1 cultivés en cultures agitées non supplémentées en cuivre, récoltées en début de phase exponentielle. Résultat représentatif de quatre réplicats biologiques.

6. Article N°2: CrpH of *Bordetella pertussis*, a prototypic PepSY_{TM} protein supporting heme-copper oxidoreductase function



OPEN ACCESS

EDITED BY

Marie-Joelle Françoise Virolle,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

REVIEWED BY

Jean-Yves Matroule,
University of Namur, Belgium
Ayon Pal,
Raiganj University, India

*CORRESPONDENCE

Rudy Antoine
✉ rudy.antoine@pasteur-lille.fr
Françoise Jacob-Dubuisson
✉ francoise.jacob@cnrs.fr

†These authors have contributed equally
to this work and share senior authorship

†PRESENT ADDRESS

Gauthier Roy,
Institute for Molecular Infection Biology
(IMIB), Faculty of Medicine, University of
Würzburg, Würzburg, Germany

RECEIVED 12 January 2026

REVISED 03 March 2026

ACCEPTED 04 March 2026

PUBLISHED 18 March 2026

CITATION

Hachmi M, Roy G, Debie A-S, Slupek S,
Antoine R and
Jacob-Dubuisson F (2026) CrpH of
Bordetella pertussis, a prototypic
PepSY_TM protein supporting
heme-copper oxidoreductase function.
Front. Microbiol. 17:1786092.
doi: 10.3389/fmicb.2026.1786092

COPYRIGHT

© 2026 Hachmi, Roy, Debie, Slupek,
Antoine and Jacob-Dubuisson. This is
an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

CrpH of *Bordetella pertussis*, a prototypic PepSY_TM protein supporting heme-copper oxidoreductase function

Majda Hachmi, Gauthier Roy[†], Anne-Sophie Debie,
Stéphanie Slupek, Rudy Antoine*[†] and
Françoise Jacob-Dubuisson*[†]

University of Lille, Inserm, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Center for
Infection and Immunity of Lille, Lille, France

In the living world, copper is both toxic in excess and necessary for the activity of specific oxidoreductases and electron transfer chains and as such is involved in the host-pathogen interface. Mammalian hosts deploy anti-microbial strategies of copper intoxication or starvation of invading microorganisms, collectively called nutritional immunity, and bacteria have developed both protection and acquisition systems in response. We recently described a TonB-dependent copper importer, CrtA^{Bp} in the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. Here we characterized another protein encoded in the same operon and similarly upregulated by copper starvation, CrpH. By combining *in vitro* and *in vivo* experiments with transcriptomics, we showed that CrpH contributes to bacterial fitness and enhances respiration by the heme-copper oxidoreductases (HCO) of *B. pertussis*. CrpH belongs to the PepSY_TM superfamily of membrane-associated bacterial enzymes, whose known members catalyze heme-mediated ferrisiderophore reduction in the periplasm. The corresponding heme-binding motifs of CrpH are similarly required for function. Furthermore, we uncovered a synthetic growth phenotype of a double *crpH-ccoG* mutant, the latter gene encoding a putative copper reductase involved in HCO assembly. *In silico* analyses identified thousands of CrpH orthologs, leading us to define a new subfamily of PepSY_TM proteins found in diverse bacterial species all harboring HCO genes. Collectively, our results indicate that CrpH of *B. pertussis* is a prototype of a family of proteins supporting HCO function.

KEYWORDS

aerobic respiration, *Bordetella pertussis*, copper acquisition, heme-copper oxidoreductase, PEPSY_TM family, sequence similarity network, copper reductase

Introduction

A handful of transition metals are ubiquitously encountered in living beings, where these micronutrients play essential structural, regulatory and catalytic roles (Helmann, 2025a; Helmann, 2025b). However, metals are also toxic in excess, hence their homeostasis is strictly controlled. In particular, they are key players at the host-pathogen interface, with hosts deploying strategies to intoxicate invading microorganisms with metals or to withhold metals to starve them, collectively called nutritional immunity (Murdoch and Skaar, 2022). In turn, bacteria have developed a variety of systems to protect against toxic levels of metals or

conversely to scavenge scarce metals from their environment (Chandrangu et al., 2017; Fu et al., 2014).

Among transition metals, copper is an integral part of the catalytic center of several oxidative enzymes thanks to the redox potential of the Cu(I)/Cu(II) couple. Its properties have notably been harnessed in electron transport chains for energy generation (Andrei et al., 2020). Because copper is also toxic, bacteria have acquired several protection mechanisms. In contrast, relatively few copper acquisition systems are known in bacteria. A few species synthesize “chalkophores” to acquire copper (Buglino et al., 2022; Kenney and Rosenzweig, 2018; Koh et al., 2017). In diderm bacteria copper crosses the outer membrane through porins or TonB-dependent transporters (TBDTs), few of which are currently known to import this metal (Bhamidimarri et al., 2021; Hachmi et al., 2026). Specific copper uptake across the cytoplasmic membrane has mostly been described in respiratory heme-copper oxidoreductase (HCO) assembly pathways (Khalfaoui-Hassani et al., 2023; Khalfaoui-Hassani et al., 2018).

The whooping cough agent *Bordetella pertussis* harbors a large virulence regulon under the control of the two-component BvgAS system, but its metabolism also contributes to its success as a pathogen (Belcher et al., 2021). With respect to copper, *B. pertussis* has shed most protection systems against copper typically found in Proteobacteria, whereas it possesses a three-gene operon, *cruR-crtA-bp2921*, maximally expressed under conditions of copper limitation and involved in its acquisition (Hachmi et al., 2026; Rivera-Millot et al., 2021; Roy et al., 2022). The first gene codes for the copper-responsive upstream ORF CruR, which negatively regulates expression of the following two genes in a post-transcriptional manner in conditions of copper excess (Roy et al., 2022). The second gene encodes a TBDT, CrtA, that imports copper-chelate complexes for the HCOs of *B. pertussis* (Hachmi et al., 2026). HCOs are major cuproproteins in this strictly aerobic species which produces two such complexes, an aa3 cytochrome c oxidase (aa3-Cox) and a bo ubiquinol oxidase (bo-Qox), as well as a copper-independent bd ubiquinol oxidase (bd-Qox) (Kaila and Wikstrom, 2021; McKay et al., 2024). HCO assembly pathways have been characterized in a few model bacteria, although not in *B. pertussis* (Hederstedt, 2022).

The function of the protein encoded by *bp2921*, the last gene of the *cruR-crtA-bp2921* operon, remains unknown. Because the functions of both CruR and CrtA are linked with copper, we hypothesized that the third protein of the operon may also be copper-related. This protein (Uniprot Q7VUZ4) belongs to the Pfam PepSY_TM family, widespread among eubacteria. PepSY_TM proteins harbor up to six transmembrane helices with nested, loosely conserved 60 to 90 residue-long extracytoplasmic α/β PepSY domain(s). A few of them have been characterized as being periplasmic ferrisiderophore reductases, thereby promoting dissociation of iron for its uptake across the cytoplasmic membrane (Hussein et al., 2024; Josts et al., 2021; Ong and O'Brian, 2023). The crystal structure of a family member, FoxB of *Pseudomonas aeruginosa*, shows a large periplasmic moiety formed of two PepSY domains, each flanked by two transmembrane helices. Highly conserved His residues on each side of the membrane axially chelate two heme groups for electron transfer from an unknown donor to the ferrisiderophore bound in the periplasmic cavity of the enzyme (Josts et al., 2021).

In this work, we investigated the function of the protein encoded by *bp2921*. Because CrtA was shown to import copper for the HCOs of *B. pertussis*, we tested the hypothesis that the *bp2921*-encoded protein also contributes to HCO-mediated respiration. We found that its

activity enhances the *in vitro* and *in vivo* fitness of *B. pertussis*. Our results indicate that it contributes to HCO function possibly as a periplasmic copper reductase, hence the proposed name CrpH (copper reduction in the periplasm for HCOs). *In silico* analyses identified thousands of putative orthologs in various bacterial genera, suggesting that CrpH is the prototype of a new subfamily of PepSY_TM proteins functionally associated with HCO-mediated respiration.

Materials and methods

Strains and plasmids

Several *crpH* mutant strains were constructed in this study. An in-frame deletion was generated by amplifying the flanking regions of *bp2921* and cloning them into pSS1129 (Stibitz, 1994). The recombinant plasmid was introduced into *E. coli* SM10 and transferred to *B. pertussis* BPSM by conjugation for allelic exchange, yielding Bp- Δ *crpH*. We also constructed a *crpH* KO mutant (Bp-*crpH*_{KO}) by insertion of the suicide plasmid pFUS2 (Antoine et al., 2000). To compare growth profiles between strains harboring the same resistance markers, a gentamycin-resistant BPSM variant was used where necessary (Solans et al., 2018). Site-directed mutagenesis was used to introduce the H₂₀₀A and H₄₄₄A substitutions in *crpH*, followed by allelic exchange to reintroduce the gene in Bp- Δ *crpH*. Knockout mutants of *cydAB* (*bp259-260*), *cyoABCD* (*bp2930-bp2933*), *ctaCDFGE* (*bp3740-bp3744*), and *ccoG* (*bp2173*) were obtained by interrupting the first gene of each operon with pFUS2. For heterologous expression, *crpH* was PCR-amplified and inserted into NdeI- and HindIII- restricted pET-TEV, yielding pET-TEV2921 which encodes CrpH with an N-terminal 6-His tag. The NcoI-HindIII fragment of the latter plasmid was also introduced in pBAD-mycHis (Invitrogen) for expression under the Para promoter. To express *crpH* under the pT5-lac promoter, the sequence containing the ribosome-binding site, the 6-His tag and the 5' portion of *crpH* sequence was PCR-amplified from pET-TEV2921, restricted with BglII and ApaI fragment, and inserted in a three-piece ligation with the ApaI-HindIII fragment from the same plasmid in pCA24 (Kitagawa et al., 2005). For overexpression in *B. pertussis*, we introduced the P₁₂₀A + P₁₂₁A substitutions in *cruR* by allelic exchange in the *B. pertussis* chromosome, as they deregulated and markedly increased expression of a reporter gene replacing *crtA* and *crpH* (Roy et al., 2022). However, the resulting clones failed to produce CrtA, indicating selective pressure against increased expression of the operon. All PCR-based constructs were verified by Sanger sequencing to confirm the absence of extraneous mutations. Strains, plasmids, and oligonucleotides used in this study are listed in Supplementary Table S1.

Culture conditions

B. pertussis was cultivated on Bordet–Gengou (BG) agar supplemented with defibrinated sheep blood for 48 h at 37 °C. Bacterial precultures were carried out in sterile plastic flasks to minimize metal contamination in Stainer–Scholte (SS) liquid medium (initial OD₆₀₀ = 0.25) and incubated for 20 h at 37 °C with shaking. For high-aeration conditions, cultures were inoculated from these precultures into 96-well plates (200 μ L of medium per well) at an initial OD₆₀₀ = 0.15 and grown at 37 °C under continuous agitation

(400 rpm) in the EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer). For low-aeration conditions, a second preculture was performed in SS medium supplemented with 500 μM Trien, except with the *cydAB* mutants for which the second preculture was performed without Trien. Static cultures were inoculated in covered 96-well plates (200 μL of medium per 390- μL flat-bottom well) at initial $\text{OD}_{600} = 0.2$. Plates were briefly agitated for 5 min every hour to homogenize bacterial suspensions (400 rpm, orbital diameter of 1 mm) followed by 1 min without agitation prior to OD measurements. For all growth assays, SS medium was supplemented with 20 mM MgSO_4 to maximize *crpH* expression, and ascorbic acid was omitted from the SS medium to minimize Cu reduction, except where indicated. For copper supplementation, CuSO_4 was added at the indicated concentrations. Antibiotics were used at final concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin for strains carrying pFUS2. For recombinant expression of *crpH*, various media, temperature and induction conditions were tested with all plasmids. pET-TEV2921 was introduced in *E. coli* C43(DE3) and grown in LB or terrific broth at 37 °C, for 4 h with 1 mM IPTG or 20 °C overnight with 100 μM IPTG; or in auto-induction medium (AIM) at 37 °C for 4 h then 20 °C overnight. For expression in pBAD, *E. coli* LMG194 was grown in LB or terrific broth medium for 4 h at 37 °C then 16 °C overnight with 0.2% arabinose. For pCA24-2921, expression was performed in *E. coli* UT5600 or BL21 grown in M9 medium at 18 °C overnight with 200 μM or 1 mM IPTG; or in AIM at 28 °C; or in LB for 4 h at 37 °C then overnight at 16 °C with 200 μM or 1 mM IPTG. In all conditions 250 μM $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ and 50 μM levulinate were added.

ATP quantification

Intracellular ATP levels were quantified using the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega). Bacteria were grown either under agitated or static conditions in 96-well plates containing 200 μL of medium per well supplemented with 2 μM CuSO_4 . After 24 h for agitated cultures and 24 h or 48 h for static cultures, 100 μL was used to measure the OD_{600} , and the remaining 100 μL was mixed with an equal volume of reagent in white opaque 96-well plates. After 5 min of incubation at room temperature, light emission was measured using a Tecan microplate reader. Four biological replicates, each with three technical replicates were performed, and the results were expressed as relative light units (RLU) normalized to the OD_{600} .

TMPD assay

Bacteria grown in T25 flasks (10-mL cultures) were harvested at early or late-exponential growth phase and during late-exponential growth phase for high- and low-aeration conditions, respectively. They were diluted in 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0), 150 mM NaCl, mixed with 0.5 mM TMPD (from a 10 mM stock solution in the same buffer containing 100 μM ascorbate), and TMPD oxidation was measured by recording absorbance at 562 nm using a Uvikon spectrophotometer. Initial rates of reaction were used to calculate the enzymatic activities, which were normalized to the OD_{600} value of the corresponding culture. Cytochrome c oxidase activity measured for the aa3-Cox-deficient Bp-*ctaCDFGE_{KO}* mutant, corresponding to non-specific oxidation, was subtracted from the values measured for the other strains.

RNA extraction and sequencing

The bacteria were grown in T25 flasks with or without agitation (200 rpm) in SS medium supplemented with 20 mM MgSO_4 . Bacterial suspensions (8 mL) were collected at mid-exponential phase and centrifuged at 4,000 rpm for 15 min at 4 °C after adding 2 mL of a phenol:ethanol solution (5:95, v/v). Total RNA was extracted using Tri-Reagent (Invitrogen), followed by two consecutive DNase I treatments (Sigma-Aldrich), each followed by purification using AMPure XP beads (Beckman Coulter) to remove genomic DNA and contaminating solvents. RNA concentration was measured with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). Ribosomal RNA was depleted using the QIAseq FastSelect-5S/16S/23S Kit (Qiagen). Strand-specific RNA-seq libraries were prepared with the QIAseq Stranded RNA Library Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 system (Illumina, Inc.) in high-output mode. All samples were multiplexed on one lane of the flow cell and sequenced in single-read sequencing mode with read lengths of 150 base pairs. Raw RNA-seq reads were processed with Illumina quality control tools using default settings. The data were deposited in ArrayExpress,¹ under the accession number E-MTAB-16727.

RNA-seq data analyses and dataset filtration

Raw sequencing data from three biological replicates of the two strains in each growth condition were processed using the SPARTA pipeline (Johnson et al., 2016). Briefly, the reads were first processed with Trimmomatic to remove Illumina adapter sequences and low quality reads with the following parameters (adapters/truseq3-se-fa:2:30:10; leading:3; trailing:3; slidingwindow:4:15; minlen:36). The quality of the reads was then assessed using fastQC. They were mapped on the *B. pertussis* TohamaI reference genome using Bowtie. The number of reads mapped to the different features was calculated using HTSeq-count. Transposase-encoding genes and pseudogenes were removed from the output tables containing reads per kb and million bp (RPKM) values for all annotated genes. The differential gene expression analysis for all the other genes was done using the edgeR package. Potential Batch Effects were detected using MultiDimensional Scaling (MDS) plot. Differential expression thresholds were set at $\log_2\text{FC} \geq 1$ for upregulation and $\log_2\text{FC} \leq -1$ for down-regulation, with an FDR ≤ 0.05 considered statistically significant. The results were visualized as a volcano plot generated with GraphPad Prism. A functional enrichment analysis (over-representation analysis) was performed on the lists of genes specifically up- or down-regulated in Bp- ΔcrpH using the R programming language. Genes were first mapped to the STRING database using the *B. pertussis* taxon (TaxID 257,313) to assign a unique STRING identifier to each gene. Genes that could not be mapped were excluded from subsequent analyses. The remaining genes were associated with functional terms using all proteins annotated in STRING as the reference background. Functional enrichment was performed using the clusterProfiler R package with a *p*-value ≤ 0.05 adjusted using the Benjamini-Hochberg correction. For each functional term, a fold-enrichment value was

¹ <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

calculated as the ratio between the numbers of genes associated with a given term in the list of interest and in the reference background. This metric was used to evaluate the degree of over-representation of each functional term in the analyzed gene set. The main enriched functional categories were visualized graphically according to fold enrichment, adjusted *p*-value, and the numbers of genes.

Animal experiments

BPSM harboring a gentamycin resistance marker (Solans et al., 2018) and Bp- Δ *crpH* cultivated in standard SS medium were used to inoculate agitated cultures under copper-limiting conditions in medium with 50 μ M of bathocuproine disulfonate (BCS) to maximize expression of the operon. Bacteria were diluted in sterile PBS, and mice were infected via the intranasal route with 5×10^4 CFU in a 20- μ L inoculum. For co-infection experiments, mice received an equal mixture of BPSM and Bp- Δ *crpH*, each at 5×10^4 CFU per mouse. Groups of three or four mice for BPSM and four for Bp- Δ *crpH* were anesthetized using euthasol (140 mg/kg) followed by cervical dislocation after 3 h, 4 days, 7 days, and 14 days post-infection. Lungs and nasal cavities were collected, homogenized in PBS, and dilutions were plated on BG agar to determine CFU counts for each strain. In co-infection experiments, the two strains were differentiated by their antibiotic resistance markers. The study protocol was approved by the Ethical Committees of the Region Nord-Pas-de-Calais and the Ministry of Research under the agreement number APAFIS #51236-2024041114331031 v7.

Statistics

Statistical analyses were performed using a nonparametric permutation-based ANOVA with a global model including two factors and their interaction (strain \times time for animal experiments; strain \times culture condition for TMPD and BacTiter-Glo assays). Significance was assessed using 10,000 permutations. When a significant interaction effect was detected, strain comparisons were performed independently at each time point or condition using permutation-based one-way ANOVA. Resulting *p*-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini–Hochberg procedure. Effect sizes and confidence intervals were calculated according to Cohen's *d* test.

In silico analyses

All PepSY_TM proteins were first collected from the nr NCBI database (1/1/2025) using the PepSY_TM.hmm profile,² sequence redundancy was reduced to 80% identity using CD-HIT,³ and the proteins (>40,000) were subjected to sequence similarity network analyses (SSN) using the Enzyme Function Initiative Enzyme Similarity Tool (EFI-EST)⁴ (Oberg et al., 2023). Networks were visualized by Cytoscape (Shannon et al., 2003). To build a weblogo (Crooks et al., 2004), we aligned 63 orthologs with ClustalW. ConSurf was used to analyze the conservation in this set. Co-occurrences analyses were performed on fully assembled bacterial genomes (>40,000) as described (Antoine et al., 2025). BlastP analyses were performed with

all PepSY_TM proteins encoded in these genomes, and those whose first hit belongs to the CrpH SSN cluster were collected and considered CrpH orthologs.

Immunoblot analyses

Antibodies against a synthetic CrpH peptide were produced in rats (Eurogentec) and used at a 1:500 dilution for detection of the protein from *B. pertussis* extracts, followed with an anti-rat-HRP conjugate (dilution 1:5,000; Promega). The recombinant protein produced in *E. coli* was detected using an antibody against a His6 tag (SigmaAldrich) followed with an anti-mouse-HRP (dilution 1:5,000; Promega). Detection was performed with the Amersham ECL Prime Western Blotting System using the Amersham Imager 600 (GE).

Results

Conditional growth defect of the *crpH* KO strain

To determine the role of CrpH in *B. pertussis*, we inactivated the corresponding gene by insertion. The growth of the resulting Bp-*crpH*_{KO} strain was compared to that of its wild-type (WT) parent, BPSM, in medium supplemented with the specific Cu(II) chelator triethylenetetramine (Trien) in 96-well plates under standard high-aeration culture conditions. Trien was added to limit copper availability and thereby to maximize *crpH* expression. Under these conditions however, Bp-*crpH*_{KO} exhibited no growth defect relative to its parent, and addition of CuSO₄ hardly improved growth of the two strains (Figure 1A).

In contrast, when cultured under static, low-aeration conditions in copper-limited medium, Bp-*crpH*_{KO} exhibited a pronounced growth defect relative to its WT parent (Figure 1B). In copper-supplemented medium, both strains reached higher cellular densities, implying that this metal is key to facing low aeration. However, growth of the mutant strain remained much lower than that of the WT parent, even at a high copper concentration (Figure 1B; Supplementary Figure S1). Thus, optimal *B. pertussis* growth under low-aeration conditions requires both copper and *crpH*. The conditional growth defect of the mutant in low aeration hints at a role of CrpH in respiration.

Attempts to complement the deletion mutant were unsuccessful, most likely because the complex regulation of the operon could not be reproduced in trans (Roy et al., 2022). Because *crpH* is the last gene of the operon and the adjacent *bp2920* gene is transcribed in opposite orientation, a polar effect of *crpH* inactivation was very unlikely. We nevertheless confirmed the phenotype observed with Bp-*crpH*_{KO} by introducing an in-frame deletion in *crpH*. Growth of the resulting Bp- Δ *crpH* mutant in low-aeration conditions was similar to that of Bp-*crpH*_{KO}, confirming that the conditional growth phenotype was caused by *crpH* inactivation (Supplementary Figure S2).

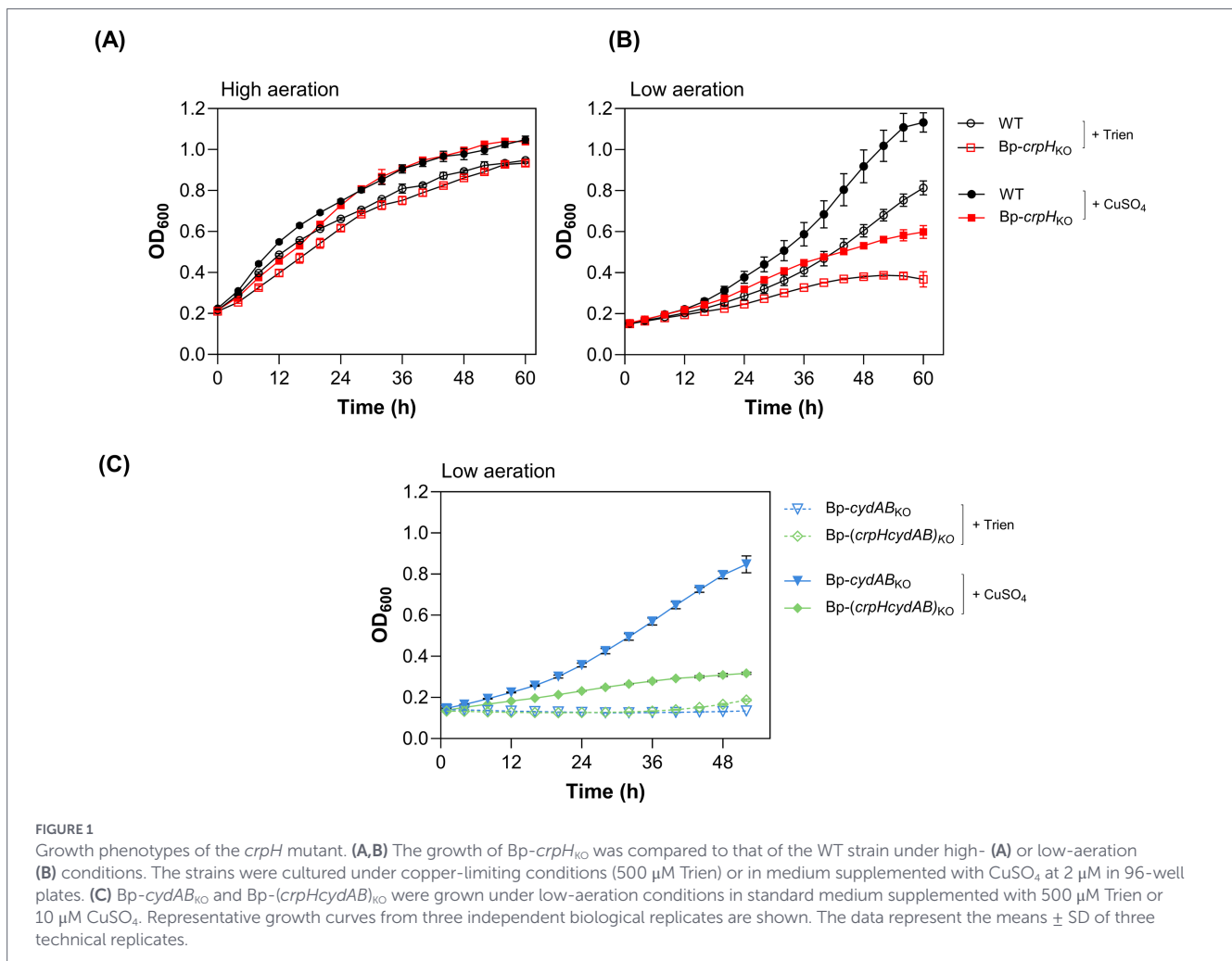
Importance of CrpH for HCO-mediated respiration

To substantiate a potential role of CrpH in HCO-dependent respiration, the *cydAB* operon coding for the copper-independent

2 <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF03929>

3 <http://bioinformatics.org/cd-hit/>

4 <https://efi.igb.illinois.edu/efi-est/>



bd-Qox was inactivated in both Bp- Δ *crpH* and the parental strain, yielding Bp-(*crpHcydAB*)_{KO} and Bp-*cydAB*_{KO}, respectively. In the absence of *cydAB*, *B. pertussis* growth should become strictly dependent on copper, which is required for HCO function. Growth of Bp-*cydAB*_{KO} and Bp-(*crpHcydAB*)_{KO} was monitored under low-aeration conditions in copper-limiting medium or in medium supplemented with CuSO₄. As expected, the growth of both strains was impaired in copper-limiting medium. CuSO₄ supplementation markedly improved the growth of Bp-*cydAB*_{KO}, whereas that of Bp-(*crpHcydAB*)_{KO} remained modest (Figure 1C). The limited growth rate of Bp-(*crpHcydAB*)_{KO} under low-aeration conditions even with copper supplementation suggested a defect in using copper for respiration in the absence of CrpH, consistent with the idea that CrpH somehow sustains the activity of one or both HCO(s) in *B. pertussis*.

We compared the intracellular ATP levels in the WT and Bp-*crpH*_{KO} strains grown with CuSO₄. In high-aeration conditions, ATP levels did not markedly differ between the two strains (Figure 2A). In contrast, they were reduced in Bp-*crpH*_{KO} relative to its parent in low-aeration conditions both in early- and late-log phases, supporting a role of CrpH in respiration efficiency (Figures 2B,C).

We next inactivated *cyoABCD* or *ctaCDFGE*, coding for bo-Qox and aa3-Cox respectively, in Bp- Δ *crpH*. However, the resulting mutant strains hardly grew at all in low-aeration conditions, while the same KO mutations had milder effects in the parental strain. In contrast, the growth rates of these mutants were hardly reduced relative

to the WT parent in high-aeration conditions (Supplementary Figure S3). Collectively, these results might be interpreted as follows. In high-aeration conditions, the copper-independent bd-Qox might be a major respiratory oxidase for *B. pertussis*, accounting for the absence of phenotypes of the *crpH* mutant. In low-aeration conditions in contrast, optimal growth requires HCO activity, and the role of CrpH becomes apparent. Thus, our results are consistent with a role for CrpH in handling respiratory copper.

The activity of cytochrome c oxidases can easily be measured in bacteria using the chromogenic molecule TMPD, which turns blue when oxidized. We thus determined aa3-Cox activities in the WT and Bp-*crpH*_{KO} strains by spectrophotometry. Both strains exhibited similar activities both in high- and low-aeration conditions even without CuSO₄ addition (Figure 3). Therefore, these results suggest that CrpH is not essential for aa3-Cox activity, although this rather crude assay might overlook moderate differences. Unfortunately, we could not measure bo-Qox activity, as no simple assay is available for ubiquinol oxidase activity. Therefore, these data did not enable us to unequivocally identify the potential client(s) of CrpH activity.

Effect of *crpH* inactivation on gene expression

To investigate the defect of Bp- Δ *crpH*, we compared its transcripts under high- or low-aeration conditions with RNA-seq, using

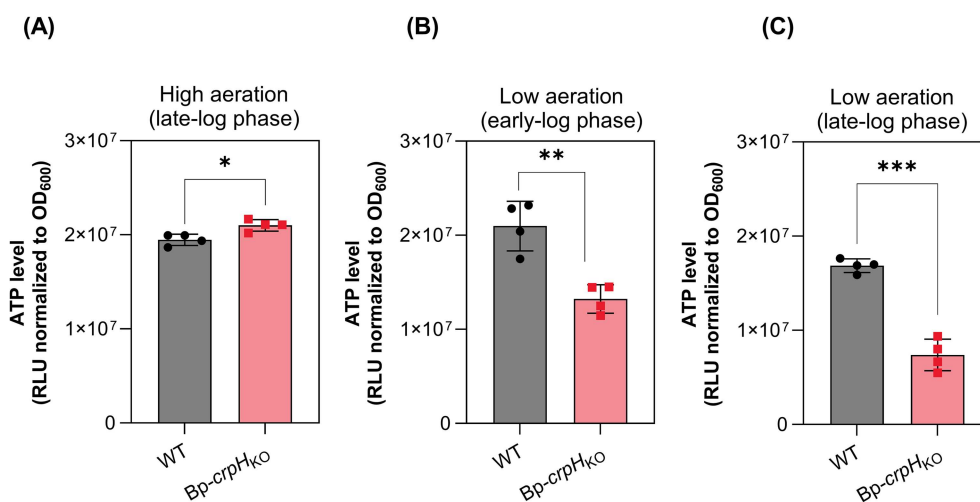


FIGURE 2

ATP levels in the *crpH* mutant relative to the WT strain. ATP levels were measured using the BacTiter-Glo assay. WT and *Bp-crpH_{ko}* were cultivated under high- (A) or low-aeration conditions (B,C) in medium supplemented with 2 μ M CuSO_4 . Luminescence values are expressed as relative light units (RLU) normalized to the optical density of the cultures at 600 nm. Data represent the mean \pm SD of four independent biological replicates. Statistical significance was determined using a non-parametric permutation-based ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

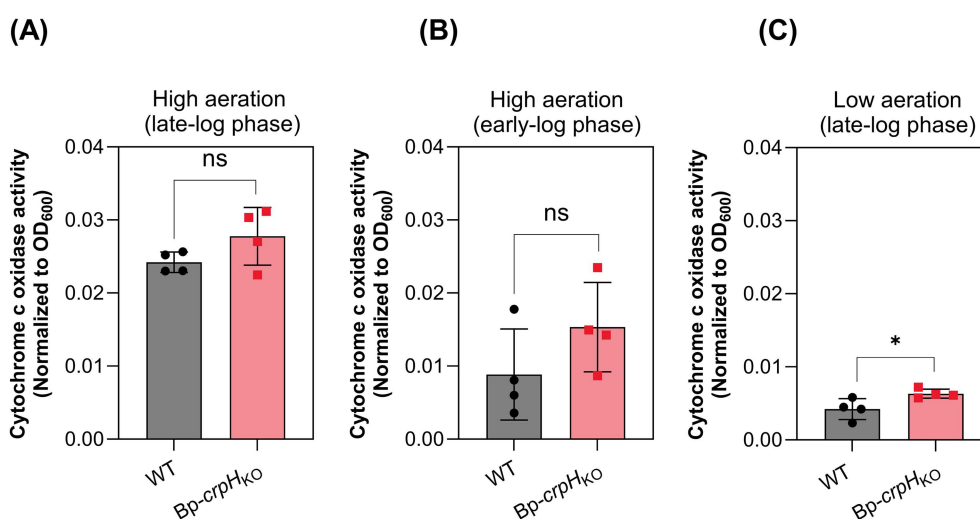


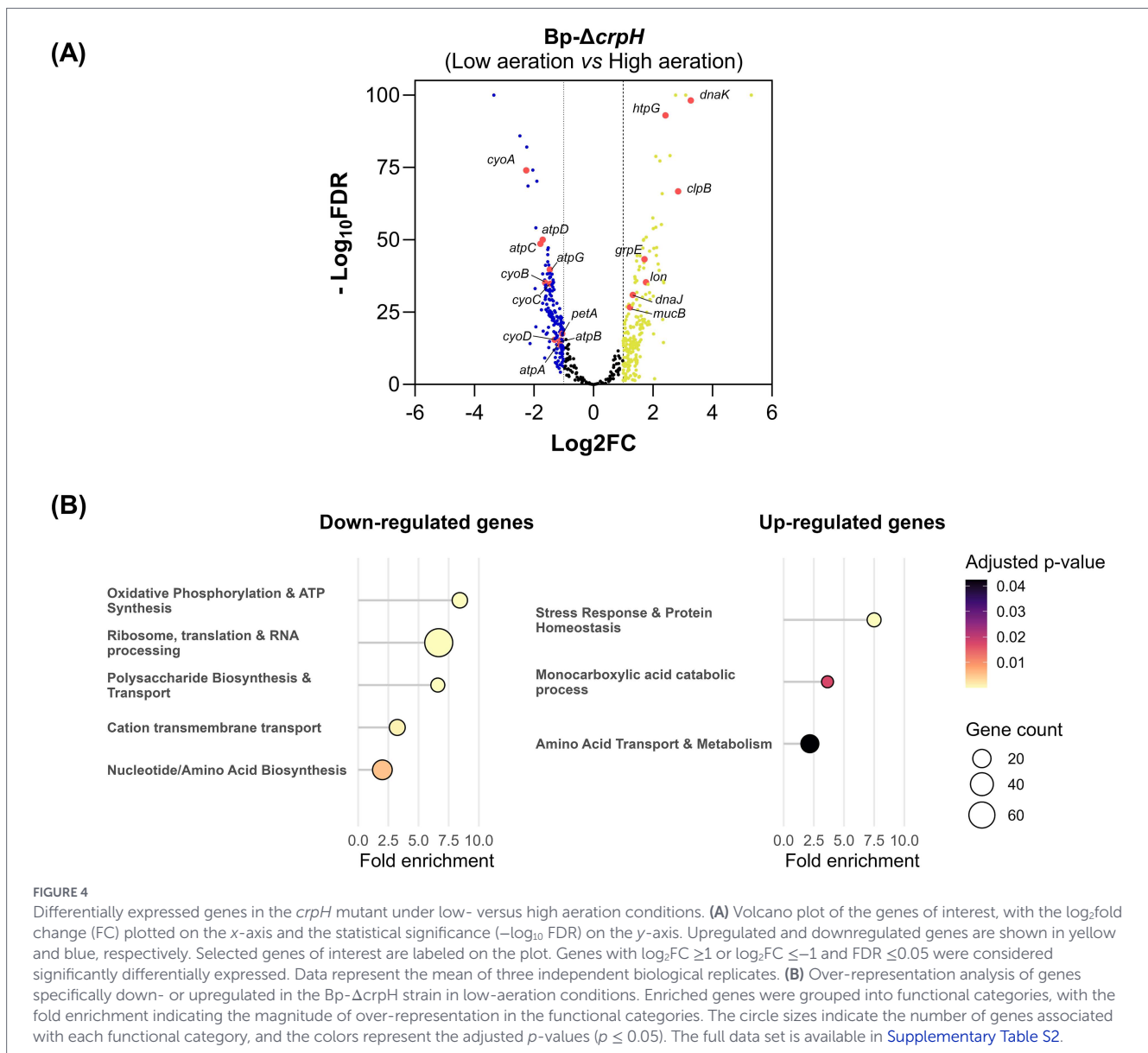
FIGURE 3

Cytochrome c oxidase activity in the *crpH* mutant relative to the WT strain. WT and *Bp-crpH_{ko}* were grown under high-aeration conditions to late-log phase in the presence of 2 μ M CuSO_4 (A). To assess if aa_3 -Cox accumulation over the duration of the culture or the presence of CuSO_4 might mask the effect of *crpH* inactivation, the activity was also measured in early-log phase without added copper in high-aeration conditions (B), and in late-log phase without added copper in low-aeration conditions (C). The cytochrome c oxidase activities were normalized to the optical density of the cultures at 600 nm. Data are shown as mean \pm SD of four biological replicates. Statistical significance was determined using a non-parametric permutation-based ANOVA (* $p < 0.05$).

the transcriptomes of the WT strain in the same conditions as references (Supplementary Table S2). The culture conditions markedly affected gene expression in both strains, and the mutant displayed a larger number of differentially expressed genes than the WT strain, indicating that *crpH* inactivation impacts the *B. pertussis* transcriptome.

We found 214 genes expressed at lower level ($\log_2\text{FC} \leq -1$) under low-aeration conditions in *Bp- Δ crpH* compared to 104 in the WT strain, and 390 genes expressed at higher levels ($\log_2\text{FC} \geq 1$) under low-aeration conditions in the mutant strain compared to 243 in its parent. After removing genes that vary in the same direction in both strains and thus reflect culture conditions, we analyzed the genes with a specific regulation status in the mutant in low-aeration conditions

(Figure 4A). Among these, *cyoA*, *cyoB*, *cyoC* and *cyoD* encoding the bo-Qox complex, and *atpA*, *atpB*, *atpC*, *atpG*, and *atpD*, encoding subunits of the ATP synthase complex, were downregulated in the mutant only. Conversely, several chaperone and protease genes (*dnaK*, *dnaJ*, *hptG*, *clpB*, *grpE*, *lon*, *mucD*) were up-regulated. An over-representation analysis was performed to define the major functional pathways impacted by *crpH* inactivation (Figure 4B). Genes coding for ribosomal components, translation and transcription, polysaccharide, nucleotide and amino acid biosynthesis and transport were enriched among the down-regulated genes, consistent with a slow-down of *B. pertussis* metabolism and growth. Among the upregulated genes, we found genes involved in the stress response as well as genes for the transport and catabolism of amino acids. Thus, according to this



analysis, the absence of CrpH affects the metabolism of *B. pertussis* and generates stress in low-aeration conditions. The impact on *cyo-ABCD* expression suggests that inactivation of *crpH* affects the regulation of respiratory pathways, further supporting a role of CrpH for HCO activity, possibly on bo-Qox.

CrpH contributes to the fitness of *Bordetella pertussis* in the murine respiratory tract

To evaluate the *in vivo* role of CrpH, we tested whether its inactivation influences the ability of the mutant strain to colonize the respiratory tract of mice. We infected mice with the WT or Bp-Δ*crpH* strains or co-infected them with equal numbers of both, and we determined the numbers of bacteria in the noses and lungs of the animals over time. The colonization profiles of the two strains did not significantly differ from one another when they were administered separately (Figure 5A). However, in co-infection experiments, Bp-Δ*crpH* exhibited a reduced capacity to persist and replicate compared to the WT parent, indicating that expression of this gene confers a

competitive advantage *in vivo* (Figure 5B; Supplementary Figure S4). Thus, CrpH promotes the adaptation of *B. pertussis* to host conditions and to its replication and persistence in the respiratory tract, most likely because it indirectly contributes to respiration. Of note, similar results were obtained for the *crtA* mutant (Hachmi et al., 2026), consistent with the two genes being involved in the same pathway.

CrpH is the prototype of a PepSY_TM subfamily

To identify CrpH orthologs, we collected all proteins that respond to the PepSY_TM Pfam signature in the NCBI database (>195,000 proteins), reduced sequence redundancy to 80% (>41,000 proteins) and performed a sequence similarity network (SSN) analysis. This revealed that the PepSY_TM superfamily is extremely diverse. CrpH belongs to a large sequence cluster of >3,000 members distinct from those of FoxB and other PepSY_TM proteins, namely FhuB, FsrB, FpvG and HiuB (Hussein et al., 2024; Josts et al., 2021; Ong and O'Brian, 2023; Ganne et al., 2017; Hernandez-Ortiz et al., 2026)

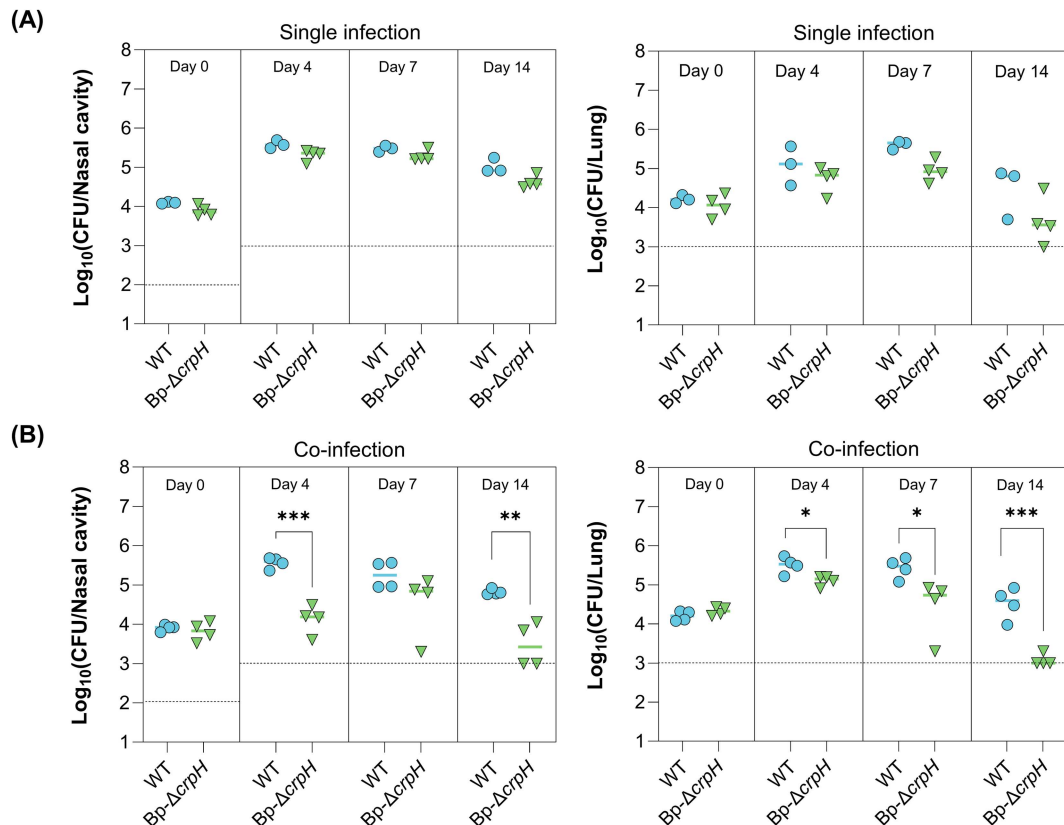


FIGURE 5

Role of CrpH in a murine infection model. (A) Bacterial loads were quantified in the nasal cavities (left panel) and lungs (right panel) following single infection with either WT *B. pertussis* or Bp-ΔcrpH. (B) Bacterial colonization was also assessed in the nasal cavities (left panel) and lungs (right panel) of mice co-infected with both strains. Each point represents an individual mouse, and the dashed lines indicate the limits of detection. Statistical significance was determined using a non-parametric permutation-based ANOVA followed by Cohen's *d* test. In nasal co-infection, significant differences were observed at J4 ($p = 0.000351$, $d = 5.12$, 95% CI 4.03–16.7) and J14 ($p = 0.00299$, $d = 3.40$, 95% CI 2.77–39.7). In lung co-infection, significant differences were observed at J4 ($p = 0.0198$, $d = 2.23$, 95% CI 1.30–7.24), J7 ($p = 0.0464$, $d = 1.77$, 95% CI 1.39–7.92), and J14 ($p = 0.000552$, $d = 4.71$, 95% CI 3.37–17.4).

(Figure 6A). We generated AF3 models of CrpH and the latter four proteins, as well as of proteins of related families, VciB (Peng and Payne, 2017) and FrcB (Small and O'Brian, 2011) and compared them with the X-ray structure of FoxB (Figure 6B; Supplementary Figure S5). All proteins have at least four predicted TM segments and large periplasmic domains forming a vast cavity. His residues are found in CrpH at similar positions as the functionally essential heme-binding His residues of FoxB, suggesting a similar activity. Interestingly, several eukaryotic metal reductases have related architectures with heme groups in the membrane region for extra-cytoplasmic catalysis (Hassett and Kosman, 1995; Ohgami et al., 2006) (Supplementary Figure S5).

To further characterize the CrpH orthologs we collected the PepSY_{TM} proteins found in operons with CrtA^{Bp} orthologs (Hachmi et al., 2026), that all belong to the CrpH sequence cluster. We performed sequence alignment of these proteins and built a Weblogo (Supplementary Figure S6). Conservation among CrpH orthologs is mostly confined to the peri- and trans-membrane regions, indicating very diverse substrate-binding periplasmic cavities (Supplementary Figure S6).

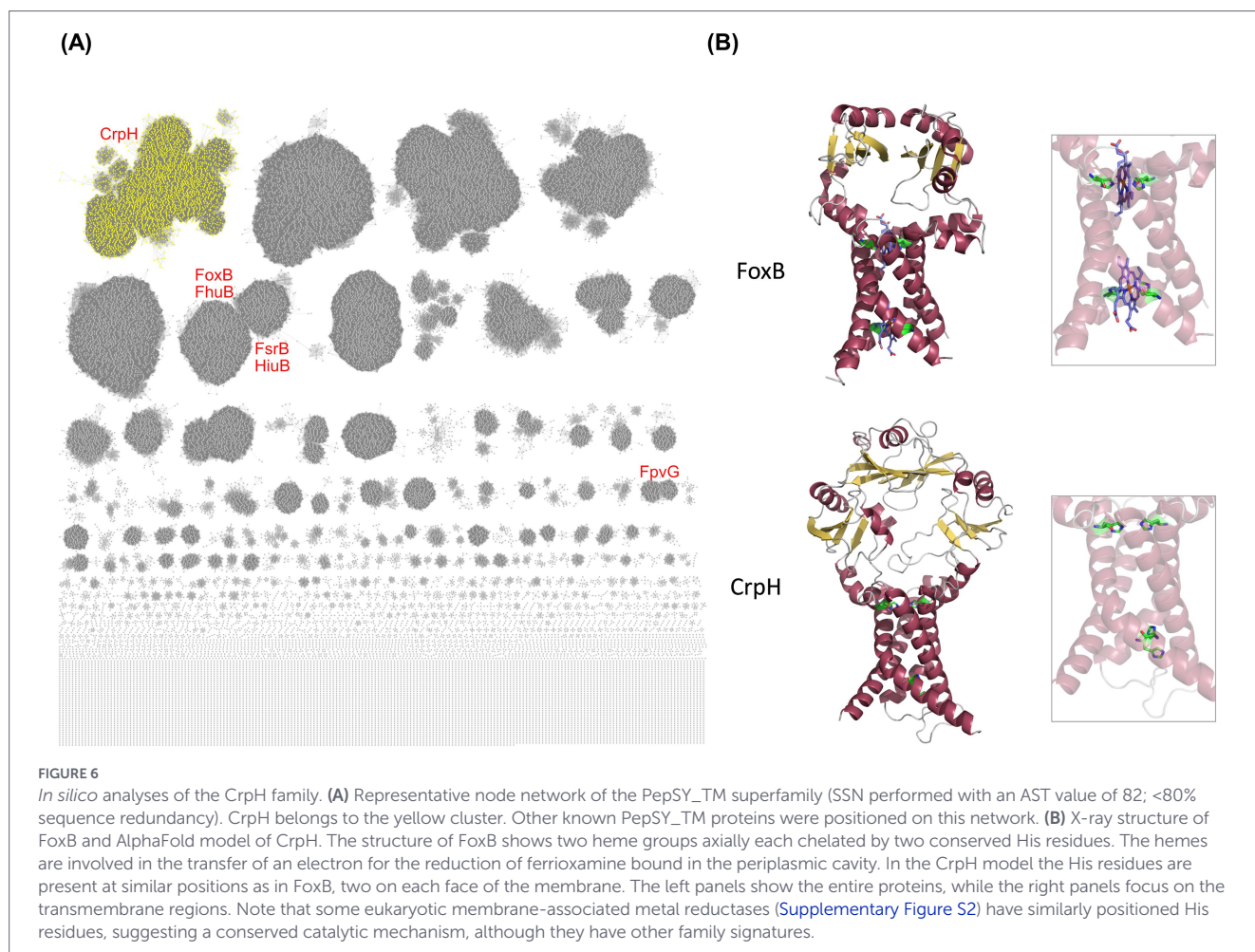
To investigate if CrpH orthologs might be generally related to aerobic respiration, we analyzed >40,000 fully sequenced bacterial genomes for the co-occurrence of *crpH* orthologs with genes coding for copper-related proteins (Supplementary Table S3). The majority of

bacteria encoding putative CrpH orthologs also encode HCO complexes and orthologs of ScoI, a copper chaperone involved in HCO assembly (Canonica et al., 2019), whereas the co-occurrence of *crpH* genes with genes coding for proteins involved in respiration on nitrogen species is much lower (Supplementary Table S4).

Collectively, our *in silico* analyses revealed that CrpH is distinct from previously reported bacterial PepSY_{TM} proteins. We identified thousands of putative orthologs in various bacteria. CrpH orthologs harbor invariant His residues like PepSY_{TM}-type ferrireductases, suggesting that they might have an analogous activity. They are found in the genomes of bacteria that all harbor one or several clusters of HCO-coding genes for aerobic respiration. Together with our wet-lab data, these elements suggest that these proteins might reduce copper to support HCO function. The periplasmic cavity of CrpH orthologs is poorly conserved, indicating that they are unlikely to all have the same substrates.

Functional investigation of CrpH

We tried to produce CrpH as a recombinant protein in *Escherichia coli* to test its function *in vitro*. Unfortunately, all attempts were unsuccessful, irrespective of the expression system, culture medium or temperature. In a few instances a faint protein band at the expected size for CrpH was detected by immunoblotting (Supplementary Figure S7),



but production could not be scaled up for extraction and purification. We also detected a faint protein band in *B. pertussis* extracts between 100 and 150 kDa, suggesting that CrpH forms a homodimer or a complex with another protein in the native host (Supplementary Figure S7). Overproduction could not be achieved in *B. pertussis* either. Thus, CrpH appears to be expressed at very low level and/or to be quickly degraded. It might be detrimental in excess, accounting for its tightly regulated expression.

We asked whether the invariant His residues of CrpH are required for its function. Those predicted to be on the periplasmic side of the transmembrane helices (Figure 6B) were both substituted with Ala residues. The effect of these replacements was evaluated by determining the growth phenotype of the recombinant strain, Bp-*crpH*_{H200A-H444A}, compared to the WT and Bp- Δ *crpH* strains. Bp-*crpH*_{H200A-H444A} exhibited a similar growth defect as Bp- Δ *crpH*, supporting the functional importance of these His residues (Figure 7A). The mutant protein from *B. pertussis* membrane extracts migrated at the same place as its native counterpart, suggesting that it was correctly assembled (Supplementary Figure S7).

FoxB and its HiuB ortholog in *Caulobacter vibrioides* are encoded next to TBDTs that import ferrioxamine, which then serves as the substrate of these two enzymes. We reasoned that if similarly, the Cu-chelate complex imported by CrtA^{Bp} is the CrpH substrate, inactivation of either gene should have similar effects. Note that the copper complex(es) imported by CrtA *in vivo* have not been identified, but in laboratory conditions, CrtA^{Bp} transports Cu(II) chelated by small

carboxylate-rich organic molecules (Hachmi et al., 2026). However, Bp- Δ *crtA* displayed a growth profile indistinguishable from that of the parental strain in low-aeration conditions, unlike Bp- Δ *crpH* (Figure 7B). This indicated a probable redundancy in Cu import (Hachmi et al., 2026) and also that CrpH can function independently of the CrtA-imported copper complex.

Partial functional overlap of *crpH* and *ccoG*

To test in a different way the hypothesis that CrpH might be a copper reductase, we attempted to inactivate the gene coding for an unrelated putative copper reductase involved in HCO assembly in other bacteria. Thus, in *Rhodobacter capsulatus*, the membrane-associated protein CcoG reduces Cu(II) in the cytoplasm before Cu(I) export and delivery to periplasmic chaperones for incorporation into the HCO cbb3-Cox complex (Marckmann et al., 2019). CcoG orthologs are also found in non-cbb3-producing bacteria. In *B. pertussis* the *ccoG* ortholog, *bp2173*, is next to the *ccoNOQP* operon (*bp2169-72*) which codes for a non-functional cbb3-Cox, since *ccoN* is a pseudogene. Knocking *ccoG* out was easily achieved in the WT strain but extremely difficult in Bp- Δ *crpH*, with a single clone obtained after several attempts. The Bp-(*crpHccoG*)_{KO} strain showed a strong aggregation phenotype in aerated cultures performed in flasks or tubes (Figure 8A). Nevertheless, its growth was only mildly affected in high-aeration cultures in plates, in line with a major role of bd-Qox in these conditions (Figure 8B). In low-aeration conditions, however,

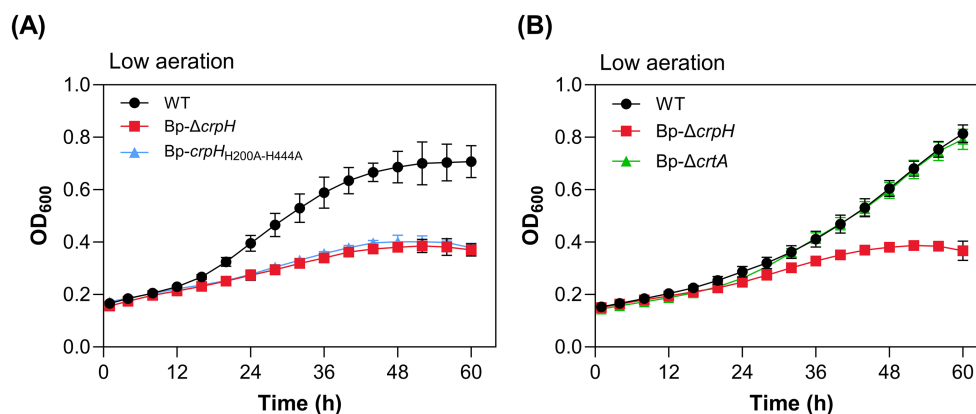


FIGURE 7

Functional characterization of CrpH. (A) Growth curves of WT, Bp-ΔcrpH, and Bp-ΔcrpH_{H200A-H444A} under low-aeration conditions in medium supplemented with 2 μM CuSO₄. (B) WT, Bp-ΔcrpH, and Bp-ΔcrtA were grown under low-aeration conditions in medium supplemented with 500 μM Trien to induce copper limitation. The Bp-ΔcrtA_{KO} strain does not phenocopy Bp-ΔcrpH, indicating that CrpH does not depend on the Cu complex imported by CrtA.

Bp-(*crpHccoG*)_{KO} failed to grow even with copper supplementation, while the single *ccoG* mutant showed a milder growth defect (Figure 8B). This synthetic growth phenotype supports to notion that the two proteins represent parallel yet non-redundant pathways that support HCO-mediated respiration.

Discussion

In this work we describe the prototype of a new subfamily of PepSY_{TM} proteins. Together with the copper regulation of the CrpH-coding operon in *B. pertussis* and the presence of *crtA*, a TonB-dependent copper transporter gene in the same operon (Hachmi et al., 2026; Roy et al., 2022), our data indicate that CrpH is related with copper, unlike other known PepSY_{TM} enzymes. *In silico* analyses showed that CrpH and its orthologs belong to a specific sequence cluster of PepSY_{TM} proteins and are found in various bacteria that all harbor HCO-coding operons. We speculate that it might be a copper reductase, but further investigations will be required to confirm this hypothesis.

Transition metals play dual roles at the host-pathogen interface (Murdoch and Skaar, 2022; Sheldon and Skaar, 2019), but the notion that mammals also use copper nutritional stress as an antimicrobial tool is rather recent (Besold et al., 2018; Buglino et al., 2025). For *B. pertussis*, the reduced competitiveness of the *crtA* mutant in mice suggests that this bacterium might similarly experience copper scarcity in the course of infection (Hachmi et al., 2026). The deployment of copper provision pathways for specific client proteins, such as HCOs in aerobic bacteria or methane monooxygenase in methanotrophs, may be an emerging theme in bacteria (Khalfaoui-Hassani et al., 2023; Khalfaoui-Hassani et al., 2018; Buglino et al., 2025; Dassama et al., 2016). In contrast, our *in vitro* results showed that CrpH is necessary for optimal growth in low aeration conditions even when copper is available, indicative of a role in copper utilization rather than acquisition. *B. pertussis* respire exclusively on molecular oxygen, and its HCO complexes, in particular bo-Qox, are important in murine models of infection (McKay et al., 2024; Gonyar et al., 2019). The role of CrpH for growth in the absence of

the copper-independent respiratory oxidase bd-Qox, the decreased ATP levels of the *crpH* KO mutant, the reduced competitiveness of the mutant in mice and the transcriptomic data all support a role for CrpH in handling copper for HCOs in *B. pertussis*. Notably, expression of the *Pseudomonas aeruginosa* CprH ortholog (Uniprot Q9I682) is extinguished by the presence of endogenously produced hydrogen cyanide, an HCO poison, suggesting a similar link between CrpH and HCO complexes in that species (Frangipani et al., 2014).

Respiratory complexes widely vary between bacterial species depending on their physiology and their environment, and their assembly routes are also very diverse (Hederstedt, 2022; Llases et al., 2019). Insertion of Cu(I) and Cu(II) in the electron-accepting Cu_A center of aa3-Cox is mediated by the copper chaperones PCu_AC and ScoI in several species, following reduction of the Cu_A site's Cys residues by periplasmic thioredoxins (Canonica et al., 2019; Abicht et al., 2014; Abriata et al., 2008). Insertion of Cu(I) in the O₂-reducing Cu_B center of aa3-Cox is mediated by other copper chaperones (Hederstedt, 2022). Copper insertion in the Cu_B site of cbb3-Cox in the model organism *R. capsulatus* successively involves Cu(II) import in the cytoplasm by the MFS transporter CcoA, reduction by CcoG, re-export of Cu(I) by the P_{1B}-type ATPase CcoI, and finally action of periplasmic copper chaperones (Khalifaoui-Hassani et al., 2018; Marckmann et al., 2019; Trasnea et al., 2018). Little is known regarding the assembly of the Cu_B site in bo-Qox except that it involves an MFS copper importer in *E. coli* (Khalifaoui-Hassani et al., 2023). *B. pertussis* harbors genes coding for several of the above proteins, but their functions in the assembly of its HCO complexes have not been characterized.

The growth phenotypes of *crpH* mutants, the synthetic phenotype of the double *crpH-ccoG* mutant, the conserved metal reductase activity in the PepSY_{TM} family and the functional importance of CrpH's invariant His residues lead us to speculate that CrpH might be a periplasmic copper reductase supporting HCO function. Several membrane-associated metal reductases of other Pfam families in eukaryotes and prokaryotes are functionally and structurally related to PepSY_{TM} proteins. They reduce Fe, and also Cu for some of them, at the extracytoplasmic side of the plasma membrane using heme groups for catalysis (Ohgami et al., 2006; Cain and Smith, 2021; Wyman et al.,

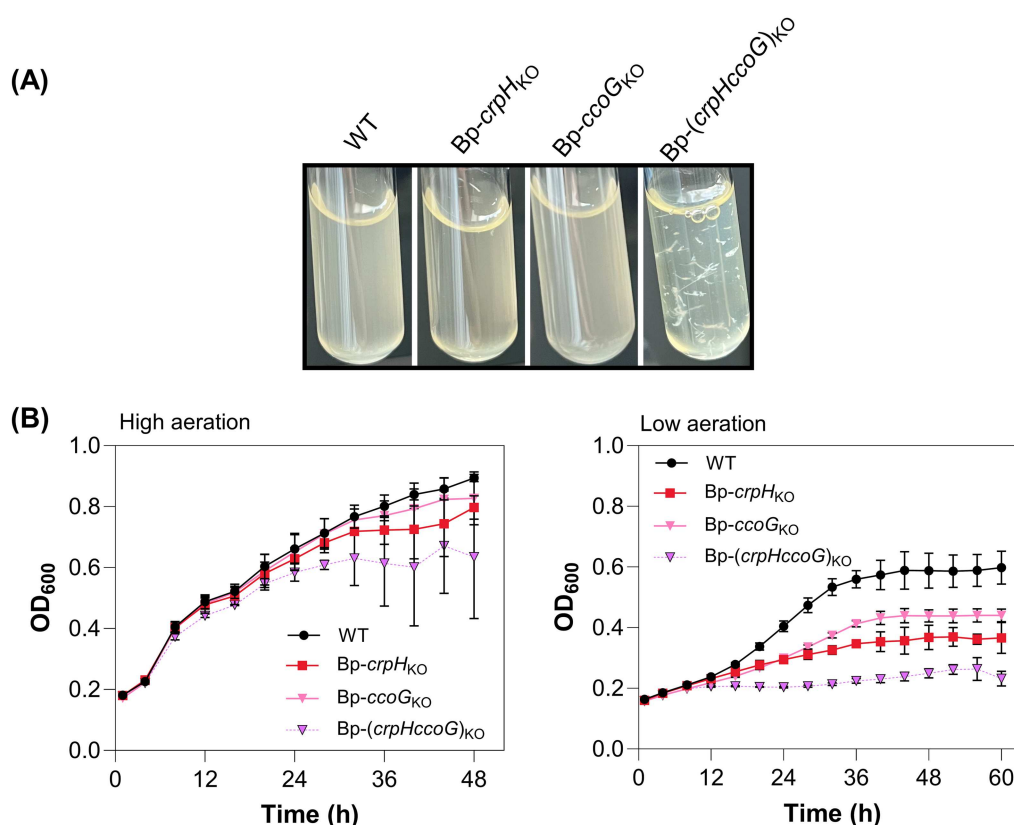


FIGURE 8

Effect of *ccoG* inactivation. *CcoG* is a putative cytoplasmic Cu(II) reductase. **(A)** Aggregation phenotype of Bp-(*crpHccoG*)_{KO} in high-aeration conditions in tubes. **(B)** WT, Bp-*crpH*_{KO}, Bp-(*ccoG*)_{KO}, and Bp-(*crpHccoG*)_{KO} were grown under high- (left panel) or low-aeration conditions (right panel) in 96-well plates in medium supplemented with 2 μ M CuSO₄. Data are representative of three biological replicates and correspond to the mean \pm SD of three technical replicates.

2008). Thus, extracytoplasmic reduction of nutrient metals appears to be a widespread strategy.

CrpH comprises a large periplasmic cavity. In other PepSY_TM proteins, this cavity is used for substrate binding. However, CrpH activity appears to be independent of the copper complex imported by the co-regulated TBDT CrtA, and therefore its substrate(s) remains to be determined. The non-conserved periplasmic cavity among CrpH orthologs suggests the possibility of different partners across bacterial species. Of note, the reductase FsrB, which belongs to a different sequence cluster than CrpH, was shown to have a variety of Fe-siderophore substrates, suggesting that PepSY_TM proteins might not be highly selective (Ong and O'Brian, 2023).

The copper site(s) that rely on CrpH remain to be determined. The extremely severe growth phenotypes of the *crpHctaCDFGE* (aa3-Cox) and *crpHcyoABCD* (bo-Qox) mutants did not allow to draw firm conclusions, but they nevertheless indicated that both aa3-Cox and bo-Qox activities might be impacted by the absence of CrpH. However, the *crpH* mutant strain displayed aa3-Cox activity, suggesting that CrpH might have a minor role toward this complex. Transcriptomics analyses indicated that the absence of *crpH* affects *cyoABCD* expression. Of note, the latter genes are part of a large "copper locus" notably encompassing *cruR*, *crtA* and a bufferin operon (Leprevost et al., 2024). Altogether, thus, bo-Qox is a good client candidate for CrpH-mediated copper provision.

The bd-Qox and bo-Qox complexes of *B. pertussis* were predicted to have high- and low affinity for molecular oxygen, respectively.

However, our results indicated that bd-Qox is important in high-aeration culture conditions. In some bacteria, bd-Qox provides protection from oxidative stressors likely more abundant in strongly aerated cultures, which would be consistent with our findings (Borisov et al., 2025; Xia et al., 2018). In contrast, the bo-Qox complex of *B. pertussis* was found here to be necessary in low-aeration conditions. Such an adaptation is not unprecedented, as the bo-Qox complex *Rhizobium etli* was reported to be utilized in low-oxygenation conditions (Lunak and Noel, 2015). Altogether thus, it is likely that the respiratory complexes have adapted to the specific niches of each species.

Unlike FoxB, CrpH could not be produced in recombinant form in *E. coli*, it was detected at very low level in *B. pertussis*, and attempts to overexpress *crpH* in *B. pertussis* were unsuccessful. We speculate that this may be related to its enzymatic function. The strict negative regulation of the operon by copper most likely evolved to limit the production of CrpH, possibly because of the danger of an imbalance to the periplasmic Cu(I)/Cu(II) ratio.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary material.

Ethics statement

The animal study was approved by Ethical Committees of the Region Nord-Pas-de-Calais and the Ministry of Research under the Agreement Number APAFIS #51236-2024041114331031 v7. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

MH: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. GR: Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing. A-SD: Investigation, Methodology, Writing – original draft. SS: Investigation, Methodology, Writing – original draft. RA: Conceptualization, Investigation, Visualization, Writing – review & editing. FJ-D: Conceptualization, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration.

Funding

The author(s) declared that financial support was received for this work and/or its publication. This work was funded by the Institut de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Lille University.

Acknowledgments

The authors thank Stephane Cauchi and Dacine Osmani for help with statistics, Loic Coutte for help in animal experiments, and Zainab Edoou and Line Hofmann for help with the Ensignt measurements. MH was supported by a doctoral fellowship from Lille University.

References

- Abicht, H. K., Scharer, M. A., Quade, N., Ledermann, R., Mohorko, E., Capitani, G., et al. (2014). How periplasmic thioredoxin TlpA reduces bacterial copper chaperone ScoI and cytochrome oxidase subunit II (CoxB) prior to metallation. *J. Biol. Chem.* 289, 32431–32444. doi: 10.1074/jbc.M114.607127
- Abriata, L. A., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gkazonis, P., Spyroulias, G. A., et al. (2008). Mechanism of Cu_A assembly. *Nat. Chem. Biol.* 4, 599–601. doi: 10.1038/nchembio.110
- Andrei, A., Ozturk, Y., Khalfauoui-Hassani, B., Rauch, J., Marckmann, D., Trasnea, P. I., et al. (2020). Cu homeostasis in bacteria: the ins and outs. *Membranes* 10:242. doi: 10.3390/membranes10090242
- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., et al. (2000). New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 182, 5902–5905. doi: 10.1128/jb.182.20.5902-5905.2000
- Antoine, R., Leprevost, L., Junger, S., Zirah, S., Lippens, G., Li, Y., et al. (2025). Multinuclear non-haem iron-dependent oxidative enzymes: landscape of their substrates, partner proteins and biosynthetic gene clusters. *Microb. Genom.* 11:001462. doi: 10.1099/mgen.0.001462
- Belcher, T., Dubois, V., Rivera-Millot, A., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2021). Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence* 12, 2608–2632. doi: 10.1080/21505594.2021.1980987
- Besold, A. N., Gilston, B. A., Radin, J. N., Ramsoomair, C., Culbertson, E. M., Li, C. X., et al. (2018). Role of calprotectin in withholding zinc and copper from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 86:e00779-17. doi: 10.1128/IAI.00779-17

Conflict of interest

The author(s) declared that this work was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor M-JV declared a shared parent affiliation with the authors at the time of review.

Generative AI statement

The author(s) declared that Generative AI was not used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2026.1786092/full#supplementary-material>

- Bhamidimarri, S. P., Young, T. R., Shanmugam, M., Soderholm, S., Basle, A., Bumann, D., et al. (2021). Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *PLoS Biol.* 19:e3001446. doi: 10.1371/journal.pbio.3001446
- Borisov, V. B., Giardina, G., Pistoia, G., and Forte, E. (2025). Cytochrome bd-type oxidases and environmental stressors in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 86, 199–255. doi: 10.1016/bs.ampbs.2024.05.001
- Buglino, J. A., Ozakman, Y., Hatch, C. E., Benjamin, A., Tan, D. S., and Glickman, M. S. (2025). Chalkophore-mediated respiratory oxidase flexibility controls *M. tuberculosis* virulence. *eLife* 14:RP105794. doi: 10.7554/eLife.105794
- Buglino, J. A., Ozakman, Y., Xu, Y., Chowdhury, F., Tan, D. S., and Glickman, M. S. (2022). Diisonitrile lipopeptides mediate resistance to copper starvation in pathogenic mycobacteria. *mBio* 13:e0251322. doi: 10.1128/mbio.02513-22
- Cain, T. J., and Smith, A. T. (2021). Ferric iron reductases and their contribution to unicellular ferrous iron uptake. *J. Inorg. Biochem.* 218:111407. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111407
- Canonica, F., Klose, D., Ledermann, R., Sauer, M. M., Abicht, H. K., Quade, N., et al. (2019). Structural basis and mechanism for metallochaperone-assisted assembly of the Cu_A center in cytochrome oxidase. *Sci. Adv.* 5:eaaw8478. doi: 10.1126/sciadv.aaw8478
- Chandrangu, P., Rensing, C., and Helmman, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 338–350. doi: 10.1038/nrmicro.2017.15
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004

- Dassama, L. M., Kenney, G. E., Ro, S. Y., Zielazinski, E. L., and Rosenzweig, A. C. (2016). Methanobactin transport machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 13027–13032. doi: 10.1073/pnas.1603578113
- Frangipani, E., Perez-Martinez, I., Williams, H. D., Cherbuin, G., and Haas, D. (2014). A novel cyanide-inducible gene cluster helps protect *Pseudomonas aeruginosa* from cyanide. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 28–34. doi: 10.1111/1758-2229.12105
- Fu, Y., Chang, F. M., and Giedroc, D. P. (2014). Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc. Chem. Res.* 47, 3605–3613. doi: 10.1021/ar500300n
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., et al. (2017). Iron release from the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves three new actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem. Biol.* 12, 1056–1065. doi: 10.1021/acscchembio.6b01077
- Gonyar, L. A., Gelbach, P. E., McDuffie, D. G., Koeppel, A. F., Chen, Q., Lee, G., et al. (2019). *In vivo* gene essentiality and metabolism in *Bordetella pertussis*. *mSphere* 4:e00694-18. doi: 10.1128/mSphere.00694-18
- Hachmi, M., Mirgaux, M., Wintjens, R., Carassus, C., Arnoux, P., Roy, G., et al. (2026). A new family of TonB-dependent copper transporters linked to respiratory oxidase function. *J. Biol. Chem.* 302:111180. doi: 10.1016/j.jbc.2026.111180
- Hassett, R., and Kosman, D. J. (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 128–134. doi: 10.1074/jbc.270.1.128
- Hederstedt, L. (2022). Diversity of cytochrome c oxidase assembly proteins in bacteria. *Microorganisms* 10:926. doi: 10.3390/microorganisms10050926
- Helmann, J. D. (2025a). Microbial metal physiology: ions to ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 23, 805–819. doi: 10.1038/s41579-025-01213-7
- Helmann, J. D. (2025b). Metals in motion: understanding labile metal pools in bacteria. *Biochemistry* 64, 329–345. doi: 10.1021/acs.biochem.4c00726
- Hernandez-Ortiz, S., Fiebig, A., and Crosson, S. (2026). The hiuABC operon mediates xenosiderophore utilization in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* e0040025. doi: 10.1128/jb.00400-25
- Hussein, S. M., Sofoluwe, A., Paleja, A., Duhme-Klair, A., and Thomas, M. S. (2024). Identification of a system for hydroxamate xenosiderophore-mediated iron transport in *Burkholderia cenocepacia*. *Microbiology* 170:001425. doi: 10.1099/mic.0.001425
- Johnson, B. K., Scholz, M. B., Teal, T. K., and Abramovitch, R. B. (2016). SPARTA: simple program for automated reference-based bacterial RNA-seq transcriptome analysis. *BMC Bioinformatics* 17:66. doi: 10.1186/s12859-016-0923-y
- Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I. J., and Tidow, H. (2021). Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118:e2101952118. doi: 10.1073/pnas.2101952118
- Kaila, V. R. I., and Wikstrom, M. (2021). Architecture of bacterial respiratory chains. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 319–330. doi: 10.1038/s41579-020-00486-4
- Kenney, G. E., and Rosenzweig, A. C. (2018). Methanobactins: maintaining copper homeostasis in methanotrophs and beyond. *J. Biol. Chem.* 293, 4606–4615. doi: 10.1074/jbc.TM117.000185
- Khalifaoui-Hassani, B., Blaby-Haas, C. E., Verissimo, A., and Daldal, F. (2023). The *Escherichia coli* MFS-type transporter genes yhjE, ydiM, and yfcJ are required to produce an active bo3 quinol oxidase. *PLoS One* 18:e0293015. doi: 10.1371/journal.pone.0293015
- Khalifaoui-Hassani, B., Wu, H., Blaby-Haas, C. E., Zhang, Y., Sandri, F., Verissimo, A. E., et al. (2018). Widespread distribution and functional specificity of the copper importer CcoA: distinct cu uptake routes for bacterial cytochrome c oxidases. *mBio* 9:e00065-18. doi: 10.1128/mBio.00065-18
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., et al. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* 12, 291–299. doi: 10.1093/dnares/dsi012
- Koh, E. I., Robinson, A. E., Bandara, N., Rogers, B. E., and Henderson, J. P. (2017). Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat. Chem. Biol.* 13, 1016–1021. doi: 10.1038/nchembio.2441
- Leprevost, L., Junger, S., Lippens, G., Guillaume, C., Sicoli, G., Oliveira, L., et al. (2024). A widespread family of ribosomal peptide metallophores involved in bacterial adaptation to metal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121:e2408304121. doi: 10.1073/pnas.2408304121
- Llases, M. E., Morgada, M. N., and Vila, A. J. (2019). Biochemistry of copper site assembly in heme-copper oxidases: a theme with variations. *Int. J. Mol. Sci.* 20:3830. doi: 10.3390/ijms20153830
- Lunak, Z. R., and Noel, K. D. (2015). A quinol oxidase, encoded by cyoABCD, is utilized to adapt to lower O₂ concentrations in *Rhizobium etli* CFN42. *Microbiology* 161, 203–212. doi: 10.1099/mic.0.083386-0
- Marckmann, D., Trasnea, P. I., Schimpf, J., Winterstein, C., Andrei, A., Schmollinger, S., et al. (2019). The *cbb₃*-type cytochrome oxidase assembly factor CcoG is a widely distributed cupric reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 21166–21175. doi: 10.1073/pnas.1913803116
- McKay, L. S., Spandrio, A. R., Johnson, R. M., Sobran, M. A., Marlatt, S. A., Mote, K. B., et al. (2024). Cytochrome oxidase requirements in *Bordetella* reveal insights into evolution towards life in the mammalian respiratory tract. *PLoS Pathog.* 20:e1012084. doi: 10.1371/journal.ppat.1012084
- Murdoch, C. C., and Skaar, E. P. (2022). Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 657–670. doi: 10.1038/s41579-022-00745-6
- Oberg, N., Zallot, R., and Gerlt, J. A. (2023). EFI-EST, EFI-GNT, and EFI-CGFP: enzyme function initiative (EFI) web resource for genomic enzymology tools. *J. Mol. Biol.* 435:168018. doi: 10.1016/j.jmb.2023.168018
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., and Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108, 1388–1394. doi: 10.1182/blood-2006-02-003681
- Ong, A., and O'Brian, M. R. (2023). The *Bradyrhizobium japonicum* fcrB gene is essential for utilization of structurally diverse ferric siderophores to fulfill its nutritional iron requirement. *Mol. Microbiol.* 119, 340–349. doi: 10.1111/mmi.15028
- Peng, E. D., and Payne, S. M. (2017). *Vibrio cholerae* VciB mediates iron reduction. *J. Bacteriol.* 199:e00874-16. doi: 10.1128/JB.00874-16
- Rivera-Millot, A., Slupek, S., Chatagnon, J., Roy, G., Saliou, J.-M., Billon, G., et al. (2021). Streamlined copper defenses make *Bordetella pertussis* reliant on custom-made operon. *Commun. Biol.* 4:46. doi: 10.1038/s42003-020-01580-2
- Roy, G., Antoine, R., Schwartz, A., Slupek, S., Rivera-Millot, A., Boudvillain, M., et al. (2022). Posttranscriptional regulation by copper with a new upstream open reading frame. *mBio* 13:e0091222. doi: 10.1128/mbio.00912-22
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Sheldon, J. R., and Skaar, E. P. (2019). Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Curr. Opin. Immunol.* 60, 1–9. doi: 10.1016/j.coi.2019.04.002
- Small, S. K., and O'Brian, M. R. (2011). The *Bradyrhizobium japonicum* frcB gene encodes a diheme ferric reductase. *J. Bacteriol.* 193, 4088–4094. doi: 10.1128/JB.05064-11
- Solans, L., Debie, A. S., Borkner, L., Aguilo, N., Thiriard, A., Coutte, L., et al. (2018). IL-17-dependent SlgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal Immunol.* 11, 1753–1762. doi: 10.1038/s41385-018-0073-9
- Stibitz, S. (1994). Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol.* 235, 458–465. doi: 10.1016/0076-6879(94)35161-9
- Trasnea, P. I., Andrei, A., Marckmann, D., Utz, M., Khalifaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., et al. (2018). A copper relay system involving two periplasmic chaperones drives *cbb₃*-type cytochrome c oxidase biogenesis in *Rhodobacter capsulatus*. *ACS Chem. Biol.* 13, 1388–1397. doi: 10.1021/acscchembio.8b00293
- Wyman, S., Simpson, R. J., McKie, A. T., and Sharp, P. A. (2008). Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase *in vitro*. *FEBS Lett.* 582, 1901–1906. doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.010
- Xia, X., Wu, S., Li, L., Xu, B., and Wang, G. (2018). The cytochrome *bd* complex is essential for chromate and sulfide resistance and is regulated by a GbsR-type regulator, CydE, in *Alishewanella* sp. WH16-1. *Front. Microbiol.* 9:1849. doi: 10.3389/fmicb.2018.01849

Discussion

Le cuivre est un élément essentiel en biologie, car il joue le rôle de cofacteur dans des enzymes importantes. Cependant, il est toxique en excès et les êtres vivants, notamment les bactéries, doivent réguler son homéostasie intracellulaire. De ce fait, divers mécanismes de défense contre l'excès de cuivre ont été caractérisés chez les bactéries (Solioz, 2018).

Notre laboratoire s'est intéressé particulièrement à l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*, une bactérie aérobique pathogène, qui colonise le tractus respiratoire humain. *B. pertussis* a perdu la majorité de ses mécanismes de défense contre le cuivre, probablement en raison de sa niche restreinte (Antoine et al., 2019; Rivera-Millot et al., 2021). Contrairement aux bactéries environnementales, elle n'est pas exposée à un excès de cuivre sauf en cas de phagocytose par les cellules immunitaires. A l'inverse, lors de la colonisation de l'hôte, il est possible qu'elle soit exposée à une carence en cuivre en raison de l'immunité nutritionnelle (Buglino et al., 2025).

L'étude du transcriptome de *B. pertussis* en excès et en limitation en cuivre a permis d'identifier l'opéron *bp2923-bp2922-bp2921 (cruR-crtA-crpH)* dont l'expression est réprimée en excès de cuivre et induite en carence (Rivera-Millot et al., 2021). Cette régulation spécifique au cuivre est assurée par la protéine codée par *bp2923* qui a été appelé CruR (copper responsive upstream regulator) (Roy et al., 2022).

La régulation de cet opéron suggère un rôle dans l'acquisition de cuivre chez *B. pertussis*. Les systèmes d'importation de cuivre sont très peu connus. A ce jour il existe un seul TBDT à cuivre dont la structure a été caractérisée, OprC, un transporteur d'ions cuivre nus chez *P. aeruginosa* (Bhamidimarri et al., 2021). L'objectif de cette thèse était de caractériser les protéines codées par *crtA* et *crpH* et d'étudier leur rôle chez *B. pertussis* en lien avec le métabolisme de cuivre. Nos travaux ont montré que la protéine précédemment appelée BfrG est un transporteur TonB-dépendent de cuivre, que nous avons renommé CrtA^{Bp} (copper-responsive transporter A of *B. pertussis*). Sa structure a été caractérisée, ce qui a permis d'identifier le site de fixation du cuivre complexé à un ligand. Nos résultats suggèrent que le ligand contient des groupements carboxylates. Pour CrpH, une protéine de la famille PepSY_TM, nous avons montré un rôle pour l'activité des HCOs. Nous avons mis en évidence que ces complexes sont nécessaires pour une respiration efficace de *B. pertussis* en condition de faible aération. Nos résultats suggèrent que CrpH pourrait être une réductase de Cu(II) en Cu(I).

Dans les conditions de culture *in vitro*, l'importance de CrtA pour la croissance de *B. pertussis* ne s'est révélée que dans des conditions bien définies : en situation de limitation en cuivre et en absence de bd-Qox, la cytochrome oxydase indépendante du cuivre. Cela a montré indirectement que le cuivre importé par CrtA sert à alimenter les HCOs.

CrtA est donc conditionnellement importante pour *B. pertussis*. Ces conditions de culture pourraient refléter ce qui se passe *in vivo* dans certaines phases ou dans certaines niches lors de l'infection. Suite à l'entrée de *B. pertussis* dans le nez et la colonisation du nasopharynx jusqu'à celle de la trachée et des bronches, *B. pertussis* passe par des microenvironnements variés, où elle est vraisemblablement exposée à différents niveaux d'oxygène. Elle infecte spécifiquement l'épithélium respiratoire cilié. Dans cet épithélium, certaines cellules produisent une couche de mucus qui limite la diffusion de l'oxygène. En plus, lors de la formation de biofilms, les bactéries situées dans les couches intérieures auraient une moins bonne oxygénation, tout comme les bactéries intracellulaires. Une déplétion locale en oxygène peut être induite également lors de la multiplication des pathogènes, à cause de leur propre activité respiratoire (André et al., 2022). Comme les cytochromes oxydases terminales diffèrent par leur affinité envers l'oxygène, les bactéries utilisent vraisemblablement différents complexes selon le microenvironnement. De ce fait, à certains stades de l'infection, l'utilisation des HCOs deviendrait importante pour la bactérie, et dans ces conditions CrtA deviendrait utile.

Il est difficile de déterminer la concentration exacte du cuivre dans le corps humain, car elle varie selon les organes, l'âge des individus et également les techniques de mesure utilisées. Chez l'hôte, diverses formes de cuivre sont retrouvées. Le cuivre peut être complexé à des petites molécules comme les acides aminés (His, Cys, Met, Asp, Tyr, Thr, Gly), des peptides (glutathion, Gly-His-Lys (GHK)), ou des protéines de transport ou stockage : albumine, céruloplasmine, métallothionéine, transcupréine ou d'autres molécules selon les organes concernés. Cela représente le pool dynamique. Le cuivre peut aussi faire partie d'un pool statique, où il est fortement lié à des cuproprotéines, notamment dans des enzymes comme la SOD et les HCOs (Helman et al., 2023; Kardos et al., 2018). Le cuivre libre est presque absent chez l'hôte en raison de sa forte affinité pour diverses molécules organiques. De ce fait, les porines ne seraient vraisemblablement pas capables de satisfaire les besoins de la bactérie en cuivre dans ces conditions. C'est sans doute pour ces raisons que CrtA contribue à la persistance et la survie de *B. pertussis in vivo*, comme nous l'avons montré dans un contexte

de co-infection avec la souche sauvage. Cependant, il n'est pas essentiel (Gonyar et al., 2019), probablement parce que la bd-Qox pourrait assurer la respiration en cas de carence en cuivre, même si elle est moins efficace dans certaines conditions.

La famille de CrtA a été définie par analyse de similarité de séquence. Nous avons identifié 88 orthologues incluant CrtA (PA0434) de *P. aeruginosa*. Cette famille est distincte de tous les autres TBDTs de *B. pertussis*, d'OprC et des autres TBDTs à cuivre comme PcuB, identifié chez *B. japonicum* et qui est codé dans un opéron jouant un rôle dans la respiration (Serventi et al., 2012). Cela suggère que la famille CrtA est une nouvelle famille avec un mécanisme d'action distinct des autres TBDTs.

La structure de CrtA a été caractérisée et un site conservé a été identifié dans une cavité ouverte vers le côté extracellulaire de la protéine. Ce site, avec en particulier une histidine invariante, est important pour le transport de cuivre. Cette histidine pourrait contribuer à la coordination du cuivre. Les autres résidus conservés comme le tryptophane, la tyrosine, l'arginine et la glutamine ne sont pas connus pour lier le cuivre et pourraient donc plutôt jouer un rôle dans la coordination du ligand complexant le cuivre. Le rôle du glutamate 337 invariant semble également être important pour le transport, mais ce résultat doit encore être confirmé. Contrairement à OprC, CrtA ne contient pas l'enchaînement de méthionines qui permet de guider le cuivre jusqu'au site de fixation. Cela est cohérent avec le fait que CrtA n'importe pas le Cu(II) libre, mais le cuivre complexé à un ligand, d'autant plus que le cuivre est rarement retrouvé sous forme libre *in vivo* (Kardos et al., 2018).

Le défaut de croissance de la souche Bp- Δ crtA Δ cydAB observé dans les conditions de laboratoire suggère que le ligand natif de CrtA n'est pas une protéine de l'hôte comme dans le cas des TBDTs qui récupèrent le fer de la transferrine ou de la lactoferrine (C. Chan et al., 2023; Noinaj et al., 2012; Yadav et al., 2019), mais un composé présent dans la culture. Les métallobactines connus chez *B. pertussis*, l'alcaligine et la bufferine, ne sont pas impliqués dans le transport de cuivre selon nos résultats. De plus, nos analyses des génomes codant des orthologues de CrtA n'ont pas permis d'identifier de cluster génétique de biosynthèse de métallobactine qui soit commun à toutes ces espèces. Cependant, cela n'exclut pas la possibilité d'un cluster de biosynthèse d'un métallobactine non encore connu puisque le logiciel utilisé ne repère que les clusters contenant au moins un gène déjà décrit. L'hypothèse la plus plausible est qu'il existe un ou plusieurs composés du milieu de culture qui se comportent comme ligand(s) de CrtA. Le milieu SS est un milieu riche et complexe, qui contient plusieurs composés

capables de lier le cuivre comme l'acide ascorbique, le glutathion et des acides aminés, notamment le glutamate et la cystéine. Le glutamate représente un candidat possible, car il est présent à une très forte concentration dans le milieu (64 mM), comme source de carbone majeure de *B. pertussis*. A cette concentration, nous imaginons que le glutamate pourrait être importé même s'il n'est pas un très bon ligand. Il comporte notamment deux groupements carboxylates pouvant participer à la coordination du cuivre. Néanmoins, ce type d'interaction demeure moins favorable, puisque le cuivre présente une préférence marquée pour des ligands riches en azote ou en soufre. La cystéine est également retrouvée dans le milieu SS et elle pourrait lier le cuivre. Cependant, elle présente plus d'affinité au Cu(I) grâce à son groupement thiol (Rigo et al., 2004), alors que nos résultats suggèrent que CrtA transporte le cuivre oxydé.

Nos résultats ont montré que l'ajout de NTA favorise la croissance de la souche exprimant CrtA. Le NTA n'est pas un composé naturel, et il ne semble pas être utilisé comme source de C ou de N par *B. pertussis*, car l'effet positif est observé uniquement chez des bactéries carencées en cuivre et délétées pour *cydAB*. Nous avons montré qu'il augmente l'importation du cuivre selon les résultats de dosage du cuivre intracellulaire. Ces données suggèrent que le NTA se comporte comme un ligand (non naturel) pour CrtA.

La structure de NTA est très similaire à celle du citrate, qui a été retrouvé dans la cavité de CrtA après cristallisation. Selon les modèles Alphafold3, le complexe Cu-NTA se positionne dans le site conservé au niveau de la cavité, exposant le cuivre vers l'histidine invariante. Les résultats obtenus avec NTA et le positionnement du citrate dans la cavité suggèrent que ces deux composés sont des mimes du ligand natif de CrtA. CrtA transporte probablement un ligand de petite taille avec des groupements carboxylates. A la différence du NTA, le citrate n'a pas amélioré la croissance de *B. pertussis* en carence en cuivre, ce qui pourrait s'expliquer par sa plus faible affinité pour le cuivre et l'absence d'atomes d'azote. Au contraire, le NTA contient un azote qui participe à la coordination du cuivre. Il est vraisemblable que le complexe Cu-NTA se lie dans la cavité dans une conformation 'productive' qui permet de déclencher le transport. Selon les modèles AF3, le cuivre en complexe avec NTA, est orienté vers l'His358, ce qui ne serait pas le cas pour le citrate.

Le NTA a été déjà décrit dans la littérature comme pseudoligand pour l'importation du fer via un mécanisme énergie-dépendant, probablement via un TBDT, chez des espèces de *Pseudomonas* (Meyer & Hohnadel, 1992). En revanche, nous n'avons pas d'informations sur

le devenir de NTA après importation par CrtA et dissociation du cuivre. La capacité de *B. pertussis* à dégrader ce composé synthétique reste encore une question.

L'ajout de Trien a stimulé également la croissance de la souche exprimant CrtA. Cet effet positif n'a été observé qu'en présence d'ascorbate dans le milieu de culture. Le remplacement d'ascorbate par d'autres agents réducteurs n'a pas donné le même effet. Il est connu que le Cu(II) oxyde l'ascorbate en acide déhydroascorbique, ce qui cause sa réduction en Cu(I). Il a été montré qu'en présence de Trien, le Cu(II) complexé est moins disponible pour oxyder l'ascorbate, de ce fait l'ascorbate resterait sous sa forme réduite dans le milieu (Sekine et al., 2025). De façon intéressante, l'ajout de Trien stimule la croissance en présence d'ascorbate, alors qu'en absence de ce dernier la croissance est complètement interrompue. Bien que le Trien offre déjà une coordination tétradentate stable au cuivre, l'explication la plus probable au phénotype observé en présence des 2 composés reste celle d'un complexe ternaire Cu(II)-Trien-Ascorbate, qui serait reconnu et transporté par CrtA.

L'ensemble de ces observations suggère qu'*in vitro*, CrtA n'est pas strictement spécifique mais peut transporter certains complexes du cuivre avec des métabolites présents en forte concentration dans son environnement. CrtA montre une certaine sélectivité pour des composés contenant notamment des groupements carboxylates et un/des atome(s) d'azote. Il faut noter que glutamate, NTA, Trien, Ascorbate sont présents dans le milieu SS à des concentrations millimolaires. *In vivo*, où la concentration en cuivre est beaucoup plus limitée, CrtA pourrait utiliser un ou plusieurs xénométallophores. L'utilisation de xénosidérophores par les bactéries est bien décrite pour le fer. Notamment, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser plusieurs xénosidérophores, dont certains peuvent être importés par un même TBDT. Ainsi, les complexes entre Fe(III) et la rhizoferrine ou la staphyloferrine A, des sidérophores de la famille des α -carboxylates, peuvent être importés par le TBDT ActA. L'aérobactine, la schizokinen et l'arthrobactine permettent également l'importation de Fe(III) via le TBDT ChtA (Will et al., 2023).

Le transport médié par les TBDTs, notamment des complexes fer-sidérophore, est un mécanisme qui a été initialement décrit comme étant hautement sélectif, avec chaque sidérophore utilisant un TBDT spécifique. Cependant, des sidérophores de structures similaires peuvent également utiliser le même TBDT, quoique généralement pas des sidérophores de familles différentes. Cette spécificité est assurée par les résidus formant le

site de fixation (Schalk et al., 2012). Toutefois, dans certains cas, plusieurs complexes de tailles différentes peuvent être importés par le même TBDT. C'est le cas de FoxA chez *P. aeruginosa*, qui transporte le Fe(III) lié à la Ferrioxamine B et E (Nocardamine) et également avec une plus faible affinité le Fe(III) lié à la bisucaberin, un sidérophore de type hydroxamate qui forme un complexe 3 : 2 avec le Fe(III) dont la taille est presque double de celui avec la Nocardamine. FoxA transporte également la thiocilline, un antibiotique sous forme de thiopeptide. Ces ligands se fixent dans le même site mais n'interagissent pas tout à fait avec les mêmes résidus. Chacun a son mode unique d'interaction, mais ce sont toutes des interactions productives qui conduisent à l'importation et également au déclenchement du mécanisme de régulation via les facteurs sigma/anti-sigma. Cette étude montre donc que des ligands 'alternatifs' n'ont pas toujours besoin de mimer parfaitement le ligand natif afin d'être importés par le même TBDT (Chan et al., 2023).

Selon nos résultats, il apparaît que CrtA n'a pas une spécificité stricte, il pourrait représenter un nouveau type de TBDTs qui montrent de la promiscuité, ce que nous avons appelé 'scavenger' TBDT. Chez *B. pertussis*, il pourrait reconnaître des xénométallophores avec des carboxylates et des azotes produits par des bactéries qui co-habitent dans la même niche, ou bien des petits métabolites présents en forte concentration. Selon la structure du ligand et la conformation du complexe formé, le cuivre pourrait être orienté vers l'histidine 358 ou le glutamate 337. L'optimisation de l'importation du cuivre en utilisant différentes sources est avantageux pour *B. pertussis*. De même l'utilisation d'un métallophore produit par d'autres bactéries limite la dépense énergétique. Cependant, cette promiscuité peut être exploitée par des agents antimicrobiens pour entrer dans la bactérie. L'orthologue de CrtA chez *P. aeruginosa*, PA0434 (CrtA^{Pa}), est connu pour importer deux pyocines, SX1 et SX2 (Prem Suriya et al., 2023). De plus, d'autres études ont montré l'implication possible de CrtA^{Pa} dans le transport du cefiderocol, un sidérophore conjugué à un antibiotique (Gomis-Font et al., 2023; Kocer et al., 2024; López-Causapé et al., 2023; Luscher et al., 2018). Cependant, on ne sait pas si le transport du cefiderocol via CrtA implique la formation d'un complexe avec le cuivre.

Cette promiscuité potentielle de CrtA pourrait être liée aux propriétés du cuivre. Selon la série d'Irving-Williams, qui classe les métaux divalents selon la stabilité croissante des complexes formés avec des ligands biologiques, le Cu(II) possède la plus haute stabilité de coordination. Il a la capacité de se lier à divers ligands organiques même à de faibles concentrations (Irving & Williams, 1953). Ceci pourrait faciliter son importation via divers petits complexes

organiques ayant certaines caractéristiques. En plus le cuivre est plus soluble sous sa forme oxydée, la forme retrouvée en conditions aérobies, contrairement au fer qui devient très peu disponible sous forme oxydée, ce qui nécessite des sidérophores de haute affinité pour le solubiliser.

B. pertussis et les bactéries en général, ont moins besoin de cuivre que de fer. Ainsi, le nombre de cuproenzymes connues est bien plus faible que celui des protéines à fer (Capdevila et al., 2024). Cela pourrait expliquer l'absence d'un ligand spécifique chez une bactérie comme *B. pertussis*, d'autant plus que cette espèce a évolué par réduction de génome. Au contraire, les bactéries méthanotrophes qui produisent de grandes quantités de méthane monooxygénase avec plusieurs ions de cuivre dans son site actif, synthétisent des chalkophores spécifiques, les méthanobactines (Phelps et al., 1992).

Chez plusieurs bactéries, des opérons codants pour un TBDT codent également pour une protéine de la famille PepSY_TM de la membrane interne. Dans l'opéron codant pour CrTA chez *B. pertussis*, la protéine CrpH codée par le dernier gène de l'opéron a une signature PepSY_TM, et subit aussi une régulation négative par le cuivre. La deuxième partie de cette thèse s'est focalisée sur l'étude de sa fonction.

En contraste avec le grand intérêt porté au transport des métaux via les TBDTs, les études sur les protéines PepSY_TM restent limitées. Chez certaines bactéries, il a été montré que ces protéines sont impliquées dans la réduction du Fe(III) complexé à un ou plusieurs sidérophore(s). Ce processus contribue à la libération du Fe(II) pour son utilisation par la bactérie. Les protéines PepSY_TM décrites ont toutes des caractéristiques similaires : des hélices transmembranaires, deux larges boucles formant ensemble un grand domaine périplasmique, et des histidines conservées qui coordonnent des hèmes. FoxB est la première protéine de cette famille dont la structure a été résolue par cristallographie chez *P. aeruginosa*. Cette protéine permet la réduction du Fe(III) en complexe avec la Ferrioxamine B et la nocardamine, transportés par le TBDT FoxA (Josts et al., 2021). Chez *P. aeruginosa*, une autre protéine PepSY_TM, FpvG, est impliquée dans la réduction du Fe(III) lié à la pyoverdine, le sidérophore majeur produit par cette bactérie. Contrairement à FoxB, cette protéine travaille avec plusieurs partenaires, FpvH, FpvJ et FpvK, et le fer réduit est directement complexé par FpvC, une protéine de liaison périplasmique (Ganne et al., 2017). Chez *V. Cholerae*, une protéine PepSY_TM-like, appelée VciB est codée en opéron avec le TBDT VciA

qui n'est pas encore caractérisé. VciB est également une réductase de Fe(III) en Fe(II), mais son substrat complexant le Fe(III) reste encore à identifier. Cependant il a été montré que VciB ne dépend pas du ligand de VciA. Elle fonctionnerait sous forme d'homodimère (Mey et al., 2008; Peng & Payne, 2017). Chez *Burkholderia cenocepacia*, une autre protéine PepSY_TM, FhuB, est une réductase du Fe(III) complexé à des sidérophores tris- ou bis-hydroxamates, Ferrioxamine B, Ferrichrome, Ferricrocine, Triacétylfusarinine C et acide rhodotorulique (Hussein et al., 2024). Un large spectre de substrats a été décrit également chez *B. japonicum* pour FsrB, une protéine PepSY_TM qui réduit le fer complexé à des sidérophores de la famille des hydroxamates, des catécholates et aussi des chélateurs non physiologiques (Ong & O'Brian, 2023). L'ensemble de ces études montrent que la fonction de réductase de métal est conservée au sein de cette famille, mais ces protéines semblent peu sélectives quant à leur substrat.

Comme CrpH, d'autres protéines PepSY_TM sont co-régulées négativement par le cuivre avec des TBDTs (Bhamidimarri et al., 2021; Morosov et al., 2018; Premuriya et al., 2023). Ces protéines pourraient être des réductases de Cu(II) en Cu(I). Cependant, à la différence des réductases de Fe(III) décrites plus haut, la réduction du Cu(II) ne peut pas conduire à sa libération de son ligand, parce que le Cu(I) est insoluble et c'est la forme la plus toxique. Pour ces raisons, le Cu(I) doit obligatoirement être complexé.

En condition de limitation en cuivre en culture agité, le mutant de CrpH a montré une croissance similaire à la souche sauvage. Cependant, en culture statique, il a montré un fort défaut de croissance. Ce défaut de croissance n'était pas lié à un problème d'importation de cuivre, parce qu'il n'a pas été observé pour le mutant de CrtA^{Bp} et qu'il n'a pas été compensé par l'ajout de cuivre dans le milieu. Ce défaut observé en diminuant l'aération du milieu suggère que la délétion de *crpH* touche une voie respiratoire utilisée surtout en culture statique.

L'étude des mutants des cytochromes oxydases a montré que aa3-Cox et bo-Qox sont importantes pour une croissance optimale de *B. pertussis* en culture statique. En plus, nous avons montré qu'un mutant qui exprime uniquement ces HCOs (c'est à dire chez qui CydAB est inactivé) dépend fortement de CrpH pour pouvoir utiliser le cuivre présent dans le milieu, indiquant que CrpH interviendrait dans l'assemblage de ces HCOs chez *B. pertussis*.

La croissance des mutants simples des HCOs, ainsi que celle des souches portant les mêmes mutations combinées à l'inactivation de CrpH, est fortement impactée en culture statique, mais très peu en culture agitée. Ceci suggère qu'en culture agitée *B. pertussis* utilise principalement bd-Qox (CydAB) pour sa respiration. Comme CydAB ne contient pas de cuivre, elle est indépendante de CrpH. Ces observations expliquent l'absence de défaut de croissance du mutant de CrpH en culture agitée.

D'après ces résultats, CydAB serait plus adapté à la forte aération qu'à la faible aération chez *B. pertussis*. Ces observations sont en contradiction avec des études chez d'autres bactéries qui ont montré que bd-Qox est utilisée dans des environnements de faible oxygénation et aurait une forte affinité pour l'O₂ (Bai et al., 2014; R. J. Jackson et al., 2007; Jones-Carson et al., 2016). Cependant, ceci n'est pas général, puisque chez d'autres organismes CydAB est plutôt de faible affinité pour l'O₂. Ainsi, chez *Gluconobacter oxydans*, il a été montré que les mutants exprimant seulement CydAB n'assurent qu'un niveau de respiration faible dans des conditions limitantes en oxygène, suggérant que CydAB a une faible affinité pour l'oxygène chez cette bactérie, contrairement à bo3-Qox (Richhardt et al., 2013). CydAB chez *Leptospirillum ferriphilum* a été décrite également comme étant à faible affinité pour l'oxygène (Cortés et al., 2019). En se basant sur ces études, il semble que les propriétés des cytochromes oxydases dépendent des organismes et leurs environnements.

Nos analyses RNA-seq comparant les transcriptomes en culture statique et agitée n'ont pas montré de différence significative d'expression de CydAB. En revanche, l'analyse des gènes différentiellement exprimés spécifiquement chez le mutant de CrpH a montré notamment une diminution d'expression de bo-Qox et aussi des gènes codant pour le complexe ATP-synthase. Le niveau réduit en ATP intracellulaire du mutant de CrpH a été confirmé expérimentalement. Cette baisse de production d'énergie est probablement à l'origine de son défaut de croissance en culture statique.

L'activité réductase de CrpH pourrait être importante pour réduire le cuivre avant son incorporation dans le site actif des HCOs. Les HCOs présentent une certaine diversité en termes de composition en sous-unités et cofacteurs (Hederstedt, 2022). On observe aussi une diversité dans les processus de leur assemblage. Dans les aa3-Cox, le centre bimétallique Cu_A (Cu(II)-Cu(I)) est nécessaire pour le transfert des électrons à partir des cytochromes c. Chez *B. diazoefficiens* les Cu(I) et Cu(II) du centre Cu_A sont insérés par l'intermédiaire de Cu_AC et Scol,

deux chaperons qui lient le Cu(I) ou le Cu(II) (Canonica et al., 2019). PCu_AC et Scol participent également à l'assemblage du centre Cu_B dans cbb₃-Cox chez *R. capsulatus* (Trasnea et al., 2016). Le centre Cu_B (Cu(I)), est présent chez toutes les HCOs, au niveau duquel se fait la réduction de l'O₂ en H₂O. Chez *R. sphaeroides* par exemple, l'assemblage de Cu_B dans aa₃-Cox requiert la protéine CtaG /CoxG, un homologue de Cox11 chez les eucaryotes. Cette protéine fixe deux atomes Cu(I) et les délivre par interaction directe au site Cu_B (Nyvltova et al., 2017). Chez *R. capsulatus*, l'assemblage du centre Cu_B de cbb₃-Cox dépend d'un système complexe de transfert de cuivre. Il est d'abord importé dans le cytosol par le transporteur CcoA, puis réduit par CcoG. Le Cu(I) est pris en charge par le chaperon CopZ qui le délivre à l'ATPase Ccol pour qu'il soit réexporté vers le périplasma, où il est pris en charge par PCu_AC et Scol pour son transfert vers Cu_B (Andrei et al., 2020; Ekici et al., 2012a; Marckmann et al., 2019). Dans le cas du Cu_B de cbb₃-Cox, le mécanisme de réduction de cuivre est décrit, cependant pour les sites Cu_A et Cu_B de aa₃-Cox ou le site Cu_B de bo-Qox, le mécanisme de réduction de cuivre est non encore caractérisé.

La réduction du Cu(II) peut se faire de façon spontanée dans le cytoplasme, car c'est un environnement réducteur qui contient plusieurs agents réducteurs (GSH, cystéine, acide ascorbique..). Elle se ferait aussi dans le périplasma avec des électrons qui proviennent des chaînes respiratoires. Cependant, ces réductions ne sont pas spécifiques et vraisemblablement insuffisantes pour satisfaire les besoins de la bactérie en Cu(I). De plus, le cuivre réduit peut être réoxydé rapidement en présence d'O₂, d'où la nécessité de la présence d'un système spécifique de réduction du cuivre. La protéine CcoG représente la première réductase de cuivre décrite, avec une fonction associée à cbb₃-Cox. C'est une protéine à clusters Fe-S qui réduit le Cu(II) dans le cytoplasme (Marckmann et al., 2019). Il a été montré que CcoG joue aussi un rôle dans la maturation de CutO, une oxydase à multi-cuivre périplasmique impliquée dans la défense contre la toxicité du cuivre chez *R. capsulatus* (Öztürk et al., 2021). Ceci suggère que CcoG peut servir à d'autres cuproprotéines que cbb₃-Cox, ce qui est cohérent avec la présence d'homologues de CcoG chez des bactéries dépourvus de ce complexe (Marckmann et al., 2019). CcoG travaille en coordination avec d'autres protéines, et il n'est pas surprenant qu'un système aussi complexe serve à plus d'une cuproprotéine.

Le phénotype synthétique observé en inactivant à la fois *crpH* et *ccoG* suggère une redondance fonctionnelle partielle entre les deux protéines chez *B. pertussis*. Le gène codant pour CcoG est situé à côté de l'opéron de *cbb3-Cox*, qui est inactivé par un pseudogène. A proximité se trouve également *bp2167*, codant une ATPase qui pourrait être CcoI. Toutefois, chez les *Bordetella*, cette ATPase semble tronquée, car elle n'a pas de domaine de fixation d'ATP. Nos résultats montrent que CcoG est toujours fonctionnelle. Il est possible qu'après réduction dans le cytoplasme le Cu(I) soit réexporté par une autre ATPase qui pourrait être CopA codée par *bp2860*. Chez d'autres bactéries, CopA est une ATPase impliquée dans la défense contre un excès de cuivre. En revanche chez *B. pertussis* il semble qu'elle ait perdu cette fonction de protection, même si elle reste surexprimée en excès de cuivre (Rivera-Millot, 2021). La redondance entre CcoG et CrpH n'est pas totale, puisque l'inactivation de l'une ou l'autre chez *B. pertussis* conduit à des phénotypes de croissance. Ceci suggère que ces deux protéines auraient des fonctions spécifiques. Notre hypothèse est que CrpH représente une voie de réduction périplasmique dédiée à la maturation des HCOs et CcoG une voie de réduction de cuivre cytoplasmique, qui pourrait être impliquée dans la maturation d'autres cuproprotéines en plus des HCOs. En cas d'absence de l'une ou de l'autre, les deux protéines pourraient compenser partiellement l'activité manquante.

Un opéron homologue à *cruR-crtA-crpH* est présent chez *P. aeruginosa* (PA0434-0435-0433), et il a été montré que son expression diminue fortement en présence de cyanure d'hydrogène (HCN) (Frangipani et al., 2014; Pessi & Haas, 2000). Le HCN est un facteur de virulence produit par *P. aeruginosa* et en même temps un poison qui inhibe la fonction des HCOs (Smiley et al., 2024). Le fait que *P. aeruginosa* réprime l'expression de l'opéron PA0434-0435-0433 en présence de HCN suggère que ce système aussi est dédié à l'activité des HCOs. En revanche, l'expression de l'opéron codant pour l'autre TDBT à cuivre de *P. aeruginosa*, *OprC*, n'est pas affectée par HCN, suggérant que ces deux systèmes servant à l'importation du cuivre ne sont pas utilisés pour les mêmes voies. Ces données supportent notre modèle que CrtA^{Bp} et CrpH sont dédiés à l'activité des HCOs.

S'il est probable que la voie où intervient CcoG est la même chez *B. pertussis* que celle décrite chez *R. sphaeroides*, en revanche pour la voie CrpH, les partenaires impliqués n'ont pas été identifiés. Nous avons montré que la fonction de CrpH ne dépend pas du ligand de CrtA^{Bp}, ce qui suggère que CrpH pourrait agir sur le Cu(II) périplasmique, qu'il ait été importé par CrtA, une porine ou une autre voie. Pour la réduction dans le périplasma, le Cu(II) serait

certainement complexé à un partenaire. La grande taille de la cavité de CrpH suggère aussi que ce n'est pas le cuivre libre qui s'y fixerait. Nous avons testé les phénotypes de croissance des mutants des chaperons à cuivre, PCu_AC, Scol-1 et Scol-2, mais cela n'a pas permis d'avoir des résultats concluants sur l'identité de la protéine périplasmique qui présenterait le cuivre à CrpH pour sa réduction. Cette étude décrit une nouvelle famille de protéines PEPSY_TM très probablement dédiées à la respiration aérobie, mais de nombreuses questions restent ouvertes sur le mécanisme d'action de CrpH et sur la destination du cuivre réduit dans le périplasme.

Conclusions et perspectives

Les mécanismes d'importation du cuivre chez les bactéries à Gram négatif restent peu connus, en particulier en comparaison avec les systèmes d'importation du fer. Dans ce contexte, le travail présenté dans cette thèse a permis d'enrichir les connaissances dans ce domaine en caractérisant un nouveau système d'importation du cuivre chez *B. pertussis* via le TBDT CrtA^{Bp}. Nos données indiquent que ce cuivre est dédié à l'activité des HCOs. Dans des conditions *in vitro* de laboratoire, CrtA^{Bp} est capable de transporter le cuivre complexé par des petites molécules avec des groupements carboxylates. La question de son ligand *in vivo* reste ouverte. S'il n'a pas de xénométallophore spécifique, CrtA pourrait représenter un concept de TBDT peu sélectif, capable de récupérer le cuivre complexé à divers petits ligands trouvés dans le tractus respiratoire. Les moindres besoins en cuivre de la plupart des bactéries par rapport à leurs besoins en fer, et les différences intrinsèques entre ces deux métaux, font que les stratégies de leur acquisition pourraient différer.

L'étude a conduit également à l'identification d'un nouveau partenaire impliqué dans la maturation des oxydases hème-cuivre, CrpH (Bp2921). Nous proposons que cette protéine serait une réductase du Cu(II) en Cu(I), jouant un rôle clé en condition de faible aération où le cuivre devient important pour la respiration via les HCOs. L'identification de cette protéine ouvre des perspectives d'étude sur les étapes préalables à l'assemblage du cuivre dans les HCOs.

Au-delà de *B. pertussis*, l'identification d'orthologues de ce système dans d'autres espèces, notamment *P. aeruginosa*, suggère que les mécanismes décrits pourraient être conservés. Les travaux réalisés dans ce manuscrit offrent donc une base pour étendre l'étude de ce système à d'autres bactéries. L'utilisation d'autres modèles bactériens pourrait peut être permettre de répondre à certaines questions que nous n'avons pas pu résoudre chez *B. pertussis*.

Ce projet a été confronté à certaines limites, dont la plus importante a été l'impossibilité de produire et purifier la protéine CrpH, empêchant ainsi son analyse fonctionnelle. Malgré cela, les données générées ont permis d'ouvrir plusieurs pistes et de formuler des hypothèses sur son rôle et l'établissement d'un lien entre cette protéine et la biogenèse des HCOs.

Plusieurs questions essentielles restent ouvertes : l'identification du (des) ligand(s) naturels du transporteur CrtA^{Bp} *in vivo*, la détermination du partenaire physiologique de la protéine CrpH, la caractérisation de sa structure ainsi que du mécanisme de réduction du cuivre et enfin

la destination du cuivre réduit, à savoir quelle(s) HCOs en seraient dépendantes (aa3-Cox, bo-Qox ou les deux ?). Ces interrogations constituent des perspectives majeures pour des travaux futurs visant à compléter la compréhension de ce système.

Matériel et Méthodes

Souches de *B. pertussis* utilisées et plasmides

Les délétions en phase des gènes *crtA*, *crpH*, *bp2924 (buf)*, *pCu_AC(bp0562)*, *sco1-1(bp0988)* et *sco1-2(bp3734)* et des opérons *cydAB(bp0259-0260)*, *cyoABCD (bp2930-bp2933)*, *ctaCDFGE (bp3740-bp3744)* ont été obtenues en clonant leurs régions flanquantes amplifiées par PCR dans le plasmide pSS1129 (Stibitz, 1994). Les plasmides pSS1129 recombinants ont été transformés dans *E. coli* SM10, puis utilisés pour réaliser un échange allélique par conjugaison avec la souche sauvage (BPSM) ou ses dérivés.

Les substitutions H358S dans CrtA, ainsi que H200A et H444A dans CrpH ont été introduites par mutagenèse dirigée avec le kit Quick Change 2XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Pour la construction de Bp-CrtA_{MM}, Bp-CrtA_{E337A}, Bp-CrtA_{5ALA} et Bp-buf_{STOP} (un codon stop en position Met8 dans le gène *buf*), des gènes synthétiques (GeneCust) ont été utilisés. Les gènes *alcA (bp2456)* et *ccoG (bp2173)* ont été inactivés par insertion d'un plasmide suicide (pFUS2) (Antoine et al., 2000) portant un fragment interne du gène cible amplifié par PCR. Certaines expériences ont été effectuées avec un mutant où le gène *crpH* a été inactivé par insertion de ce plasmide suicide. Les phénotypes de croissance sont les mêmes entre les mutants où *crpH* est délété et ceux où il a été inactivé par plasmide suicide. Dans tous les mutants utilisés dans la partie d'étude de CrtA^{Bp} et portant la délétion de *cydAB*, un opéron codant pour un deuxième *bd*-Qox non exprimé dans les conditions de laboratoire (*bp3224-bp3225*) a été également inactivé par un plasmide suicide pour éviter sa réactivation sous pression de culture sans cuivre.

Pour la construction des doubles mutants dans Bp- Δ *crpH*, les opérons *cydAB*, *cyoABCD* et *ctaCDFGE* ont été inactivés à l'aide de pFUS2.

Pour la construction du mutant de *cruR (bp2923)* portant deux frameshifts réciproques dans la séquence du peptide signal (au niveau de Gly5 et Leu44) un fragment EcoRI-NcoI d'un gène synthétique portant la région en amont de *cruR* et la première partie du gène avec ces deux mutations a été cloné par une triple ligation avec un fragment NcoI-SmaI codant la partie suivante de *cruR* dans un puc19 ouvert par SmaI et HindIII et portant le dernier fragment de *cruR* et la région aval flanquante. La construction a été séquencée puis le fragment EcoRI-HindIII a été transféré dans pSS1129.

Pour l'expression de CrtA, le plasmide d'expression pT7K-BfrG-twstrep a été obtenu en insérant le fragment XbaI-HindIII issu de pT7-prnCt-Stag (Dé et al., 2008) dans pET24d (Invitrogen), puis en ajoutant la séquence d'une étiquette Twin-Strep dans le site BamHI, avant de cloner *crtA*^{Bp} amplifié par PCR (en deux fragments) dans les sites BamHI et HindIII.

Le gène *crpH* a été cloné dans plusieurs vecteurs d'expression en vue de sa production recombinante dans *E. coli*. Il a d'abord été amplifié puis inséré entre les sites NdeI et HindIII du vecteur pET-TEV, générant le plasmide pET-TEV2921, codant une protéine fusionnée à une étiquette 6-His N-terminale. Le même amplicon a été cloné dans pBAD-mycHis, permettant une expression inductible par arabinose sous le promoteur araBAD.

Pour exprimer CrpH sous le promoteur pT5-lac, la région 5' contenant le site de fixation du ribosome et l'étiquette 6-His a été amplifiée sous forme d'un fragment BglII-ApaI à partir de pET-TEV2921, tandis que le fragment ApaI-HindIII a été récupéré par digestion du même plasmide. Les deux fragments ont été clonés dans pCA24 (Kitagawa et al., 2005) préalablement ouvert avec BglII et HindIII.

Pour la construction des souches complémentées, deux vecteurs de complémentation ont été testés : pBBR1MCS5, un plasmide à faible nombre de copies dans lequel l'expression du gène cloné est sous le contrôle du promoteur pLac (Kovach et al., 1994), et le vecteur pBBi-tac, contenant lacl et un promoteur tac plus fort (Alsteens et al., 2013). Le gène *crtA* a été cloné dans ces vecteurs entre les sites KpnI et HindIII. Pour cela, le fragment KpnI-XhoI a été amplifié par PCR à partir du chromosome, puis le fragment XhoI-HindIII a été récupéré par digestion du vecteur d'expression décrit précédemment. Le gène *crpH* a été cloné de manière similaire entre les sites KpnI-HindIII. Le fragment KpnI-EcoRV a été amplifié par PCR, tandis que le fragment EcoRV-HindIII a été obtenu par digestion du plasmide d'expression pBAD-2921. Les constructions finales ont été vérifiées par séquençage Sanger afin de confirmer l'absence de mutations. Chaque plasmide a ensuite été introduit dans *E. coli* SM10 puis transféré par conjugaison dans la souche Bp- Δ *crtA* Δ *cydAB* ou Bp- Δ *crpH*.

Conditions de croissance et milieux de culture

Les souches de *B. pertussis* sont cultivées sur gélose Bordet-Gengou (BG) supplémentée de 10 % de sang de mouton pendant 48 h à 37 °C. Les bactéries sont ensuite mises en préculture, à

partir d'une $DO_{600} \approx 0,25$ dans des flasques stériles en plastique pour éviter la contamination des métaux, pendant 24 h dans le milieu Stainer scholte (SS) liquide. Toutes les cultures sont effectuées dans le milieu SS supplémenté de 20 mM de $MgSO_4$ pour maximiser l'expression de l'opéron d'intérêt, sauf lorsqu'indiqué autrement.

Dans le travail sur CrtA, la limitation en cuivre a été induite à l'aide du chélateur du Cu(I), BCS, aux concentrations suivantes : 50 μM pour les souches BPSM et Bp- $\Delta crtA$, 15 μM pour les mutants Bp- $\Delta cydAB$, ou 20 μM pour la recherche d'effet de ligand. Les cultures sont inoculées en plaques 96 puits transparentes à partir de $DO_{600} \approx 0,15$ puis incubées à 37 °C sous agitation à 400 rpm pendant 60 h dans un lecteur de plaque EnSight (Perkin Elmer). Pour la condition de supplémentation en cuivre, du $CuSO_4$ est ajouté à une concentration finale de 2 μM .

Pour l'étude de CrpH, l'ascorbate a été retiré du milieu SS pour limiter une réduction non spécifique. Les cultures agitées ont étéensemencées à partir d'une préculture comme décrit ci-dessus, à une $DO_{600} \approx 0,15$, puis incubées à 37 °C sous agitation continue (400 rpm en EnSight). Pour les cultures statiques, une seconde préculture a été réalisée en présence de 500 μM de Trien pour pré-carencer les bactéries, à l'exception des souches avec une mutation dans *cydAB* où la seconde préculture a été effectuée en milieu SS standard. Les cultures statiques ont été inoculées en plaques 96 puits à une $DO_{600} \approx 0,2$. Les plaques sont incubées sans agitation avec une lecture de DO toutes les heures, précédée d'une brève agitation de 1 min pour resuspendre les bactéries. L'ensemble des expériences ont été répétées au moins trois fois, les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations finales suivantes : streptomycine 100 $\mu g/mL$ et gentamicine 10 $\mu g/mL$.

Production et purification des protéines recombinantes

Pour la production recombinante de CrtA, un clone d'*E. coli* BL21(DE3)-omp5 transformée par le plasmide d'expression précédemment décrit est utilisé pour démarrer une préculture du jour (3 ml) qui sert à inoculer une préculture de nuit de 25 ml. Une culture en grand volume (2 litres) est ensuite initiée à 37°C à une DO_{600} de 0.05 dans le milieu LB supplémenté d'antibiotique. À $DO_{600} \approx 0.75$, l'expression de la protéine est induite en ajoutant l'IPTG à 1 mM pendant 3 h. Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots bactériens sont ensuite resuspendus dans le tampon NaPi 50 mM pH=7, NaCl

300 mM, Dnase 0.01 mg/ml et un inhibiteur de protéase (Complete, Roche). Le cassage des bactéries est effectué par la presse de French, suivi d'une centrifugation des lysats à 4 000 g pendant 10 min puis d'une ultracentrifugation des surnageants à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. La resuspension des culots est effectuée dans le même tampon, suivie de deux extractions successives de CrTA^{Bp} avec n-octyl-β-d-glucoside (BOG) à 0.8% et 1% à 30 °C avec agitation. Chaque extraction est suivie d'une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. CrTA^{Bp} a été purifié à partir du surnageant de la dernière ultracentrifugation par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne StrepTrap HP. La colonne a été équilibré par NaPi 50 mM pH=8, NaCl 150 mM, BOG 1%. L'élution a été effectuée avec le même tampon supplémenté de 50 mM de biotine. La protéine est ensuite concentrée et le tampon est échangé par 50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 1% βOG.

Pour l'expression recombinante de CrpH, le plasmide pET-TEV2921 a été transformé dans *E. coli* C43(DE3). Plusieurs milieux de culture (LB, Terrific Broth et milieu d'auto-induction (AIM)) ainsi que différentes conditions de croissance et d'induction ont été évalués : culture à 37 °C suivie d'une induction de 4 h avec 1 mM d'IPTG, culture à 20 °C avec induction durant la nuit en présence de 100 μM d'IPTG, ou encore protocole d'auto-induction à 37 °C pendant 4 h puis à 20 °C pendant une nuit. Dans toutes les conditions testées, 250 μM de NH₄Fe(SO₄)₃ a été ajoutée comme source de fer. Pour les constructions sous contrôle du promoteur pBAD, les expressions ont été réalisées dans la souche *E. coli* LMG194. Les essais ont été menés dans des milieux LB ou Terrific Broth, avec une culture à 37 °C pendant 4 h puis à 16 °C durant la nuit, en présence de 0,2 % d'arabinose. Dans tous les cas, le milieu était supplémenté avec 50 mM d'acide lévulinique et 250 μM de NH₄Fe(SO₄)₃. Pour pCA24-2921, les essais d'expression ont été réalisés dans la souche *E. coli* UT5600 en milieu M9 à 18°C durant la nuit avec 200 μM d'IPTG ou 1 mM d'IPTG, le milieu d'auto-induction a été également testé durant la nuit à 18°C.

Immunoblotting

Des culots de *B. pertussis* provenant de cultures de 10 mL (DO₆₀₀ ≈ 1,5) cultivées dans un milieu SS supplémenté de 50 μM de BCS ont été remis en suspension dans du Tris-HCl 50 mM (pH 8) pour avoir une DO₆₀₀ finale de 5. Les cellules ont ensuite été lysées à l'aide d'un Ribolyser (vitesse 6, 50 s, 4 cycles). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C, puis les surnageants ont été soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g durant 1

h à 4 °C afin d'isoler la fraction membranaire. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose, puis la détection de CrtA^{Bp} a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal (dilution 1:2 500), suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP (1:5 000). Le signal a été révélé avec le système Amersham ECL Prime et visualisé à l'aide de l'imagerie Amersham Imager 600 (GE).

Pour la détection de CrpH, le même protocole a été utilisé, sauf que les cultures de *B. pertussis* ont été effectuées dans un plus grand volume (200 mL) en limitation en cuivre par BCS et en présence de 20 mM de MgSO₄ pour surexprimer la protéine. La lyse des bactéries a été effectué avec la presse de French. CrpH a été détecté par un anticorps polyclonal produit contre un peptide synthétique (dilution 1 : 500). Pour la détection de la protéine recombinante produite chez *E. coli*, un anticorps anti-His tag a été utilisé.

Criblage des ligands par analyse de la dénaturation thermique de CrtA^{Bp}

Les échantillons analysés ont été préparés dans un volume final de 10 µL, contenant la protéine CrtA^{Bp} purifiée (6 µM), chacun des métabolites testés (50 µM) ainsi que du CuSO₄ (50 µM), le tout dans un tampon HEPES 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM et βOG 1 %. Les mélanges ont été transférés dans des microcapillaires puis analysés à l'aide d'un appareil Prometheus Panta (NanoTemper). La dénaturation thermique a été suivi de 25°C à 95°C à une vitesse de 2°C/min en mesurant la fluorescence intrinsèque du tryptophane (excitation 280 nm, émissions à 330/350 nm). La première dérivée du ratio 350/330 nm a été générée et représentée graphiquement à l'aide de GraphPad Prism v10.

Quantification intracellulaire du cuivre par ICP-MS

Quatre précultures de la souche sauvage BPSM et Bp-Δ*crtA* ont été cultivées dans un milieu SS en présence de 50 µM BCS, jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ ≈ 2. Les cultures ont ensuite été inoculées à DO₆₀₀ ≈ 0,1 dans un milieu SS contenant 20 mM MgSO₄ et 20 µM BCS. Après 20 heures d'incubation à 37 °C, les cellules ont été récoltées, lavées avec du milieu SS frais, puis remises en suspension dans du milieu SS traité au résine Chelex. Pour le point T₀, 8 mL de suspension bactérienne ont été immédiatement mélangés à une solution d'arrêt (PBS contenant 5 mM BCS et 5 mM Trien). Pour le point T₅, 10 µM de CuSO₄ et 500 µM de NTA ont été ajouté lors de la première expérience. Pour le deuxième essai, à T₅

min, 2 μM CuSO_4 ou 2 μM de complexe préformé CuSO_4 + 500 μM NTA ont été ajoutés, puis incubés 5 minutes à 200 rpm avant ajout de la solution d'arrêt.

Les bactéries ont été centrifugées (10 000 g, 10 min, 4 °C), et les culots conservés sur glace. Après deux lavages (PBS + 5 mM Trien), les échantillons ont été séchés (99 °C, 3 h), resuspendus dans 700 μL d' HNO_3 à 65 %, puis incubés toute la nuit à 80 °C. Une fois refroidis, 6,3 mL d'eau Chelexée ont été ajoutés et les échantillons filtrés (0,45 μm). Les concentrations en cuivre (^{63}Cu) ont été déterminées par ICP-MS (Agilent 7850) en collaboration avec le Dr Gabriel Billon.

Analyse spectrale des membranes

Les spectres des membranes réduites et oxydées ont été réalisés suivant le protocole décrit par (Ezzel et al.,1981). Les fractions membranaires de *B. pertussis* sauvage et des mutants Bp- ΔcrpH , Bp-KO cyoABCD et Bp-KO ctaCDFGE ont été préparées à partir de cultures bactériennes (200 ml par souche) réalisées sous agitation jusqu'à la phase exponentielle ($\text{DO} \approx 2$), puis les bactéries ont été récupérées par une centrifugation à 10 000g pendant 15 min, suspendues dans 10 mM HEPES (pH 7,4), avec un inhibiteur de protéase et la Dnase à 0.01 mg/ml, puis lysées à l'aide d'une presse de French. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a ensuite été soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g durant 1 heure à 10 °C, permettant la récupération de la fraction membranaire.

Les membranes ont été remises en suspension dans un tampon HEPES 10 mM (pH 7,4) et solubilisées à l'aide de n-dodécyl- β -D-maltoside (DDM) à 1 %. Les membranes à une concentration finale de 10 mg/mL ont été oxydées avec 4 mM H_2O_2 immédiatement avant la mesure de l'absorbance, la réduction des membranes a été effectuée par 1 mM de dithionite. Les spectres d'absorption ont été enregistrés à température ambiante entre 450 et 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon. Les spectres différentiels ont été générés par soustraction du spectre des échantillons oxydés de celui des échantillons réduits.

L'ensemble des analyses a été réalisé à partir de cultures agitées. Les mutants Bp-KO cyoABCD et Bp-KO ctaCDFGE ont été utilisés afin de valider les positions des pics d'absorption décrites initialement (Ezzel et al.,1981).

Expérimentation animale

La souche sauvage et les mutants *Bp-ΔcrpH* et *Bp-ΔcrtA* ont été cultivées en culture agitée en conditions de limitation en cuivre par l'ajout de 50 μM de BCS. Les bactéries ont été diluées dans du PBS stérile, puis administrées à des souris par voie intranasale sous forme d'un inoculum de 20 μL contenant 5×10^4 UFC, soit de la souche sauvage, soit de l'un ou l'autre mutant. Pour les co-infections, les souris ont reçu un mélange équimolaire des deux souches, chacune à 5×10^4 UFC.

Les souris, trois pour la souche sauvage et quatre pour les mutants, ont été sacrifiées 3 heures, 4 jours, 7 jours et 14 jours après infection. Les poumons et les cavités nasales ont été prélevés, homogénéisés dans du PBS, puis ensemencés sur gélose BG afin de quantifier les UFC.

Dans le cas des co-infections, la différenciation des souches a été réalisée grâce à leurs profils de résistance : la souche sauvage exprimant une résistance à la gentamicine en plus de la résistance à la streptomycine, alors que les mutants présentaient uniquement une résistance à la streptomycine.

Dosage de l'ATP intracellulaire

La quantification de l'ATP intracellulaire a été réalisée à l'aide du test BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega), basé sur une réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase.

Les souches BPSM et *Bp-ΔcrpH* ont été cultivées soit en conditions agitées, soit en conditions statiques, dans des plaques 96 puits contenant 200 μL de milieu SS supplémenté en 2 μM CuSO_4 . Les cultures ont été arrêtées en phase exponentielle : après 24 h pour les cultures agitées et après 24 ou 48 h pour les cultures statiques.

Pour chaque échantillon, 100 μL ont été prélevés pour déterminer la DO_{600} , tandis que les 100 μL restants ont été mélangés à un volume équivalent de réactif BacTiter-Glo dans des plaques opaques blanches. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, assurant la lyse cellulaire et la stabilisation du signal luminescent, l'intensité de la luminescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques Tecan. L'ensemble des mesures a été réalisé en triplicats techniques, et les résultats ont été exprimés en unités de luminescence relative (RLU),

normalisées en fonction de la DO₆₀₀ correspondante. Cette expérience a été effectuée avec quatre réplicats biologiques.

Extraction d'ARN

Un volume total de 8 mL de cultures de la souche sauvage et de Bp- Δ crpH cultivées dans des flasques en plastiques, sous agitation (200 rpm) pendant 24 h ou en condition statique pendant 48 h, dans un milieu SS supplémenté avec 20 mM de MgSO₄, a été prélevé en phase exponentielle (DO₆₀₀ \approx 2). 2 mL d'un mélange phénol-éthanol a été ajouté à chaque échantillon. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 4 000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. L'ARN total a été extrait à l'aide du réactif Tri-Reagent (Invitrogen), puis traité à deux reprises avec la DNase I (Sigma-Aldrich), chaque digestion enzymatique étant suivie d'une purification sur billes AMPure XP (Beckman Coulter) afin d'éliminer l'ADN génomique résiduel et les contaminants organiques. La concentration des ARN a été déterminée à l'aide du NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), et leur intégrité évaluée à l'aide d'un Bioanalyzer Agilent 2100 avec le kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies). La préparation des échantillons pour le séquençage a été effectué par Stéphanie Slupek.

Analyse des données RNA-seq et filtrage des données

Les données RNA-seq issues de trois réplicats biologiques pour la souche sauvage et pour le mutant Bp- Δ crpH ont été récupérés sous forme de valeurs de RPKM pour l'ensemble des gènes annotés. Ces données ont d'abord été filtrés en retirant les gènes codant des transposases ainsi que les pseudogènes. Les gènes dont la moyenne des RPKM des trois réplicats était inférieure à 10 dans les deux souches et dans les deux conditions de croissance (culture agitée et culture statique) ont été exclus. Quelques gènes présentant une moyenne de RPKM < 10 dans une seule souche mais légèrement supérieure à 10 dans l'autre ont été exclus pour ne prendre en compte que les gènes bien exprimés dans les deux souches. Dans le but d'isoler les gènes régulés spécifiquement chez le mutant, les gènes dont l'expression était modifiée de manière similaire dans les deux souches ont été écartés. Les seuils définissant la régulation différentielle étaient : $\log_2FC \geq 1$ pour les gènes surexprimés, $\log_2FC \leq -1$ pour les gènes sous-exprimés, avec une FDR $\leq 0,01$ considérée comme statistiquement significative.

Une analyse d'enrichissement fonctionnel (Over-Representation Analysis, ORA) a été réalisée à partir des listes de gènes spécifiquement sous- ou sur-exprimés chez *Bp-ΔcrpH*. Cette analyse a été effectuée en utilisant le langage R. Les gènes ont d'abord été mappés sur la base de données STRING (version 12.0) en utilisant le taxon *Bordetella pertussis* (TaxID 257313), afin d'associer chaque gène à un identifiant STRING unique. Les gènes n'ayant pas pu être mappés ont été exclus de l'analyse.

Les gènes retenus ont ensuite été associés à des termes fonctionnels en utilisant l'ensemble des protéines annotées dans STRING comme base de référence. L'enrichissement fonctionnel a été évalué à l'aide d'un test hypergéométrique, avec correction des p-values pour les comparaisons multiples selon la méthode de Benjamini-Hochberg (p ajustée $< 0,05$). Pour chaque terme fonctionnel, un facteur d'enrichissement (Fold Enrichment) a été calculé, correspondant au rapport entre la proportion de gènes associés à un terme donné dans la liste de gènes d'intérêt et la proportion de gènes associés à ce même terme dans l'ensemble de gènes de référence. Ce paramètre permet ainsi d'évaluer le degré de sur-représentation de chaque terme fonctionnel dans la liste de gènes analysée.

Enfin, les principales catégories fonctionnelles enrichies ont été représentées graphiquement en fonction du facteur d'enrichissement, de la valeur de p ajustée et du nombre de gènes associés.

Analyse par RT-qPCR

Pour les analyses par RT-qPCR, l'ARN a été extrait comme décrit précédemment, suivi d'un traitement à la Dnase. La rétrotranscription a été effectuée avec le kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Fisher). Les qPCR ont été réalisées sur un appareil LightCycler 480 Instrument II (Roche) utilisant le kit Takyon Low-ROX SYBR (Eurogentec). Les expériences ont été menées au moins avec trois réplicats biologiques et trois réplicats techniques par condition. Le niveau d'expression du gène d'intérêt est normalisé par rapport au gène de ménage *bp3416*.

Test TMPD

Les bactéries issues de cultures agitées ou statique ont été arrêtées en début ou en milieu de la phase exponentielle de croissance, en présence ou en absence de cuivre, et diluées 20 fois dans le tampon NaPi 50 mM pH7, NaCl 150 mM. La réaction enzymatique a été initiée dans le même tampon en ajoutant aux bactéries du TMPD à 0.5 mM final (à partir d'une solution stock à 10 mM de TMPD avec 100 μ M d'ascorbate). La vitesse d'oxydation de TMPD par les bactéries a été mesurée en vitesse initiale par mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 562 nm en utilisant un spectrophotomètre uvikon et normalisée par rapport à la DO_{600} . L'activité cytochrome c oxydase a également été mesurée chez le mutant Bp-KO*ctaCDFGE*, inactivé pour la aa3-Cox. La valeur obtenue a été considérée comme correspondant à l'oxydation non spécifique du TMPD et a été soustraite des activités mesurées pour les autres souches.

Bibliographie

- Abicht, H. K., Gonskikh, Y., Gerber, S. D., & Solioz, M. (2013). Non-enzymic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 6), 1190-1197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066928-0>
- Abicht, H. K., Schärer, M. A., Quade, N., Ledermann, R., Mohorko, E., Capitani, G., Hennecke, H., & Glockshuber, R. (2014). How Periplasmic Thioredoxin TlpA Reduces Bacterial Copper Chaperone Sca1 and Cytochrome Oxidase Subunit II (CoxB) Prior to Metallation*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32431-32444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607127>
- Abriata, L. A., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gkazonis, P., Spyroulias, G. A., Vila, A. J., & Wang, S. (2008). Mechanism of CuA assembly. *Nature chemical biology*, 4(10), Article 10.
- Alsteens, D., Martinez, N., Jamin, M., & Jacob-Dubuisson, F. (2013). Sequential Unfolding of Beta Helical Protein by Single-Molecule Atomic Force Microscopy. *PLOS ONE*, 8(8), e73572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073572>
- Alvarez Hayes, J., Lamberti, Y., Surmann, K., Schmidt, F., Völker, U., & Rodriguez, M. E. (2015). Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response. *PROTEOMICS*, 15(13), 2258-2266. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400512>
- André, A. C., Laborde, M., & Marteyn, B. S. (2022). The battle for oxygen during bacterial and fungal infections. *Trends in Microbiology*, 30(7), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.002>
- Andrei, A., Di Renzo, M. A., Öztürk, Y., Meisner, A., Daum, N., Frank, F., Rauch, J., Daldal, F., Andrade, S. L. A., & Koch, H.-G. (2021). The CopA2-Type P1B-Type ATPase CcoI Serves as Central Hub for cbb3-Type Cytochrome Oxidase Biogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 712465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712465>
- Andrei, A., Öztürk, Y., Khalfaoui-Hassani, B., Rauch, J., Marckmann, D., Trasnea, P.-I., Daldal, F., & Koch, H.-G. (2020). Cu Homeostasis in Bacteria : The Ins and Outs. *Membranes*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/membranes10090242>
- Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V., & Koleva-Kolarova, R. (2011). COPPER IN THE HUMAN ORGANISM. *Trakia Journal of Sciences*, 9(1).
- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., Locht, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2000). New Virulence-Activated and Virulence-Repressed Genes Identified by Systematic Gene Inactivation and Generation of Transcriptional Fusions in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5902-5905. <https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5902-5905.2000>
- Antoine, R., Rivera-Millot, A., Roy, G., & Jacob-Dubuisson, F. (2019). Relationships Between Copper-Related Proteomes and Lifestyles in β Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02217>
- Armstrong, S. K. (2015). Bacterial Metabolism in the Host Environment : Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract. In T. Conway & P. Cohen (Éds.), *Metabolism and Bacterial Pathogenesis* (p. 231-261). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818883.ch11>

- Armstrong, S. K., Brickman, T. J., & Suhadolc, R. J. (2012). Involvement of multiple distinct Bordetella receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Molecular Microbiology*, *84*(3), 446-462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08032.x>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... Donk, W. A. van der. (2012). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products : Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, *30*(1), 108-160. <https://doi.org/10.1039/C2NP20085F>
- Bai, H., Rolfe, M. D., Jia, W., Coakley, S., Poole, R. K., Green, J., & Holcombe, M. (2014). Agent-Based Modeling of Oxygen-Responsive Transcription Factors in Escherichia coli. *PLOS Computational Biology*, *10*(4), e1003595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003595>
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Gonnelli, L., & Mangani, S. (2004). Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(33), 34833-34839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403655200>
- Banci, L., Pierattelli, R., & Vila, A. J. (2002). Nuclear magnetic resonance spectroscopy studies on copper proteins. *Advances in Protein Chemistry*, *60*, 397-449. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(02\)60058-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(02)60058-0)
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., & Rotilio, G. (1987). Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*, *22*(2), 111-180. <https://doi.org/10.3109/10409238709083738>
- Battistoni, A. (2003). Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochemical Society Transactions*, *31*(6), 1326-1329. <https://doi.org/10.1042/bst0311326>
- Beall, B. (1998). Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *Research in Microbiology*, *149*(3), 189-201. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(98\)80079-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(98)80079-X)
- Beall, B., & Sanden, G. N. (1995). A *Bordetella pertussis* fepA homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology*, *141*(12), 3193-3205. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3193>
- Beddek, A. J., & Schryvers, A. B. (2010). The lactoferrin receptor complex in Gram negative bacteria. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *23*(3), 377-386. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9299-z>
- Bedmar, E. J., Robles, E. F., & Delgado, M. J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*, *33*(1), 141-144. <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- Belcher, T., Dubois, V., Rivera-Millot, A., Loch, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2021). Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1980987>

- Belevich, I., Verkhovsky, M. I., & Wikström, M. (2006). Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature*, *440*(7085), 829-832. <https://doi.org/10.1038/nature04619>
- Bellini, P., & Hemmings, A. M. (2006). In Vitro Characterization of a Bacterial Manganese Uptake Regulator of the Fur Superfamily. *Biochemistry*, *45*(8), 2686-2698. <https://doi.org/10.1021/bi052081n>
- Bera, A. K., Wu, R., Harrison, S., Cornelissen, C. N., Chazin, W. J., & Noinaj, N. (2022). TdfH selectively binds metal-loaded tetrameric calprotectin for zinc import. *Communications Biology*, *5*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03039-y>
- Bhamidimarri, S. P., Young, T. R., Shanmugam, M., Soderholm, S., Baslé, A., Bumann, D., & van den Berg, B. (2021). Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *PLoS Biology*, *19*(11), e3001446. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001446>
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E., & Arlat, M. (2007). Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors : A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE*, *2*(2), e224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000224>
- Borregaard, N., & Cowland, J. B. (2006). Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin, a Siderophore-binding Eukaryotic Protein. *Biometals*, *19*(2), 211-215. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3251-7>
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Braun, V. (2024). Substrate Uptake by TonB-Dependent Outer Membrane Transporters. *Molecular Microbiology*, *122*(6), 929-947. <https://doi.org/10.1111/mmi.15332>
- Braun, V., Hartmann, M. D., & Hantke, K. (2022). Transcription regulation of iron carrier transport genes by ECF sigma factors through signaling from the cell surface into the cytoplasm. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*(4), fuac010. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac010>
- Brickman, T. J., Anderson, M. T., & Armstrong, S. K. (2007). Bordetella iron transport and virulence. *BioMetals*, *20*(3-4), 303. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9031-1>
- Brickman, T. J., & Armstrong, S. K. (1999). Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in Bordetella species. *Journal of Bacteriology*, *181*(19), 5958-5966. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.5958-5966.1999>
- Brickman, T. J., Hanawa, T., Anderson, M. T., Suhadolc, R. J., & Armstrong, S. K. (2008). Differential expression of Bordetella pertussis iron transport system genes during infection. *Molecular microbiology*, *70*(1), 3-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06333.x>
- Brickman, T. J., Kang, H. Y., & Armstrong, S. K. (2001). Transcriptional activation of Bordetella alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *Journal of Bacteriology*, *183*(2), 483-489. <https://doi.org/10.1128/JB.183.2.483-489.2001>
- Brickman, T. J., & McIntosh, M. A. (1992). Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from Escherichia coli. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(17), 12350-12355.

- Bricks, L. F., Vargas-Zambrano, J. C., & Macina, D. (2024). Epidemiology of Pertussis After the COVID-19 Pandemic : Analysis of the Factors Involved in the Resurgence of the Disease in High-, Middle-, and Low-Income Countries. *Vaccines*, *12*(12), 1346. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121346>
- Buglino, J. A., Ozakman, Y., Hatch, C. E., Benjamin, A., Tan, D. S., & Glickman, M. S. (2025). Chalkophore-mediated respiratory oxidase flexibility controls *M. tuberculosis* virulence. *eLife*, *14*, RP105794. <https://doi.org/10.7554/eLife.105794>
- Bühler, D., Rossmann, R., Landolt, S., Balsiger, S., Fischer, H.-M., & Hennecke, H. (2010). Disparate Pathways for the Biogenesis of Cytochrome Oxidases in *Bradyrhizobium japonicum**. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(21), 15704-15713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085217>
- Burgos, J. M., King-Lyons, N. D., & Connell, T. D. (2010). Expression of BfrH, a Putative Siderophore Receptor of *Bordetella bronchiseptica*, Is Regulated by Iron, Fur1, and the Extracellular Function Sigma Factor EcfI. *Infection and Immunity*, *78*(3), 1147-1162. <https://doi.org/10.1128/iai.00961-09>
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *3*(1), 3-8.
- Cahyono, R. N., Yamanaka, M., Nagao, S., Shibata, N., Higuchi, Y., & Hirota, S. (2020). 3D domain swapping of azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Metallomics*, *12*(3), 337-345. <https://doi.org/10.1039/C9MT00255C>
- Calmettes, C., Ing, C., Buckwalter, C. M., El Bakkouri, M., Chieh-Lin Lai, C., Pogoutse, A., Gray-Owen, S. D., Pomès, R., & Moraes, T. F. (2015). The molecular mechanism of Zinc acquisition by the neisserial outer-membrane transporter ZnuD. *Nature Communications*, *6*(1), 7996. <https://doi.org/10.1038/ncomms8996>
- Canonica, F., Hennecke, H., & Glockshuber, R. (2019). Biochemical pathway for the biosynthesis of the Cu_A center in bacterial cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, *593*(21), Article 21. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13587>
- Canonica, F., Klose, D., Ledermann, R., Sauer, M. M., Abicht, H. K., Quade, N., Gossert, A. D., Chesnov, S., Fischer, H.-M., Jeschke, G., Hennecke, H., & Glockshuber, R. (2019). Structural basis and mechanism for metallochaperone-assisted assembly of the Cu_A center in cytochrome oxidase. *Science Advances*, *5*(7), eaaw8478. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8478>
- Capdevila, D. A., Rondón, J. J., Edmonds, K. A., Rocchio, J. S., Dujovne, M. V., & Giedroc, D. P. (2024). Bacterial Metallostasis : Metal Sensing, Metalloproteome Remodeling, and Metal Trafficking. *Chemical Reviews*, *124*(24), 13574-13659. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.4c00264>
- Carrano, C. J., & Raymond, K. N. (1979). Ferric ion sequestering agents. 2. Kinetics and mechanism of iron removal from transferrin by enterobactin and synthetic tricatechols. *Journal of the American Chemical Society*, *101*(18), 5401-5404. <https://doi.org/10.1021/ja00512a047>
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *71*(1), 158-229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06>
- Caulfield, A. D., & Harvill, E. T. (2024). Chapter 71—*Bordetella pertussis*. In Y.-W. Tang, M. Y. Hindiyeh, D. Liu, A. Sails, P. Spearman, & J.-R. Zhang (Éds.), *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)* (p. 1463-1478). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00076-9>

- Celia, H., Noinaj, N., & Buchanan, S. K. (2020). Structure and Stoichiometry of the Ton Molecular Motor. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms21020375>
- Cescau, S., Cwerman, H., Létouffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., & Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 20(3-4), 603-613. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9050-y>
- Cha, J. S., & Cooksey, D. A. (1993). Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1671-1674. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1671-1674.1993>
- Chambers, C. E., McIntyre, D. D., Mouck, M., & Sokol, P. A. (1996). Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 9(2), 157-167. <https://doi.org/10.1007/BF00144621>
- Chan, C., Ng, D., Fraser, M. E., & Schryvers, A. B. (2023). Structural and functional insights into iron acquisition from lactoferrin and transferrin in Gram-negative bacterial pathogens. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 36(3), 683-702. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00466-6>
- Chan, D. C. K., Josts, I., Koteva, K., Wright, G. D., Tidow, H., & Burrows, L. L. (2023). Interactions of TonB-dependent transporter FoxA with siderophores and antibiotics that affect binding, uptake, and signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(16), e2221253120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2221253120>
- Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E., & Henderson, J. P. (2012). The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nature Chemical Biology*, 8(8), 731-736. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1020>
- Chen, Q., & Stibitz, S. (2019). The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Current Opinion in Microbiology, Host-Microbe Interactions: Bacteria*, Edited by Karen M. Ottemann & Linda J. Kenney, 47, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.01.002>
- Cho, K. H., & Salyers, A. A. (2001). Biochemical Analysis of Interactions between Outer Membrane Proteins That Contribute to Starch Utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7224-7230. <https://doi.org/10.1128/jb.183.24.7224-7230.2001>
- Choi, D. W., Zea, C. J., Do, Y. S., Semrau, J. D., Antholine, W. E., Hargrove, M. S., Pohl, N. L., Boyd, E. S., Geesey, G. G., Hartsel, S. C., Shafe, P. H., McEllistrem, M. T., Kisting, C. J., Campbell, D., Rao, V., de la Mora, A. M., & Dispirito, A. A. (2006). Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu(I) and Cu(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry*, 45(5), 1442-1453. <https://doi.org/10.1021/bi051815t>
- Cobessi, D., Meksem, A., & Brillet, K. (2010). Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae* : Heme binding by an induced fit mechanism. *Proteins*, 78(2), 286-294. <https://doi.org/10.1002/prot.22539>
- Cortés, M., Marín, S., Galleguillos, P., Cautivo, D., & Demergasso, C. (2019). Validation of Genetic Markers Associated to Oxygen Availability in Low-Grade Copper Bioleaching Systems : An Industrial Application. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01841>

- Coutte, L., Antoine, R., Slupek, S., Solans, L., Derop, J., Bonnefond, A., Hot, D., & Locht, C. (2020). Combined RNAseq and ChIPseq Analyses of the BvgA Virulence Regulator of *Bordetella pertussis*. *mSystems*, 5(3), 10.1128/msystems.00208-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00208-20>
- Coutte, L., Huot, L., Antoine, R., Slupek, S., Merkel, T. J., Chen, Q., Stibitz, S., Hot, D., & Locht, C. (2016). The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Scientific Reports*, 6, 32774. <https://doi.org/10.1038/srep32774>
- Cuív, P. O., Clarke, P., Lynch, D., & O'Connell, M. (2004). Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2996-3005. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.2996-3005.2004>
- Dai, H., Wang, L., Li, L., Huang, Z., & Ye, L. (2021). Metallothionein 1 : A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739918>
- Dassama, L. M. K., Kenney, G. E., Ro, S. Y., Zielazinski, E. L., & Rosenzweig, A. C. (2016). Methanobactin transport machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), Article 46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603578113>
- Dassama, L. M. K., Kenney, G. E., & Rosenzweig, A. C. (2017). Methanobactins : From genome to function. *Metallomics*, 9(1), 7-20. <https://doi.org/10.1039/C6MT00208K>
- Dé, E., Saint, N., Glinel, K., Meli, A. C., Lévy, D., & Jacob-Dubuisson, F. (2008). Influence of the passenger domain of a model autotransporter on the properties of its translocator domain. *Molecular Membrane Biology*, 25(3), 192-202. <https://doi.org/10.1080/09687680701771925>
- Dean, C. R., & Poole, K. (1993). Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa* : Involvement of a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology*, 8(6), 1095-1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01654.x>
- Delepelaire, P. (2019). Bacterial ABC transporters of iron containing compounds. *Research in Microbiology*, 170(8), 345-357. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.10.008>
- Dershwitz, P., Bandow, N. L., Yang, J., Semrau, J. D., McEllistrem, M. T., Heinze, R. A., Fonseca, M., Ledesma, J. C., Jennett, J. R., DiSpirito, A. M., Athwal, N. S., Hargrove, M. S., Bobik, T. A., Zischka, H., & DiSpirito, A. A. (2021). Oxygen Generation via Water Splitting by a Novel Biogenic Metal Ion-Binding Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), e0028621. <https://doi.org/10.1128/AEM.00286-21>
- Desideri, A., & Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1322-1325. <https://doi.org/10.1042/bst0311322>
- Devanathan, S., & Postle, K. (2007). Studies on colicin B translocation : FepA is gated by TonB. *Molecular Microbiology*, 65(2), 441-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05808.x>
- Dupont, C. L., Grass, G., & Rensing, C. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—New insights and applications. *Metallomics*, 3(11), 1109. <https://doi.org/10.1039/c1mt00107h>
- Eisenbeis, S., Lohmiller, S., Valdebenito, M., Leicht, S., & Braun, V. (2008). NagA-Dependent Uptake of N-Acetyl-Glucosamine and N-Acetyl-Chitin Oligosaccharides across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5230-5238. <https://doi.org/10.1128/JB.00194-08>

- Ekici, S., Pawlik, G., Lohmeyer, E., Koch, H.-G., & Daldal, F. (2012). Biogenesis of cbb(3)-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1817(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.10.011>
- Ekici, S., Yang, H., Koch, H.-G., & Daldal, F. (2012a). Novel transporter required for biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *mBio*, 3(1), e00293-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00293-11>
- Ekici, S., Yang, H., Koch, H.-G., & Daldal, F. (2012b). Novel transporter required for biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *mBio*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1128/mBio.00293-11>
- El Ghazouani, A., Baslé, A., Firbank, S. J., Knapp, C. W., Gray, J., Graham, D. W., & Dennison, C. (2011). Copper-Binding Properties and Structures of Methanobactins from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Inorganic Chemistry*, 50(4), 1378-1391. <https://doi.org/10.1021/ic101965j>
- El Ghazouani, A., Baslé, A., Gray, J., Graham, D. W., Firbank, S. J., & Dennison, C. (2012). Variations in methanobactin structure influences copper utilization by methane-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8400-8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112921109>
- Evans, C. R., Karnovsky, A., Kovach, M. A., Standiford, T. J., Burant, C. F., & Stringer, K. A. (2014). Untargeted LC-MS Metabolomics of Bronchoalveolar Lavage Fluid Differentiates Acute Respiratory Distress Syndrome from Health. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 640-649. <https://doi.org/10.1021/pr4007624>
- Feng, Y., Chiu, C.-H., Heining, U., Hozbor, D. F., Tan, T. Q., & König, C.-H. W. von. (2021). Emerging macrolide resistance in *Bordetella pertussis* in mainland China : Findings and warning from the global pertussis initiative. *The Lancet Regional Health – Western Pacific*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2021.100098>
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (1998). Siderophore-Mediated Iron Transport : Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397), 2215-2220. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2215>
- Fiumera, H. L., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2007). Translocation of Mitochondrially Synthesized Cox2 Domains from the Matrix to the Intermembrane Space. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), 4664-4673. <https://doi.org/10.1128/MCB.01955-06>
- Flores Jiménez, R. H., & Cafiso, D. S. (2012). The N-terminal domain of a TonB-dependent transporter undergoes a reversible stepwise denaturation. *Biochemistry*, 51(17), 3642-3650. <https://doi.org/10.1021/bi300118a>
- Frangipani, E., Pérez-Martínez, I., Williams, H. D., Cherbuin, G., & Haas, D. (2014). A novel cyanide-inducible gene cluster helps protect *Pseudomonas aeruginosa* from cyanide. *Environmental Microbiology Reports*, 6(1), 28-34. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12105>
- Fröhlich, K. S., & Gottesman, S. (2018). Small Regulatory RNAs in the Enterobacterial Response to Envelope Damage and Oxidative Stress. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.rwr-0022-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0022-2018>

- Fu, Y., Chang, F.-M. J., & Giedroc, D. P. (2014). Copper Transport and Trafficking at the Host–Bacterial Pathogen Interface. *Accounts of Chemical Research*, 47(12), 3605-3613. <https://doi.org/10.1021/ar500300n>
- Gaballa, A., & Helmann, J. D. (1998). Identification of a Zinc-Specific Metalloregulatory Protein, Zur, Controlling Zinc Transport Operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5815-5821. <https://doi.org/10.1128/jb.180.22.5815-5821.1998>
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., & Schalk, I. J. (2017). Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors : FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology*, 12(4), 1056-1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>
- Gaule, T. G., Smith, M. A., Tych, K. M., Pirrat, P., Trinh, C. H., Pearson, A. R., Knowles, P. F., & McPherson, M. J. (2018). Oxygen Activation Switch in the Copper Amine Oxidase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 57(36), 5301-5314. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00633>
- Ghnamah, Y., Palmer, C. D., Livnat-Levanon, N., Grupper, M., Rosenzweig, A. C., & Lewinson, O. (2025). Prokaryotic mechanosensitive channels mediate copper influx. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 34(7), e70205. <https://doi.org/10.1002/pro.70205>
- Gomis-Font, M. A., Sastre-Femenia, M. À., Taltavull, B., Cabot, G., & Oliver, A. (2023). In vitro dynamics and mechanisms of cefiderocol resistance development in wild-type, mutator and XDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(7), 1785-1794. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad172>
- Gonyar, L. A., Gelbach, P. E., McDuffie, D. G., Koepfel, A. F., Chen, Q., Lee, G., Temple, L. M., Stibitz, S., Hewlett, E. L., Papin, J. A., Damron, F. H., & Eby, J. C. (2019). In Vivo Gene Essentiality and Metabolism in *Bordetella pertussis*. *mSphere*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00694-18>
- Gort, A. S., Ferber, D. M., & Imlay, J. A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32(1), 179-191. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01343.x>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 902-908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5474>
- Greiner, P., Hannappel, A., Werner, C., & Ludwig, B. (2008). Biogenesis of cytochrome *c* oxidase—In vitro approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 15th European Bioenergetics Conference 2008, 1777(7), 904-911. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.003>
- Gu, W., Farhan Ul Haque, M., Baral, B. S., Turpin, E. A., Bandow, N. L., Kremmer, E., Flatley, A., Zischka, H., DiSpirito, A. A., & Semrau, J. D. (2016). A TonB-Dependent Transporter Is Responsible for Methanobactin Uptake by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1917-1923. <https://doi.org/10.1128/AEM.03884-15>
- Guan, Z.-B., Luo, Q., Wang, H.-R., Chen, Y., & Liao, X.-R. (2018). Bacterial laccases : Promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(19), 3569-3592. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2883-z>

- Guillier, M., & Gottesman, S. (2008). The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Research*, *36*(21), 6781-6794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn742>
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G., & Zähler, H. (1993). Purification of yersiniabactin : A siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of General Microbiology*, *139*(9), 2159-2165. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2159>
- Haeili, M., Speer, A., Rowland, J., Niederweis, M., & Wolschendorf, F. (2015). The role of porins in copper acquisition by mycobacteria. *International Journal of Mycobacteriology*, *4*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.052>
- Halcrow, M., Phillips, S., & Knowles, P. (2000). Amine Oxidases and Galactose Oxidase. In A. Holzenburg & N. S. Scrutton (Éds.), *Enzyme-Catalyzed Electron and Radical Transfer* (Vol. 35, p. 183-231). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-46828-X_6
- Hall, L. M. C., Fawell, S. C., Shi, X., Faray-Kele, M.-C., Aduse-Opoku, J., Whiley, R. A., & Curtis, M. A. (2005). Sequence Diversity and Antigenic Variation at the rag Locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4253-4262. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4253-4262.2005>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, *219*(1), 1-14.
- Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., Xu, L., Wu, M., & Liang, H. (2019a). A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathogens*, *15*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008198>
- Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., Xu, L., Wu, M., & Liang, H. (2019b). A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathogens*, *15*(12), e1008198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008198>
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L. A., Shanzer, A., & Schalk, I. J. (2010). The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *Journal of Bacteriology*, *192*(5), 1212-1220. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-09>
- Hartmann, A., & Braun, V. (1980). Iron transport in *Escherichia coli* : Uptake and modification of ferrichrome. *Journal of Bacteriology*, *143*(1), 246-255. <https://doi.org/10.1128/jb.143.1.246-255.1980>
- Hassan, H. M., & Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>
- Hederstedt, L. (2022). Diversity of Cytochrome c Oxidase Assembly Proteins in Bacteria. *Microorganisms*, *10*(5), 926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050926>
- Helman, S. L., Zhou, J., Fuqua, B. K., Lu, Y., Collins, J. F., Chen, H., Vulpe, C. D., Anderson, G. J., & Frazer, D. M. (2023). The biology of mammalian multi-copper ferroxidases. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *36*(2), 263-281. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00370-z>

- Hickman, S. J., Cooper, R. E. M., Bellucci, L., Paci, E., & Brockwell, D. J. (2017). Gating of TonB-dependent transporters by substrate-specific forced remodelling. *Nature Communications*, 8(1), 14804. <https://doi.org/10.1038/ncomms14804>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637-657. <https://doi.org/10.1039/B906679A>
- Hill, B. C., & Andrews, D. (2012). Differential affinity of BsSCO for Cu(II) and Cu(I) suggests a redox role in copper transfer to the Cu(A) center of cytochrome c oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1817(6), 948-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.006>
- Hiniker, A., Collet, J.-F., & Bardwell, J. C. A. (2005). Copper stress causes an in vivo requirement for the Escherichia coli disulfide isomerase DsbC. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33785-33791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505742200>
- Hiser, L., Di Valentin, M., Hamer, A. G., & Hosler, J. P. (2000). Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 619-623. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.619>
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., & Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*, 273(10), 2308-2326. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x>
- Hollander, A., Mercante, A. D., Shafer, W. M., & Cornelissen, C. N. (2011). The iron-repressed, AraC-like regulator MpeR activates expression of fetA in Neisseria gonorrhoeae. *Infection and Immunity*, 79(12), 4764-4776. <https://doi.org/10.1128/IAI.05806-11>
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity : Transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- Hussein, S. M., Sofoluwe, A., Paleja, A., Duhme-Klair, A., & Thomas, M. S. (2024). Identification of a system for hydroxamate xenosiderophore-mediated iron transport in Burkholderia cenocepacia. *Microbiology*, 170(1). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001425>
- Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20440-20445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908760106>
- Irie, Y., Mattoo, S., & Yuk, M. H. (2004). The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in Bordetella bronchiseptica. *Journal of Bacteriology*, 186(17), Article 17. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004>
- Irving, H., & Williams, R. J. P. (1953). 637. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0), Article 0. <https://doi.org/10.1039/JR9530003192>
- Ivaska, L., Barkoff, A.-M., Mertsola, J., & He, Q. (2022). Macrolide Resistance in Bordetella pertussis : Current Situation and Future Challenges. *Antibiotics*, 11(11), 1570. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111570>
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., & Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. *Nature*, 376(6542), Article 6542. <https://doi.org/10.1038/376660a0>

- Jackson, R. J., Elvers, K. T., Lee, L. J., Gidley, M. D., Wainwright, L. M., Lightfoot, J., Park, S. F., & Poole, R. K. (2007). Oxygen Reactivity of Both Respiratory Oxidases in *Campylobacter jejuni* : The cydAB Genes Encode a Cyanide-Resistant, Low-Affinity Oxidase That Is Not of the Cytochrome bd Type. *Journal of Bacteriology*, *189*(5), 1604-1615. <https://doi.org/10.1128/jb.00897-06>
- Jackson, S., & Burrows, T. W. (1956). The Virulence-enhancing Effect of Iron on Non-pigmented Mutants of Virulent Strains of *Pasteurella pestis*. *British Journal of Experimental Pathology*, *37*(6), 577-583.
- Jones, C. M., & Niederweis, M. (2010). Role of Porins in Iron Uptake by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, *192*(24), 6411-6417. <https://doi.org/10.1128/jb.00986-10>
- Jones-Carson, J., Husain, M., Liu, L., Orlicky, D. J., & Vázquez-Torres, A. (2016). Cytochrome bd-Dependent Bioenergetics and Antinitrosative Defenses in *Salmonella* Pathogenesis. *mBio*, *7*(6), e02052-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02052-16>
- Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I. J., & Tidow, H. (2021). Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(34), Article 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101952118>
- Kadner, R. J. (1990). Vitamin B12 transport in *Escherichia coli* : Energy coupling between membranes. *Molecular Microbiology*, *4*(12), 2027-2033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00562.x>
- Kaila, V. R. I., & Wikström, M. (2021). Architecture of bacterial respiratory chains. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4>
- Kamicker, B. J., & Brill, W. J. (1986). Identification of *Bradyrhizobium japonicum* Nodule Isolates from Wisconsin Soybean Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(3), 487-492. <https://doi.org/10.1128/aem.51.3.487-492.1986>
- Kardos, J., Héja, L., Simon, Á., Jablonkai, I., Kovács, R., & Jemnitz, K. (2018). Copper signalling : Causes and consequences. *Cell Communication and Signaling*, *16*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0277-3>
- Kenney, C. D., & Cornelissen, C. N. (2002). Demonstration and Characterization of a Specific Interaction between Gonococcal Transferrin Binding Protein A and TonB. *Journal of Bacteriology*, *184*(22), 6138-6145. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6138-6145.2002>
- Kenney, G. E., Dassama, L. M. K., Manesis, A. C., Ross, M. O., Chen, S., Hoffman, B. M., & Rosenzweig, A. C. (2019). MbnH is a diheme MauG-like protein associated with microbial copper homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(44), 16141-16151. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010202>
- Kenney, G. E., & Rosenzweig, A. C. (2013). Genome mining for methanobactins. *BMC Biology*, *11*, 17. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-17>
- Kenney, G. E., Sadek, M., & Rosenzweig, A. C. (2016). Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, *8*(9), 931-940. <https://doi.org/10.1039/c5mt00289c>
- Kim, E.-H., Nies, D. H., McEvoy, M. M., & Rensing, C. (2011). Switch or Funnel : How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis ▽ . *Journal of Bacteriology*, *193*(10), 2381-2387. <https://doi.org/10.1128/JB.01323-10>

- Kim, H. J., Graham, D. W., DiSpirito, A. A., Alterman, M. A., Galeva, N., Larive, C. K., Asunskis, D., & Sherwood, P. M. A. (2004). Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5690), 1612-1615. <https://doi.org/10.1126/science.1098322>
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., & Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of E. coli K-12 ORF archive) : Unique resources for biological research. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, *12*(5), 291-299. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi012>
- Kocer, K., Boutin, S., Moll, M., & Nurjadi, D. (2024). Investigation of cefiderocol resistance prevalence and resistance mechanisms in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa, Germany 2019–21. *JAC-Antimicrobial Resistance*, *6*(6), dlac183. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae183>
- Koh, E.-I., Hung, C. S., Parker, K. S., Crowley, J. R., Giblin, D. E., & Henderson, J. P. (2015). Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system. *Metallomics*, *7*(6), 1011-1022. <https://doi.org/10.1039/C4MT00341A>
- Koh, E.-I., Robinson, A. E., Bandara, N., Rogers, B. E., & Henderson, J. P. (2017). Copper import in Escherichia coli by the yersiniabactin metallophore system. *Nature chemical biology*, *13*(9), 1016-1021. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2441>
- Korshunov, S., & Imlay, J. A. (2006). Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *188*(17), 6326-6334. <https://doi.org/10.1128/jb.00554-06>
- Korshunov, S. S., & Imlay, J. A. (2002). A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, *43*(1), 95-106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02719.x>
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS : A broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, *16*(5), 800-802.
- Kraemer, S. M., Duckworth, O. W., Harrington, J. M., & Schenkeveld, W. D. C. (2015). Metallophores and Trace Metal Biogeochemistry. *Aquatic Geochemistry*, *21*(2-4), 159-195. <https://doi.org/10.1007/s10498-014-9246-7>
- Kranz, R. G., Beckett, C. S., & Goldman, B. S. (2002). Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems : Bordetella as a model for the System II cytochrome c biogenesis pathway. *Research in Microbiology*, *153*(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01278-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01278-5)
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2011). TonB or not TonB : Is that the question? This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, *89*(2), 87-97. <https://doi.org/10.1139/O10-141>
- Kuwae, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y., & Abe, A. (2016). BteA Secreted from the Bordetella bronchiseptica Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. *PLoS One*, *11*(2), e0148387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148387>
- Lee, H. S., Abdelal, A. H., Clark, M. A., & Ingraham, J. L. (1991). Molecular characterization of nosA, a Pseudomonas stutzeri gene encoding an outer membrane protein required to make copper-

containing N₂O reductase. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5406-5413.
<https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5406-5413.1991>

Lee, H. S., Hancock, R. E., & Ingraham, J. L. (1989). Properties of a *Pseudomonas stutzeri* outer membrane channel-forming protein (NosA) required for production of copper-containing N₂O reductase. *Journal of Bacteriology*, 171(4), 2096-2100. <https://doi.org/10.1128/jb.171.4.2096-2100.1989>

Leprevost, L., Jünger, S., Lippens, G., Guillaume, C., Sicoli, G., Oliveira, L., Falcone, E., de Santis, E., Rivera-Millot, A., Billon, G., Stellato, F., Henry, C., Antoine, R., Zirah, S., Dubiley, S., Li, Y., & Jacob-Dubuisson, F. (2024). A widespread family of ribosomal peptide metallophores involved in bacterial adaptation to metal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(49), e2408304121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2408304121>

Lewinson, O., Lee, A. T., & Rees, D. C. (2009). A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4677-4682. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900666106>

Lhospice, S., Gomez, N. O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghssein, G., Hajjar, C., Liratni, A., Wang, S., Richaud, P., Bleves, S., Ball, G., Borezée-Durant, E., Lobinski, R., Pignol, D., Arnoux, P., & Voulhoux, R. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 7(1), 17132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9>

Linder, M. C. (2013). *Biochemistry of Copper*. Springer Science & Business Media.

Locht, C. (2001). Les facteurs de virulence de *Bordetella pertussis*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 31, 20-28. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(01\)80091-3](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(01)80091-3)

Locht, C. (2016). Pertussis : Where did we go wrong and what can we do about it? *Journal of Infection*, 72, S34-S40. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.020>

Locht, C., Papin, J. F., Lecher, S., Debrie, A.-S., Thalen, M., Solovay, K., Rubin, K., & Mielcarek, N. (2017). Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(1), Article 1. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>

López-Causapé, C., Maruri-Aransolo, A., Gomis-Font, M. A., Penev, I., Castillo, M. G., Mulet, X., de Dios Caballero, J., Campo, R. del, Cantón, R., & Oliver, A. (2023). Cefiderocol resistance genomics in sequential chronic *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 29(4), 538.e7-538.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.11.014>

Lunak, Z. R., & Noel, K. D. (2015). A quinol oxidase, encoded by *cyoABCD*, is utilized to adapt to lower O₂ concentrations in *Rhizobium etli* CFN42. *Microbiology*, 161(1), Article 1. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083386-0>

Luscher, A., Gasser, V., Bumann, D., Mislin, G. L. A., Schalk, I. J., & Köhler, T. (2022). Plant-Derived Catechols Are Substrates of TonB-Dependent Transporters and Sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to Siderophore-Drug Conjugates. *mBio*, 13(4), e0149822. <https://doi.org/10.1128/mbio.01498-22>

Luscher, A., Moynié, L., Auguste, P. S., Bumann, D., Mazza, L., Pletzer, D., Naismith, J. H., & Köhler, T. (2018). TonB-Dependent Receptor Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake of

- Siderophore-Drug Conjugates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e00097-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00097-18>
- Lutkenhaus, J. F. (1977). Role of a major outer membrane protein in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 131(2), 631-637. <https://doi.org/10.1128/jb.131.2.631-637.1977>
- Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D. C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massis, L. M., Ferreira, L. C. S., Newton, S. M. C., & Klebba, P. E. (2007). Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 397-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605333200>
- MacArthur, I., Belcher, T., King, J. D., Ramasamy, V., Alhammadi, M., & Preston, A. (2019). The evolution of Bordetella pertussis has selected for mutations of acr that lead to sensitivity to hydrophobic molecules and fatty acids. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 603-612. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1601502>
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), 8344-8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>
- Marckmann, D., Trasnea, P.-I., Schimpf, J., Winterstein, C., Andrei, A., Schmollinger, S., Blaby-Haas, C. E., Friedrich, T., Daldal, F., & Koch, H.-G. (2019). The *cbb*₃-type cytochrome oxidase assembly factor CcoG is a widely distributed cupric reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(42), Article 42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913803116>
- Maret, W. (2024). The Extracellular Metallometabolome : Metallophores, Metal Ionophores, and Other Chelating Agents as Natural Products. *Natural Product Communications*, 19(8), 1934578X241271701. <https://doi.org/10.1177/1934578X241271701>
- McKay, L. S., Spandrio, A. R., Johnson, R. M., Sobran, M. A., Marlatt, S. A., Mote, K. B., Dedloff, M. R., Nash, Z. M., Julio, S. M., & Cotter, P. A. (2024). Cytochrome oxidase requirements in Bordetella reveal insights into evolution towards life in the mammalian respiratory tract. *PLOS Pathogens*, 20(7), e1012084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012084>
- Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F., & Cotter, P. A. (2014). Bordetella pertussis pathogenesis : Current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Hoover, L. A., Fisher, C. R., & Payne, S. M. (2008). Vibrio cholerae VciB Promotes Iron Uptake via Ferrous Iron Transporters. *Journal of Bacteriology*, 190(17), Article 17. <https://doi.org/10.1128/JB.00569-08>
- Meyer, J.-M., & Hohnadel, D. (1992). Use of nitrilotriacetic acid (NTA) by Pseudomonas species through iron metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/BF00174214>
- Miller, M. C., Parkin, S., Fetherston, J. D., Perry, R. D., & Demoll, E. (2006). Crystal structure of ferric-yersiniabactin, a virulence factor of Yersinia pestis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(9), 1495-1500. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.04.007>
- Mlakar, M., Pavković, S., Tumir, L.-M., Vukosav, P., & Gašparović, B. (2017). Electrochemical Characterization of Biochemically Active Cu(II) Mixed Ligand Complex with Histidine and Cysteine. *Electroanalysis*, 29(2), 392-397. <https://doi.org/10.1002/elan.201600253>

- Mohorko, E., Abicht, H. K., Bühler, D., Glockshuber, R., Hennecke, H., & Fischer, H.-M. (2012). Thioredoxin-like protein TlpA from *Bradyrhizobium japonicum* is a reductant for the copper metallochaperone Sca1. *FEBS Letters*, *586*(23), 4094-4099. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.026>
- Morosov, X., Davoudi, C.-F., Baumgart, M., Brocker, M., & Bott, M. (2018). The copper-deprivation stimulus of *Corynebacterium glutamicum* comprises proteins for biogenesis of the actinobacterial cytochrome bc₁-aa₃ supercomplex. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(40), 15628-15640. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004117>
- Murdoch, C. C., & Skaar, E. P. (2022). Nutritional immunity : The battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(11), 657-670. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6>
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., & Breaker, R. R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & Biology*, *9*(9), 1043. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00224-7)
- Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A., & Braun, V. (2005). ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, *187*(24), 8300-8311. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8300-8311.2005>
- Neumann, P. Z., & Sass-Kortsak, A. (1967). The state of copper in human serum : Evidence for an amino acid-bound fraction. *The Journal of Clinical Investigation*, *46*(4), 646-658. <https://doi.org/10.1172/JCI105566>
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Nishio, Takayuki., Tanaka, Nobuo., Hiratake, Jun., Katsube, Yukiteru., Ishida, Yuzaburo., & Oda, Junichi. (1988). Isolation and structure of the novel dihydroxamate siderophore alcaligin. *Journal of the American Chemical Society*, *110*(26), 8733-8734. <https://doi.org/10.1021/ja00234a045>
- Noinaj, N., Easley, N. C., Oke, M., Mizuno, N., Gumbart, J., Boura, E., Steere, A. N., Zak, O., Aisen, P., Tajkhorshid, E., Evans, R. W., Gorringer, A. R., Mason, A. B., Steven, A. C., & Buchanan, S. K. (2012). Structural basis for iron piracy by pathogenic *Neisseria*. *Nature*, *483*(7387), 53-58. <https://doi.org/10.1038/nature10823>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters : Regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, *64*, 43-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Nou, X., & Kadner, R. J. (2000). Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7190-7195. <https://doi.org/10.1073/pnas.130013897>
- Nyvtova, E., Barrientos, A., & Hosler, J. (2017). Assembly of Heme a₃-CuB and CuA in Cytochrome c Oxidase. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (p. 1-27). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc2476>

- Ong, A., & O'Brian, M. R. (2023). The Bradyrhizobium japonicum fsrB gene is essential for utilization of structurally diverse ferric siderophores to fulfill its nutritional iron requirement. *Molecular Microbiology*, *119*(3), 340-349. <https://doi.org/10.1111/mmi.15028>
- Öztürk, Y., Andrei, A., Blaby-Haas, C. E., Daum, N., Daldal, F., & Koch, H.-G. (2023). Metabolic Sensing of Extracytoplasmic Copper Availability via Translational Control by a Nascent Exported Protein. *mBio*, *14*(1), e0304022. <https://doi.org/10.1128/mbio.03040-22>
- Öztürk, Y., Blaby-Haas, C. E., Daum, N., Andrei, A., Rauch, J., Daldal, F., & Koch, H.-G. (2021). Maturation of Rhodobacter capsulatus Multicopper Oxidase CutO Depends on the CopA Copper Efflux Pathway and Requires the cutF Product. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.720644>
- Palmer, C. D., Ghnamah, Y., Livnat-Levanon, N., Lewinson, O., & Rosenzweig, A. C. (2025). The Escherichia coli AZY operon links copper uptake to antibiotic resistance. *Communications Biology*, *8*(1), 458. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07884-5>
- Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C. M., Moiseeva, N., Allaire, M., & Coulton, J. W. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5778), 1399-1402. <https://doi.org/10.1126/science.1128057>
- Pearson, R. G. (1968). Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1 : Fundamental principles. *Journal of Chemical Education*, *45*(9), 581. <https://doi.org/10.1021/ed045p581>
- Pederick, V. G., Eijkelkamp, B. A., Begg, S. L., Ween, M. P., McAllister, L. J., Paton, J. C., & McDevitt, C. A. (2015). ZnuA and zinc homeostasis in Pseudomonas aeruginosa. *Scientific Reports*, *5*, 13139. <https://doi.org/10.1038/srep13139>
- Peng, E. D., & Payne, S. M. (2017). Vibrio cholerae VciB Mediates Iron Reduction. *Journal of Bacteriology*, *199*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1128/JB.00874-16>
- Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., Galop, S., Signor, L., Crouzy, S., Michaud-Soret, I., & de Rosny, E. (2016). Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry*, *55*(10), 1503-1515. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01061>
- Pereira, M. M., Santana, M., & Teixeira, M. (2001). A novel scenario for the evolution of haem–copper oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1505*(2), 185-208. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00169-4)
- Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V. P., Kuhn, L., Hammann, P., Mislin, G. L. A., Ehret-Sabatier, L., & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic Adaption of Pseudomonas aeruginosa by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *19*(4), 589-607. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001829>
- Pessi, G., & Haas, D. (2000). Transcriptional Control of the Hydrogen Cyanide Biosynthetic Genes hcnABC by the Anaerobic Regulator ANR and the Quorum-Sensing Regulators LasR and RhIR in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *182*(24), 6940-6949. <https://doi.org/10.1128/jb.182.24.6940-6949.2000>
- Pettersson, A., Prinz, T., Umar, A., van der Biezen, J., & Tommassen, J. (1998). Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of Neisseria meningitidis. *Molecular Microbiology*, *27*(3), 599-610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00707.x>

- Phelps, P. A., Agarwal, S. K., Speitel, G. E., & Georgiou, G. (1992). Methylosinus trichosporium OB3b Mutants Having Constitutive Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of High Levels of Copper. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3701-3708. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3701-3708.1992>
- Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F. D., & Loch, C. (2000). Bordetella pertussis TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infection and Immunity*, 68(4), 1919-1927. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.1919-1927.2000>
- Premuriya, J., Mosbahi, K., Atanaskovic, I., Kleanthous, C., & Walker, D. (2023). Outer membrane translocation of pyocins via the copper regulated TonB-dependent transporter CrtA. *Biochemical Journal*, 480(14), 1035-1049. <https://doi.org/10.1042/BCJ20220552>
- Price, S. L., Vadyvaloo, V., DeMarco, J. K., Brady, A., Gray, P. A., Kehl-Fie, T. E., Garneau-Tsodikova, S., Perry, R. D., & Lawrenz, M. B. (2021). Yersiniabactin contributes to overcoming zinc restriction during Yersinia pestis infection of mammalian and insect hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(44), e2104073118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104073118>
- Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A. B., Hart, P. J., Kosman, D. J., & Solomon, E. I. (2007). Shall We Dance? How A Multicopper Oxidase Chooses Its Electron Transfer Partner. *Accounts of Chemical Research*, 40(6), 445-452. <https://doi.org/10.1021/ar600051a>
- Rademacher, C., & Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158(10), 2451-2464. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058487-0>
- Rai, R., Azim, A., Sinha, N., Sahoo, J., Singh, C., Ahmed, A., Saigal, S., Baronia, A., Gupta, D., Gurjar, M., Poddar, B., & Singh, R. (2012). Metabolic profiling in human lung injuries by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Metabolomics*, 9. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0472-y>
- Ramos-Zúñiga, J., Bruna, N., & Pérez-Donoso, J. M. (2023). Toxicity Mechanisms of Copper Nanoparticles and Copper Surfaces on Bacterial Cells and Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10503. <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>
- Rapisarda, V. A., Montelongo, L. R., Farías, R. N., & Massa, E. M. (1999). Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the Escherichia coli respiratory chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370(2), 143-150. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1398>
- Ratliff, A. C., Buchanan, S. K., & Celia, H. (2022). The Ton Motor. *Frontiers in Microbiology*, 13, 852955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.852955>
- Reigstad, C. S., Hultgren, S. J., & Gordon, J. I. (2007). Functional genomic studies of uropathogenic Escherichia coli and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21259-21267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611502200>
- Reilly, C. (2008). *The Nutritional Trace Metals*. John Wiley & Sons.
- Reyes, R. M., & Rosenzweig, A. C. (2024a). Methanobactins : Structures, Biosynthesis, and Microbial Diversity. *Annual Review of Microbiology*, 78(1), 383-401. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041522-092911>

- Reyes, R. M., & Rosenzweig, A. C. (2024b). Methanobactins : Structures, Biosynthesis, and Microbial Diversity. *Annual Review of Microbiology*, 78(Volume 78, 2024), 383-401. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041522-092911>
- Richhardt, J., Luchterhand, B., Bringer, S., Büchs, J., & Bott, M. (2013). Evidence for a Key Role of Cytochrome bo₃ Oxidase in Respiratory Energy Metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4210-4220. <https://doi.org/10.1128/JB.00470-13>
- Ridge, P. G., Zhang, Y., & Gladyshev, V. N. (2008). Comparative Genomic Analyses of Copper Transporters and Cuproproteomes Reveal Evolutionary Dynamics of Copper Utilization and Its Link to Oxygen. *PLOS ONE*, 3(1), e1378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001378>
- Rigo, A., Corazza, A., di Paolo, M. L., Rossetto, M., Ugolini, R., & Scarpa, M. (2004). Interaction of copper with cysteine : Stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(9), 1495-1501. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.06.008>
- Rivera-Millot, A. (2020). *Mécanismes de l'homéostasie du cuivre chez un pathogène strictement humain, Bordetella pertussis* [Phdthesis, Université de Lille]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03229185>
- Rivera-Millot, A., Slupek, S., Chatagnon, J., Roy, G., Saliou, J.-M., Billon, G., Alaimo, V., Hot, D., Salomé-Desnoulez, S., Locht, C., Antoine, R., & Jacob-Dubuisson, F. (2021). Streamlined copper defenses make *Bordetella pertussis* reliant on custom-made operon. *Communications Biology*, 4(1), 46. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01580-2>
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S., & Eitinger, T. (2006). Comparative and Functional Genomic Analysis of Prokaryotic Nickel and Cobalt Uptake Transporters : Evidence for a Novel Group of ATP-Binding Cassette Transporters. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 317-327. <https://doi.org/10.1128/jb.188.1.317-327.2006>
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2002). Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48949-48959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208965200>
- Rodrigues, C., Bouchez, V., Soares, A., Trombert-Paolantoni, S., Aït El Belghiti, F., Cohen, J. F., Armatys, N., Landier, A., Blanchot, T., Hervo, M., Toubiana, J., Brisse, S., Brieu, N., Gallou, J., Homor, A., Choquet, M., Kempf, M., Pailhoriès, H., Dumollard, C., ... Piau, C. (2024). Resurgence of *Bordetella pertussis*, including one macrolide-resistant isolate, France, 2024. *Eurosurveillance*, 29(31), 2400459. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459>
- Roy, G., Antoine, R., Schwartz, A., Slupek, S., Rivera-Millot, A., Boudvillain, M., & Jacob-Dubuisson, F. (2022). *Post-transcriptional regulation by copper with a new upstream Open Reading Frame* (p. 2022.03.18.484875). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.03.18.484875>
- Rubino, J. T., & Franz, K. J. (2012a). Coordination chemistry of copper proteins : How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), 129-143. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>
- Rubino, J. T., & Franz, K. J. (2012b). Coordination chemistry of copper proteins : How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), 129-143. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>

- Rulíšek, L., & Vondrášek, J. (1998). Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *71*(3-4), 115-127. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(98\)10042-9](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(98)10042-9)
- Saleem, M., Prince, S. M., Rigby, S. E. J., Imran, M., Patel, H., Chan, H., Sanders, H., Maiden, M. C. J., Feavers, I. M., & Derrick, J. P. (2013). Use of a molecular decoy to segregate transport from antigenicity in the FrpB iron transporter from *Neisseria meningitidis*. *PloS One*, *8*(2), e56746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056746>
- Sandrini, S., Masania, R., Zia, F., Haigh, R., & Freestone, P. (2013). Role of porin proteins in acquisition of transferrin iron by enteropathogens. *Microbiology*, *159*(Pt_12), 2639-2650. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071928-0>
- Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013). Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes : Different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids*, *44*(5), 1267-1277. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1468-2>
- Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., & Brillet, K. (2012). Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Current Topics in Membranes*, *69*, 37-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>
- Schalk, I. J., & Perraud, Q. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental Microbiology*, *25*(4), 811-831. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>
- Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne, A., & de Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular Microbiology*, *63*(4), 1054-1068. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05578.x>
- Schauer, K., Rodionov, D. A., & De Reuse, H. (2008). New substrates for TonB-dependent transport : Do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(7), 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.012>
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., & Greenberg, E. P. (2003). Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes : A Transcriptome Analysis. *Journal of Bacteriology*, *185*(7), 2066-2079. <https://doi.org/10.1128/jb.185.7.2066-2079.2003>
- Sekine, H., Ito, H., & Sekine, Y. (2025). Effect of Werner-Type Complex Formation of Cu²⁺ and Fe²⁺ on Oxidative Potentials Assessed Using Ascorbic Acid Assay. *Atmosphere*, *16*(2), 192. <https://doi.org/10.3390/atmos16020192>
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., & Yoon, S. (2010). Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(4), 496-531. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>
- Serventi, F., Youard, Z. A., Murset, V., Huwiler, S., Bühler, D., Richter, M., Luchsinger, R., Fischer, H.-M., Brogioli, R., Niederer, M., & Hennecke, H. (2012). Copper Starvation-inducible Protein for Cytochrome Oxidase Biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum**. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(46), 38812-38823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.406173>
- Sharonov, B. P., & Govorova, N. I. (1990). [Oxidation of ceruloplasmin by hypochlorite. The loss of blue color and preservation of oxidase activity]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, *55*(6), 1145-1148.
- Sheldon, J. R., & Skaar, E. P. (2019). Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Current Opinion in Immunology*, *60*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.002>

- Si, M., Wang, Y., Zhang, B., Zhao, C., Kang, Y., Bai, H., Wei, D., Zhu, L., Zhang, L., Dong, T. G., & Shen, X. (2017). The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition. *Cell Reports*, *20*(4), 949-959. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.081>
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., Dong, T. G., & Shen, X. (2017). Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(11), E2233-E2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614902114>
- Silale, A., & Berg, B. van den. (2023). TonB-Dependent Transport Across the Bacterial Outer Membrane. *Annual Review of Microbiology*, *77*(Volume 77, 2023), 67-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032421-111116>
- Siluvai, G. S., Nakano, M., Mayfield, M., & Blackburn, N. J. (2011). The essential role of the Cu(II) state of Sco in the maturation of the CuA center of cytochrome oxidase : Evidence from H135Met and H135SeM variants of the *Bacillus subtilis* Sco. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *16*(2), 285-297. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0725-z>
- Silva, K. I., Michael, B. C., Geib, S. J., & Saxena, S. (2014). ESEEM Analysis of Multi-Histidine Cu(II)-Coordination in Model Complexes, Peptides, and Amyloid- β . *The Journal of Physical Chemistry B*, *118*(30), 8935-8944. <https://doi.org/10.1021/jp500767n>
- Silverman, J. M., Brunet, Y. R., Cascales, E., & Mougous, J. D. (2012). Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. *Annual Review of Microbiology*, *66*(Volume 66, 2012), 453-472. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151619>
- Sirajuddin, S., & Rosenzweig, A. C. (2015). Enzymatic Oxidation of Methane. *Biochemistry*, *54*(14), 2283-2294. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00198>
- Skurnik, D., Roux, D., Aschard, H., Cattoir, V., Yoder-Himes, D., Lory, S., & Pier, G. B. (2013). A Comprehensive Analysis of In Vitro and In Vivo Genetic Fitness of *Pseudomonas aeruginosa* Using High-Throughput Sequencing of Transposon Libraries. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003582. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003582>
- Small, S. K., & O'Brian, M. R. (2011). The *Bradyrhizobium japonicum* *frcB* gene encodes a diheme ferric reductase. *Journal of Bacteriology*, *193*(16), 4088-4094. <https://doi.org/10.1128/JB.05064-11>
- Smiley, M. K., Sekaran, D. C., Forouhar, F., Wolin, E., Jovanovic, M., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E. P. (2024). MpaR-driven expression of an orphan terminal oxidase subunit supports *Pseudomonas aeruginosa* biofilm respiration and development during cyanogenesis. *mBio*, *15*(1), e0292623. <https://doi.org/10.1128/mbio.02926-23>
- Soloz, M. (2018). *Copper and Bacteria : Evolution, Homeostasis and Toxicity*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5>
- Soloz, M. (2019). Copper Disposition in Bacteria. In *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE* (p. 101-113). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810532-0.00011-2>
- Speer, A., Rowland, J. L., Haeili, M., Niederweis, M., & Wolschendorf, F. (2013). Porins Increase Copper Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, *195*(22), 5133-5140. <https://doi.org/10.1128/JB.00763-13>

- Stewart, L. J., Thaqi, D., Kobe, B., McEwan, A. G., Waldron, K. J., & Djoko, K. Y. (2019). Handling of nutrient copper in the bacterial envelope. *Metallomics*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1039/c8mt00218e>
- Stibitz, S. (1994). Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods in Enzymology*, *235*, 458-465. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35161-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35161-9)
- Szwejsjer-Zawislak, E., Wilk, M. M., Piszczek, P., Krawczyk, J., Wilczyńska, D., & Hozbor, D. (2023). Evaluation of Whole-Cell and Acellular Pertussis Vaccines in the Context of Long-Term Herd Immunity. *Vaccines*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010001>
- Tan, T., Dalby, T., Forsyth, K., Halperin, S. A., Heininger, U., Hozbor, D., Plotkin, S., Ulloa-Gutierrez, R., & Wirsing von König, C. H. (2015). Pertussis Across the Globe : Recent Epidemiologic Trends From 2000 to 2013. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *34*(9), e222-232. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000795>
- Tang, K., Jiao, N., Liu, K., Zhang, Y., & Li, S. (2012). Distribution and Functions of TonB-Dependent Transporters in Marine Bacteria and Environments : Implications for Dissolved Organic Matter Utilization. *PLoS ONE*, *7*(7), e41204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041204>
- Télliez, C. M., Gaus, K. P., Graham, D. W., Arnold, R. G., & Guzman, R. Z. (1998). Isolation of copper biochelates from *Methylosinus trichosporium* OB3b and soluble methane monooxygenase mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(3), 1115-1122. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.1115-1122.1998>
- Thompson, A. K., Gray, J., Liu, A., & Hosler, J. P. (2012). The roles of *Rhodobacter sphaeroides* copper chaperones PCuAC and Sco (PrrC) in the assembly of the copper centers of the *aa3*-type and the *cbb3*-type cytochrome *c* oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Biogenesis/Assembly of Respiratory Enzyme Complexes*, *1817*(6), 955-964. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.01.003>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores : Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(22), 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>
- Tiwari, T., Murphy, T. V., Moran, J., & National Immunization Program, CDC. (2005). Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis : 2005 CDC Guidelines. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*, *54*(RR-14), 1-16.
- Trasnea, P.-I., Utz, M., Khalfaoui-Hassani, B., Lagies, S., Daldal, F., & Koch, H.-G. (2016). Cooperation between two periplasmic copper chaperones is required for full activity of the *cbb3*-type cytochrome *c* oxidase and copper homeostasis in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, *100*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/mmi.13321>
- Udho, E., Jakes, K. S., & Finkelstein, A. (2012). TonB-dependent transporter FhuA in planar lipid bilayers : Partial exit of its plug from the barrel. *Biochemistry*, *51*(34), 6753-6759. <https://doi.org/10.1021/bi300493u>
- Vanderpool, C. K., & Armstrong, S. K. (2001). The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *Journal of Bacteriology*, *183*(14), 4278-4287. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4278-4287.2001>

- Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynié, L., Acosta-Gutiérrez, S., Naismith, J. H., Davin-Regli, A., Ceccarelli, M., van den Berg, B., Winterhalter, M., & Pagès, J.-M. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 164-176. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0294-2>
- Vidakovics, M. L. P., Paba, J., Lamberti, Y., Ricart, C. A., de Sousa, M. V., & Rodriguez, M. E. (2007). Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *Journal of Proteome Research*, *6*(7), 2518-2528. <https://doi.org/10.1021/pr060681i>
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J., & Lamont, I. L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics : Lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, *45*(5), 1177-1190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03088.x>
- Vita, N., Landolfi, G., Baslé, A., Platsaki, S., Lee, J., Waldron, K. J., & Dennison, C. (2016). Bacterial cytosolic proteins with a high capacity for Cu(I) that protect against copper toxicity. *Scientific Reports*, *6*, 39065. <https://doi.org/10.1038/srep39065>
- Vita, N., Platsaki, S., Baslé, A., Allen, S. J., Paterson, N. G., Crombie, A. T., Murrell, J. C., Waldron, K. J., & Dennison, C. (2015). A four-helix bundle stores copper for methane oxidation. *Nature*, *525*(7567), 140-143. <https://doi.org/10.1038/nature14854>
- Wake, A., Misawa, M., & Matsui, A. (1975). Siderochrome production by *Yersinia pestis* and its relation to virulence. *Infection and Immunity*, *12*(5), 1211-1213. <https://doi.org/10.1128/iai.12.5.1211-1213.1975>
- Warfel, J. M., Zimmerman, L. I., & Merkel, T. J. (2014). Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(2), 787-792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
- Wessling-Resnick, M. (2015). Nramp1 and Other Transporters Involved in Metal Withholding during Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(31), 18984-18990. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.643973>
- Will, V., Gasser, V., Kuhn, L., Fritsch, S., Heinrichs, D. E., & Schalk, I. J. (2023). Siderophore specificities of the *Pseudomonas aeruginosa* TonB-dependent transporters ChtA and ActA. *FEBS Letters*, *597*(23), 2963-2974. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14740>
- Wilmot, C. M. (2003). Oxygen activation in a copper-containing amine oxidase. *Biochemical Society Transactions*, *31*(3), 493-496. <https://doi.org/10.1042/bst0310493>
- Wunsch, P., Herb, M., Wieland, H., Schiek, U. M., & Zumft, W. G. (2003). Requirements for Cu(A) and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, *185*(3), 887-896. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.887-896.2003>
- Xie, B., Wei, X., Wan, C., Zhao, W., Song, R., Xin, S., & Song, K. (2024). Exploring the Biological Pathways of Siderophores and Their Multidisciplinary Applications : A Comprehensive Review. *Molecules*, *29*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/molecules29102318>
- Yadav, R., Noinaj, N., Ostan, N., Moraes, T., Stoudenmire, J., Maurakis, S., & Cornelissen, C. N. (2019). Structural Basis for Evasion of Nutritional Immunity by the Pathogenic *Neisseriae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02981>

- Yang, R., Roshani, D., Gao, B., Li, P., & Shang, N. (2024). Metallothionein : A Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. *Antioxidants*, *13*(7), 825. <https://doi.org/10.3390/antiox13070825>
- Yoneyama, H., & Nakae, T. (1996a). Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology*, *142*(8), 2137-2144. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2137>
- Yoneyama, H., & Nakae, T. (1996b). Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology (Reading, England)*, *142* (Pt 8), 2137-2144. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2137>
- Yoshihara, E., & Nakae, T. (1989). Identification of porins in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* that form small diffusion pores. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(11), 6297-6301.
- Yue, W. W., Grizot, S., & Buchanan, S. K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *Journal of Molecular Biology*, *332*(2), 353-368. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00855-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00855-6)
- Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A., & Lindley, P. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å : Nature of the copper centres. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *1*(1), 15-23. <https://doi.org/10.1007/s007750050018>
- Zhang, H., Yang, J., Cheng, J., Zeng, J., Ma, X., & Lin, J. (2024). PQS and pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* share inner membrane transporters to mediate iron uptake. *Microbiology Spectrum*, *12*(2), e0325623. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03256-23>
- Zhu, W., Hunt, D. J., Richardson, A. R., & Stojiljkovic, I. (2000). Use of Heme Compounds as Iron Sources by Pathogenic Neisseriae Requires the Product of the hemO Gene. *Journal of Bacteriology*, *182*(2), 439-447. <https://doi.org/10.1128/jb.182.2.439-447.2000>
- Zuily, L., Lahrach, N., Falcone, E., Bouraguba, M., Lebrun, V., Lojou, E., Giudici-Orticoni, M.-T., Faller, P., & Ilbert, M. (2023). Ligands as a Tool to Tune the Toxicity of Cu on Bacteria : From Boosting to Silencing. In A. J. Simaan & M. Réglie, *Copper Bioinorganic Chemistry* (p. 1-44). WORLD SCIENTIFIC. https://doi.org/10.1142/9789811269493_0001
- Zuily, L., Lahrach, N., Fassler, R., Genest, O., Faller, P., Sénèque, O., Denis, Y., Castanié-Cornet, M.-P., Genevoux, P., Jakob, U., Reichmann, D., Giudici-Orticoni, M.-T., & Ilbert, M. (2022). Copper Induces Protein Aggregation, a Toxic Process Compensated by Molecular Chaperones. *mBio*, *0*(0), Article 0. <https://doi.org/10.1128/mbio.03251-21>
- Zumft, W. G. (2005). Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *10*(2-4), 154-166. <https://doi.org/10.1159/000091562>

Abstract

Copper is an essential element for bacterial fitness, as it is found in the active site of several key enzymes. However, when present in excess, it becomes highly toxic. Bacteria must therefore maintain a delicate balance between copper acquisition and protection against copper-induced toxicity. While copper detoxification mechanisms are relatively well characterized, import systems remain poorly understood.

This work has led to the characterization of a new copper-acquisition system in the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. It consists in a TonB-dependent transporter (TBDT), named CrtA^{Bp} (formerly BfrG). *In vitro* experiments show that CrtA^{Bp} imports Cu(II) complexed with a ligand containing carboxylate groups. The copper imported via CrtA^{Bp} is destined for the heme-copper oxidases (HCOs) of *B. pertussis*. Sequence-similarity analyses identified the CrtA subfamily of TBDTs. *In silico* analyses indicated that the link with respiration appears to be conserved in other species. The native ligand remains to be identified, but current data indicate that CrtA^{Bp} might not be strictly specific to a single ligand but might function as a promiscuous transporter. This feature is presumably related to the chemical properties of copper, which exhibits high affinity for numerous organic compounds. The structure of CrtA^{Bp} was solved, identifying a conserved binding site of the copper-ligand complex that includes an invariant histidine residue with an essential role in transport.

The link between this copper-acquisition system and respiration via HCOs was confirmed by investigating CrpH, the protein encoded by the last gene of the operon also encoding CrtA^{Bp}. CrpH is an inner-membrane protein belonging to the PepSY_TM family, whose known members are reductases of Fe(III) to Fe(II). Our results show that, in *B. pertussis*, HCOs are particularly important under low-aeration conditions, whereas CydAB, the copper-independent cytochrome bd ubiquinol oxidase, plays a predominant role under high aeration. The *crpH* mutant displays a marked growth defect under low aeration, associated with a reduction in intracellular ATP levels, indicating impaired respiratory function. This hypothesis is further supported by the transcriptomic profile of the mutant. Under high aeration, however, the mutant behaves like its parent, owing to the activity of the CydAB complex. The effect of substituting conserved His residues of CrpH suggests that it coordinates a heme group essential for its activity, similar to other PEPSY_TM enzymes. By analogy with the latter proteins, CrpH might act as a Cu(II) to Cu(I) reductase, thereby facilitating copper insertion into the active site of one or both HCOs of *B. pertussis*. This hypothesis is supported by partial functional redundancy between CrpH and CcoG, a copper reductase involved in the assembly of the cbb₃-type cytochrome c oxidase in other bacterial species. Finally, mouse infection experiments showed that both CrtA^{Bp} and CrpH are important for the *in vivo* competitiveness of *B. pertussis*.

Résumé

Le cuivre est un élément essentiel à la survie des bactéries, car il est retrouvé notamment dans le site actif de plusieurs enzymes clés. Toutefois, lorsqu'il est présent en excès, il devient hautement toxique. Les bactéries doivent donc maintenir un équilibre fin entre l'acquisition de cuivre et la protection contre sa toxicité. Alors que les mécanismes de défense contre le cuivre sont relativement bien caractérisés, les systèmes d'importation restent encore peu connus.

Cette thèse a permis de caractériser un nouveau système d'acquisition du cuivre chez l'agent de la coqueluche, *Bordetella pertussis*. Il s'agit d'un transporteur TonB-dépendant (TBDT), nommé CrtA^{Bp} (anciennement BfrG). Nos expériences *in vitro* montrent que CrtA^{Bp} importe le Cu(II) complexé à un ligand possédant des groupements carboxylates. Le cuivre importé via CrtA^{Bp} est destiné aux cytochromes oxydases à hème-cuivre (HCOs). Par analyses de similarité de séquence, nous avons pu définir la sous-famille CrtA de TBDTs. Le lien de ces protéines avec la respiration semble être conservé dans d'autres espèces. Le(s) ligand(s) naturel(s) reste(nt) à identifier. Nos données indiquent que CrtA^{Bp} n'est probablement pas strictement spécifique d'un seul ligand mais pourrait agir comme transporteur 'opportuniste'. Ce mode de fonctionnement pourrait être lié aux propriétés chimiques du cuivre, qui possède une forte affinité pour de nombreux composés organiques. La structure de CrtA^{Bp} a été résolue et le site de fixation du complexe cuivre-ligand a été localisé, révélant le rôle essentiel d'une histidine dans le transport.

Le lien entre ce système d'acquisition du cuivre et la respiration via les HCOs a été confirmé en étudiant CrpH, la protéine codée par le dernier gène de l'opéron qui inclut aussi *crtA*. CrpH est une protéine de la membrane interne de la famille PepSY_TM, dont les membres connus sont des réductases de Fe(III) en Fe(II). Nos résultats montrent que, chez *B. pertussis*, les HCOs sont particulièrement importantes en conditions de faible aération, contrairement à CydAB, la cytochrome bd ubiquinol oxydase indépendante du cuivre, qui est nécessaire surtout en forte aération. L'inactivation de *crpH* cause un important défaut de croissance de *B. pertussis* en faible aération, associé à une diminution notable du niveau intracellulaire d'ATP, indiquant un dysfonctionnement respiratoire. Cette hypothèse est confortée par l'analyse transcriptomique du mutant. En revanche, en forte aération, le mutant se comporte comme la souche sauvage, notamment grâce à l'activité de CydAB. L'effet de la substitution de résidus His conservés sur la croissance de *B. pertussis* indique que CrpH coordonnerait au moins un hème indispensable à son activité, comme les autres enzymes de la famille PepSY_TM. Par analogie avec ces derniers, CrpH pourrait agir comme réductase de Cu(II) en Cu(I), en vue de son insertion dans le site actif d'une ou des deux HCOs de *B. pertussis*. Cette hypothèse est appuyée par une redondance fonctionnelle partielle entre CrpH et CcoG, une réductase de cuivre impliquée dans l'assemblage de la cytochrome c oxydase de type *cbb₃* chez d'autres bactéries. Enfin, des expériences d'infection chez la souris montrent que CrtA^{Bp} et CrpH sont toutes deux importantes pour la compétitivité de *B. pertussis in vivo*.