THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 05 juillet 2024 par

Marianne BROC

Etude d'une nouvelle famille de Formiate déshydrogénases chez *Bacillus subtilis*

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Microbiologie

École doctorale
ED62 – Science de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire de Chimie Bactérienne

Institut de Microbiologie de la Méditerranée

Centre National de la Recherche Scientifique

Composition du jury

Dr. Tristan WAGNER Institut Max Planck (Bremen)	Rapporteur
Prof. Dr. Jörg STÜLKE Institut de Microbiologie et Génétique (Göttingen)	Rapporteur
Prof. Dr. Catherine DUPORT INRAE (Avignon)	Examinatrice
Dr. Barbara SCHOEPP-COTHENET BIP (Marseille)	Présidente du jury
Dr. Axel MAGALON LCB (Marseille)	Directeur de thèse
Dr. Anne WALBURGER LCB (Marseille)	Co-directrice de thèse

LABORATOIRE DE CHIMIE BACTÉRIENNE

AFFIDAVIT

Je soussignée Marianne BROC déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique d'Axel MAGALON et d'Anne WALBURGER, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 03 mai 2024.



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PARTICIPATIONS AUX CONFERENCES

I. Liste des publications[1] réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Arias-Cartín R., Uzel A., Seduk F., Gerbaud G., Pierrel F., **Broc M.**, Lebrun R., Guigliarelli B., Magalon A., Grimaldi S., Walburger A.. Journal of Biological Chemistry 2022. Identification and characterization of a non-canonical menaquinone-linked formate dehydrogenase. DOI : 10.1016/j.jbc.2021.101384
2. Meneghello M., Uzel A., **Broc M.**, Manuel R.R., Magalon A., Léger C., Pereira I.A.C., Walburger A., Fourmond V., Angewandte Chemie 2022. Electrochemical kinetics supports a second coordination sphere mechanism in metal-based Formate dehydrogenase. DOI : 10.1002/anie.202212224
3. **Broc M**., Cherrier M.V., Uzel A., Arias-Cartín R., Arnoux P., Brasseur G., Seduk F., Guigliarelli B., Legrand P., Pierrel F., Schoehn G., Maté MJ., Marsetin L., Grimalsi S., Nicolet Y., Magalon A., Walburger A.. Nature Structural and Molecular Biology. A conserved helical membrane plug-in for Quinone reductases. En cours de revision.
4. **Broc M**., Lizen L., Shintu L., Gagnot S., Bornet O., Magalon A., Walburger A.. A respiratory FDH helps to cope with formic acid stress. En cours de rédaction.

II. Participation aux conférences[2] et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. Groupe Français de Bioénergétique (GFB21), Septembre 2021, en ligne – **Présentation orale**
2. 12th Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference (MoTEC21), en ligne, Septembre 2021 – **Poster**
3. Junior Scientist Microbiology Meeting of Marseille (JSM3), Marseille, Mai 2022 – **Poster** (3ème prix du meilleur poster)
4. 21st European Bioenergetics Conference (EBEC22), Aix-en-provence, Août 2022 – **Poster et Membre de l'organisation**
5. Bacterial Network Conference and Training (BacNet22), EMBO, San-Feliu-de-Guixoll, Septembre 2022 – **Poster**
6. Junior Scientist Microbiology Meeting of Marseille (JSM3), Marseille, Mai 2023 – **Présentation orale**
7. Groupe Français de Bioénergétique (GFB23), Bédoin, Septembre 2023 – **Présentation orale**

---

[1] Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU.

[2] Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » … etc.

RESUME

Depuis la révolution industrielle, les émissions de gaz à effet de serre dans l'atmosphère par les activités humaines n'ont cessé d'augmenter, jusqu'à atteindre un niveau critique au cours des dernières décennies. Parmi ces gaz, on retrouve notamment le CO_2. Ainsi, de nouveaux axes de recherche se sont orientés vers le développement de stratégies biotechnologiques visant à dépolluer l'atmosphère. Parmi les systèmes prometteurs, on retrouve les Formiate déshydrogénases métalliques (FDH) qui sont des enzymes catalysant l'oxydation du formiate en CO_2 (FDH) ou la réduction du CO_2 en formiate (CO_2R). Leur totale compréhension se heurte à l'impressionnante diversité existant au sein de cette famille d'enzyme et à la caractérisation d'un nombre trop restreint de membres. De ce fait, des questions importantes concernant le mécanisme catalytique, la sensibilité à l'oxygène, ou encore la diversité de la composition modulaire sont toujours en suspens. Cet état des lieux de la littérature pousse donc à vouloir caractériser de nouvelles FDH, et l'étude de systèmes non-canoniques semble être une approche pertinente pour aborder ces questions sous un nouvel angle. Dans ce contexte, mon projet de thèse a porté sur la caractérisation d'une nouvelle famille de FDH atypique, ForCE, chez la bactérie modèle *Bacillus subtilis*. Contrairement aux autres FDH, les ForCE possèdent un site actif non consensus et un module partenaire ForE inédit. Dans un premier temps, j'ai caractérisé ces enzymes sur les plans biochimique et enzymatique, en démontrant que la ménaquinone est l'accepteur terminal d'électron physiologique lors de l'oxydation du formiate en CO_2. Également, j'ai démontré que ces enzymes œuvrent en qualité de déshydrogénases primaires lors de la respiration aérobie chez *B. subtilis*, révélant pour la première fois l'existence d'un métabolisme du formiate chez cette bactérie. A travers des approches structurales et cellulaires, j'ai montré que le module partenaire ForE assure l'interaction du complexe ForCE à la membrane via un domaine HMP amphipatique. A l'aide d'analyses bio-informatiques, j'ai montré d'une part que ce module ForE est commun à d'autres oxydoréductases telles que les NADH déshydrogénases de type II ou les Sulfide quinone réductases ; et révélé d'autre part une diversité modulaire inexplorée autour des sous-unités catalytiques de FDH à extension N-terminale. Enfin, j'ai montré que le formiate devient toxique pour *B. subtilis* lorsque que cette dernière le rencontre dans des conditions où le pH environnemental est acide. Dans ce contexte, l'enzyme ForCE2 participe à la détoxification du formiate afin de limiter l'impact de ce dernier sur la croissance de la bactérie.

Mots clés : FDH, formiate, ménaquinone, respiration, domaine HMP, structure, métabolisme, acidité

ABSTRACT

Since the industrial revolution, emissions of greenhouse gases such as CO_2 into the atmosphere by human activities have been rising steadily, reaching critical levels in recent decades. As a result, new lines of research are focusing on the development of biotechnological strategies to clean up the atmosphere. Promising systems include metal Formate dehydrogenases (FDH), enzymes that catalyze the oxidation of formate into CO_2 (FDH) or the reduction of CO_2 into formate (CO_2R). Their comprehensive understanding is hindered by the remarkable diversity within this enzyme family and the limited characterization of its members. Thus, important questions concerning the catalytic mechanism, the oxygen sensitivity and the diversity of the modular composition are still unanswered. This state of the art in the literature therefore leads to the desire to characterize new FDH, and the study of non-canonical systems seems to be a relevant approach to tackle these questions from a new angle. In this context, my thesis project focused on the characterization of a new family of atypical FDH, ForCE, in the model bacterium *Bacillus subtilis*. Unlike other FDH, ForCEs have a non-canonical active site and a novel ForE partner module. I first characterized these enzymes biochemically and enzymatically, demonstrating that menaquinone is the physiological terminal electron acceptor upon oxidation of formate into CO_2. I also demonstrated that these enzymes act as primary dehydrogenases during aerobic respiration in *B. subtilis*, unveiling for the first time the existence of a formate metabolism in this bacterium. Using structural and cellular approaches, I demonstrated that the ForE partner module ensures the interaction between ForCE and the membrane thanks to its amphipathic HMP domain. Using bioinformatics analyses, I (1) showed that this ForE module is shared by other oxidoreductases such as type II NADH dehydrogenases and sulfide quinone reductases, and (2) revealed the unexplored modular diversity around the N-terminally extended catalytic subunits of FDH. Finally, I have shown that formate becomes toxic for *B. subtilis* when encountered under acidic environmental conditions. In this context, the ForCE2 enzyme participates in the detoxification of formate to limit its impact on bacterial growth.

Keywords : FDH, formate, menaquinone, respiration, HMP domain, structure, metabolism, acidity

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je souhaiterai remercier Tristan Wagner, Jörg Stülke, Barbara Schoepp-Cothenet et Catherine Duport d'avoir accepté de faire parti de mon jury et d'évaluer mes travaux de thèse.

Ensuite, je souhaiterai remercier mes deux directeurs de thèse, Anne et Axel, envers qui j'exprime une profonde reconnaissance pour tout ce qu'ils m'ont apporté durant ces quatre années.

Anne, par où commencer. En faisant la rétrospective de cette thèse, je réalise la chance que j'ai eu de t'avoir comme encadrante. La chance d'avoir été résolument épaulée pour faire face aux challenges de la thèse. Merci de m'avoir poussé à me dépasser. Ta douceur et ta bienveillance m'ont été précieuses. Ta franchise et ton honnêteté ont instauré une relation de confiance entre nous, et je ne peux qu'être reconnaissante de cela. Nous avons partagé le même bureau pendant quatre ans, dans lequel nous avons travaillé, échangé, ri, et fait des commérages (oups) sur tout et son contraire. Une chose est sûre, nous nous sommes bien trouvées. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tant sur les plans scientifiques qu'humains, et j'ai adoré partager l'aventure de la thèse avec toi. Alors merci pour tout.

Axel, quelle chance également de t'avoir eu à mes côtés. J'ai apprécié travailler avec toi car ta capacité à jongler entre exigence et bienveillance m'a toujours poussé à me dépasser tout en me mettant en confiance. J'ai énormément appris à tes côtés, et admiré ta curiosité et ton savoir immense de la science. Je suis reconnaissante de l'investissement que tu as consacré à ma thèse, et de l'énergie que tu as engagé pour te rendre disponible dès que j'en ai eu besoin. Merci d'avoir trouvé les mots pour me donner du courage lors de la fin de rédaction. Tu m'as dis être fier de moi, à mes yeux ce n'est pas rien. Pour tout cela, un grand merci.

Egalement, un grand merci aux autres membres de l'équipe. Pendant ces quatre années à vos côtés, j'ai ressenti beaucoup d'entraide, de soutien et de bienveillance générale. Je me suis sentie bien et à ma place dans l'équipe, tout ça grace à vous, alors merci.

Milica, merci d'avoir été comme la grande sœur du labo. Tu le sais, au début, je ne m'ouvre pas facilement aux gens. Et pourtant, six mois seulement après ton arrivée dans l'équipe nous partions ensemble en vacances à Istanbul. Alors merci d'être devenue quelqu'un de confiance, une amie sur qui je peux compter et qui n'a cessé de me soutenir durant cette thèse. Merci pour tout ces beaux souvenirs de rires, de fêtes, de confidences et de voyages. Merci d'avoir retourné le labo en chantant du Damso avec moi, et merci pour les dégustations de ta célèbre Margarita. Je finirai par une phrase que tu as dite un jour et qui résume plutôt bien tout ça : « We came to Istanbul together, so now we're like sisterhood ».

Laura, merci d'avoir été si bienveillante à mon égard. Ta joie de vivre et ta gentillesse sont un vrai bonheur au quotidien. Merci pour ton amitié, d'avoir été là quand ça n'allait pas et d'avoir toujours veillé à ce que je me sente bien. J'ai beaucoup apprécié travailler et échanger avec toi sur ce projet commun, à tel point que je me suis même surprise à dire des expressions belges, c'est dire. « Fais à t'naise », quel bête truc quand même... Maintenant, le relais du projet est passé et je te souhaite de réussir et de t'épanouir autant que possible. Que la ForCE soit avec toi comme on dit. Kakou Kakou.

Sybille, merci pour ta bonne humeur au quotidien. Tu es une personne rayonnante avec qui j'ai apprécié échanger et rigoler. Merci d'avoir toujours complimenté mes lab meetings, tu as été un peu comme ma plus grande fan dans ces moments là et ça m'a sensiblement touché.

Farida, merci de m'avoir transmis tes connaissances et ton savoir faire. Quand on a un doute sur une manip, pour sûr, on demande à Farida. Je sais que mon côté bordélique t'as fais cauchemarder, tout comme ton sens intransigeant du rangement m'a souvent dépassé. Pour autant, un équilibre a été trouvé et j'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés. Alors merci pour ta bienveillance et ton investissement envers moi durant toutes ces années.

Aude, merci pour ta compagnie et bon courage pour la dernière année !

Stéphane, merci pour ta sympathie et pour tes lab meetings incroyables. "Spin me baby one more time", ça c'est de l'art.

Enfin, petit clin d'oeil aux anciens membres de l'équipe avec qui j'ai également partagé de bons moments.

Alex (loulou) et les heures entières passées dans la salle des centrifugeuses à chanter du High School Musical à tue tête.
Théo AKA Rossignol, et la chasse aux post-it infernale.
Rodrigo, des barres de rires depuis le stage de L3. Je t'attends toujours pour te mettre la raclée au badminton.

Marie-Camille, j'ai toujours ton petit mot sur ma paillasse.
Laëtitia, un soutien sans faille pour l'oral de Master et le concours de l'école doctorale.

En dehors de l'équipe, merci aux autres personnes avec qui j'ai aimé passer du temps au labo.

L'équipe Py, merci pour les cafés et les repas en votre compagnie. J'ai ri à vos côtés et aimé prendre part à vos conversations les plus grotesques et farfelues. Petite mention spéciale à Pierre et Yohann en souvenir du Delta festival, et à Corinne pour ton aide avec les manips et tes cocktails en soirée.

Florence, merci pour ta douceur et le partage de ta passion pour la musique. J'ai adoré faire les cours de chant pour Noël, et découvrir l'opéra grâce à toi.

Merci aux copains Camille, Clémentine, Lucas, Prunelle, Ambre, Giulia, Romain … avec qui j'ai rigolé et apprécié boire des coups, faire des soirées et discuter aux abords du labo et ailleurs.

Dono et Alex, merci pour votre amitié. Vous êtes deux belles rencontres avec des qualités humaines que j'estime, et avec qui j'ai apprécié partager des activités en tout genre telles qu'une soirée raclette, un scénario JDR, une exposition sur les pharaons, une négociation de cloporte d'élevage ou encore un atelier de fabrication de rhum arrangés.

Enfin, merci à mes amis les plus proches du labo, sans qui je n'aurai certainement pas vécu cette thèse aussi bien.

Mathieu, ou devrais-je dire Peschasse. Unis depuis le Master par la passion du barbecue, de Top chef et de la raclette. Merci pour ces 6 ans d'amitié remplis de souvenir en tout genre … Mais essayer de tous les citer serait bien trop long. Sur ces belles paroles, topette !

Corentin et Nolan, ce duo infernal avec lequel j'ai littéralement exploré les six coins de la France. Merci pour ces souvenirs de vacances, de voyages, de randonnées et d'amitiés incroyables qui ont rythmé cette dernière année.

Nolan, nos âmes de Road-Tripper ne pouvaient que bien matcher, mais au-delà de ça, j'ai découvert ta bienveillance et ta sensibilité. Alors merci d'avoir toujours fais preuve d'écoute et de gentillesse à mes côtés.

Corentin, ce qui nous lie c'est certainement qu'on s'apprécie tout autant qu'on s'insupporte. Car après tout, rappelles-toi qu'on a d'abord commencé par se détester. Mais finalement, le roi du sarcasme n'aurait-il pas rencontré son alter ego en personne ? Alors merci d'avoir été là pendant cette thèse, merci de m'avoir fait rire si souvent et de m'avoir épaulée. Merci d'avoir toujours cherché à me comprendre et de m'avoir poussé à prendre confiance en moi. Ton empathie et ta sensibilité font indéniablement parties de tes qualités.

Aussi, ces dernières lignes sont pour moi. Pour me remercier d'avoir été courageuse dans les moments de doutes, pour me féliciter d'avoir été persévérante et résiliente face aux échecs, et pour ne jamais oublier d'être fière de moi et de tout ce travail accompli.

SOMMAIRE

AFFIDAVIT 1
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PARTICIPATIONS AUX CONFERENCES 2
RESUME 3
ABSTRACT 4
REMERCIEMENTS 5
SOMMAIRE 9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 13
CHAPITRE 1 : LE FORMIATE 15
A. Généralités 15
B. Production de formiate par les microorganismes 16
1. La fermentation acide-mixte 16
2. La décarboxylation de l'oxalate 19
3. La voie de Wood Ljungdahl 22
C. Trafic du formiate à travers l'enveloppe cellulaire 24
1. Généralités sur les transporteurs membranaires 24
2. Les transporteurs de formiate 25
a. Les Transporteurs Formiate-Nitrite (TFN) 25
(i). Découverte des TFN 25
(ii). Caractérisation structurale des TFN 28
(iii). Spécificité de substrat 30
(iv). Mécanisme de transport de l'anion : les questions en suspens 31
b. L'antiporteur oxalate/formiate (AOF) 33
3. Diffusion passive du formiate à travers les membranes 36
D. Les microorganismes face au stress acide 38
1. Importance du maintien de l'homéostasie intracellulaire 38
2. Les mécanismes de protection face au stress acide 40
a. Efflux des protons hors de la cellule 40
b. Consommation des protons et production de composés alcalins 42
c. Protection des constituants cellulaires 42
CHAPITRE 2 : LES FORMIATE DESHYDROGENASES 45
A. Généralités 45
B. Le site actif des FDH/CO_2R 48
1. Disponibilité en Mo et W dans l'environnement 48

2. Le cofacteur à molybdène/tungstène 49
3. La sulfuration du métal 51
4. La sensibilité à l'oxygène du site actif 52
5. Mécanisme catalytique 54
a. Deux modèles qui s'opposent 54
b. Importance des résidus à proximité du Moco 56
6. L'accès du substrat au site actif 57
C. Organisation modulaire des FDH/CO_2R 60
1. La sous-unité catalytique 60
2. Les sous-unités partenaires 61
a. Diversité des modules et voies métaboliques 61
b. Directionnalité des FDH/CO_2R 65
D. Evolution des FDH 67
OBJECTIFS DE THESE 72
RESULTATS 75
Partie 1a : Caractérisation des enzymes FDH non-canoniques : ForCE1 et ForCE2 76
Partie 1b 104
Partie 2 : Le métabolisme du formiate chez *Bacillus subtilis* 156
DISCUSSION 181
A. Les ForCE, des enzymes non modèles 182
1. Le site actif non-canonique 182
2. Rôle du centre [2Fe-2S] au sein de l'enzyme 185
B. Pourquoi deux enzymes ForCE chez *Bacillus subtilis* ? 187
1. L'opéron *forCE1* sous le contrôle de la réponse générale au stress 188
2. ForCE1 et ForCE2 : des enzymes jumelles mais différentes 190
C. Une protéine à module HMP pour optimiser la respiration ? 192
D. Une protéine à domaine HMP peut-elle recruter différents types de sous-unité catalytique ? 194
1. Un motif V-shape universel pour connecter les oxydoréductases et les protéines HMP ? 195
2. ForE, un module «plug- and-play »? 197
REFERENCES 203
ANNEXES 227

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LE FORMIATE

A. Généralités

L'acide formique, aussi connu sous le nom d'acide méthanoïque, est le plus simple des acides carboxyliques. Sa formule chimique est HCOOH. Le formiate est la base conjuguée de l'acide formique, de formule $HCOO^-$. Il s'agit d'un acide faible dont le pK_a est égal à 3,75 (Kammel et al. 2022). De par ses propriétés acides et réductrices, le formiate est utilisé dans différents domaines industriels. Notamment, il est ajouté comme conservateur alimentaire (E237) en agroalimentaire et dans l'élevage animalier (Hietala et al. 2016).

A l'origine, l'acide formique a été découvert chez les fourmis et renommé d'après leur nom latin *formica*. En effet, les fourmis et autres insectes produisent du formiate dans leurs glandes exocrines et l'utilisent comme mécanisme de défense en l'expulsant sur leurs ennemis (Pietzke, Meiser, et Vazquez 2020). Plus tard, d'autres études ont montré que le formiate était également produit chez les mammifères, les plantes, les champignons ou encore les microorganismes (Pietzke, Meiser, et Vazquez 2020; Murgia et al. 2020; Kuwazaki et al. 2003; Leibig et al. 2011). Ainsi, il est retrouvé dans le système digestif des mammifères, dont l'humain, en étant produit par le microbiote (Huang et al. 2008). De manière intéressante, cette étude a montré que le formiate joue un rôle clé dans le processus d'invasion du pathogène *Salmonella enterica* dans l'intestin chez la souris. Notamment, en présence de formiate, le niveau d'expression des gènes de synthèse du flagelle diminue tandis que celui des gènes d'invasion augmente (D. Mukherjee et Chakravortty 2024), permettant à la bactérie d'initier l'infection des cellules après avoir colonisé l'appareil digestif. Ainsi, il semblerait que le formiate soit perçu par la bactérie comme un signal lui indiquant son arrivée dans la niche à coloniser. Par ailleurs, le formiate étant également produit par la bactérie elle-même lors de la fermentation en anaérobiose, il s'agit d'un mécanisme élégant permettant à *Salmonella* de contrôler les différentes étapes de l'infection en fonction de la concentration en oxygène dans l'environnement.

A travers cet exemple, l'importance du formiate pour la physiologie de la bactérie pathogène *Salmonella enterica* est mise en lumière, et nous verrons dans ce premier chapitre qu'il s'agit d'un composé au cœur de bien d'autres facettes du métabolisme microbien. En effet, les microorganismes en produisent via différentes voies allant de la fermentation à la fixation du CO_2 en passant par la décarboxylation de l'oxalate, et l'utilisent comme source de carbone et/ou

d'énergie. En parallèle, le formiate produit peut être exporté dans l'environnement, et réutilisé par d'autres microorganismes à des fins métaboliques. Pour l'exporter hors de la cellule ou y accéder depuis le milieu extracellulaire, nous verrons que les cellules utilisent des transporteurs spécialisés, mais s'appuient également sur sa capacité à diffuser passivement à travers les membranes. Enfin, le formiate étant un acide organique faible, il peut aussi se révéler nocif pour les cellules, notamment lorsque ces dernières font face à un stress acide. Ainsi, nous verrons quels sont les mécanismes mis en place par les microorganismes afin d'assurer leur survie dans de telles conditions.

B. Production de formiate par les microorganismes

1. La fermentation acide-mixte

La fermentation est un processus métabolique généralement anaérobie au cours duquel les microorganismes décomposent de grandes molécules organiques en molécules plus simples grâce à leurs actions enzymatiques (Sharma et al. 2020). La conservation de l'énergie au cours de ce processus s'effectue via la phosphorylation au niveau du substrat. Les microorganismes fermentaires se distinguent par les voies de fermentation mises en place, les substrats consommés et les produits générés. Notamment, les bactéries entériques telles qu'*Escherichia coli* sont connues pour effectuer la fermentation acide-mixte du glucose, aboutissant à la production d'éthanol et d'un mélange complexe d'acides : l'acétate, le lactate, le succinate et le formiate (Figure 1) (Vivijs et al. 2015).

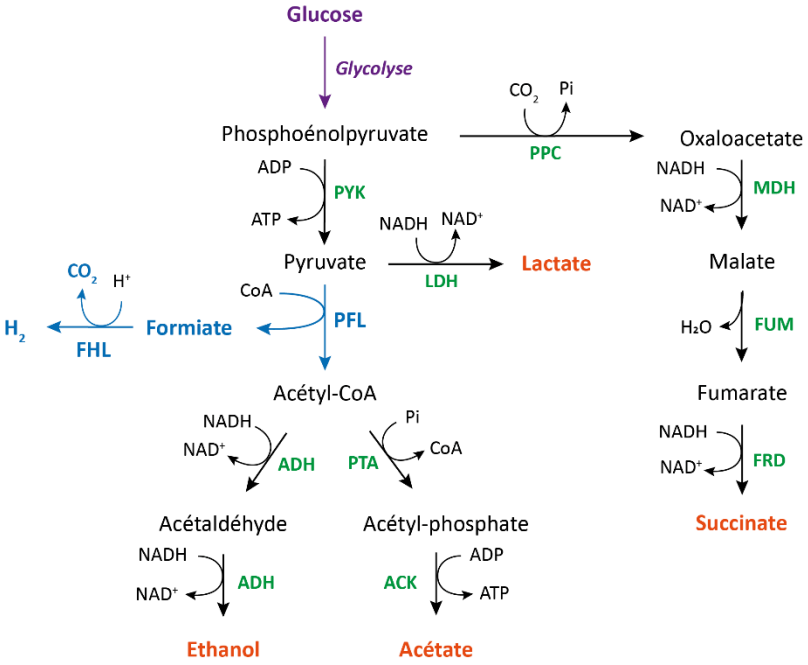


Figure 1 : La fermentation acide-mixte chez *E. coli*

La glycolyse, voie d'entrée du glucose dans la fermentation, est représentée par une seule flèche violette. Les produits finaux de la fermentation sont illustrés en orange. Les enzymes catalysant les différentes réactions sont représentées en vert. Les voies métaboliques relatives au formiate sont illustrées en bleu. PYK= Pyruvate kinase ; LDH= lactate déshydrogénase ; PFL = Pyruvate formiate lyase ; FHL= Formiate hydrogène lyase ; ADH= Acétaldéhyde déshydrogénase ; PTA= Phosphate acétyltransférase ; ACK= Acétate kinase ; PPC= Phosphoénolpyruvate carboxylase ; MDH= Malate déshydrogénase ; FUM = Fumarase ; FRD = Fumarate réductase. Figure adaptée de (Vivijs et al. 2015)

En premier lieu, le glucose est converti au cours de la glycolyse en phosphoénolpyruvate puis pyruvate. Ce dernier est ensuite redirigé vers deux voies différentes. D'une part, il est transformé en lactate par la Lactate déshydrogénase (LDH). D'autre part, il est transformé en acétyl-CoA par la Pyruvate Formiate Lyase (PFL). L'acétyl-CoA est ensuite utilisé pour produire de l'acétate et de l'éthanol. A travers ces différentes voies fermentaires, la cellule régénère son pool de NAD^+ et produit de l'ATP. Le métabolisme du formiate durant la fermentation acide-mixte chez *E. coli* est illustré Figure 2B. Le formiate est généré lors du clivage du pyruvate en acétyl-CoA par la PFL, d'après la réaction suivante :

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CoASH \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}SCoA + HCOOH$$

La PFL est un homodimère de 170 kDa produit sous une forme inactive *in vivo*. Son activation nécessite la modification post-traductionnelle d'un résidu glycine en radical glycyl ($G^{\cdot}$) au niveau du site actif (Shepard et Broderick 2010; G. Sawers et Watson 1998). Cette activation est effectuée par l'enzyme activatrice PFL-AE (PFL Activating Enzyme). Également, la PFL est une enzyme hautement sensible à l'oxygène. En effet, lorsque ce dernier diffuse jusqu'au site actif, il réagit avec le radical glycyl et entraine le clivage d'une partie la protéine (Andorfer et al. 2021). C'est pourquoi le fonctionnement de cette enzyme est uniquement possible en anaérobiose ou microaérobiose (Peters et Sargent 2023). Chez *E. coli*, PFL et PFL-AE sont respectivement encodées par les gènes *pflB* et *pflA*, organisés en opéron avec un troisième gène *focA* codant pour un transporteur du formiate (plus de détails section C.2) (Figure 2A). L'expression de l'opéron est régulée par trois promoteurs localisés en amont de ce dernier (R. Gary Sawers 2005). Leur transcription est contrôlée par les activateurs transcriptionnels FNR et ArcA répondant à la transition vers l'anaérobiose (G. Sawers 1993). Ainsi, le niveau de transcription de l'opéron *focApflBA* augmente d'un facteur ~15 lors d'une croissance en anaérobiose, et la mutation des boites de fixation de ArcA et FNR diminue significativement le niveau d'expression. En parallèle, un second opéron *pflCD* est présent sur le génome d'*E. coli*, et code pour un système PFL homologue. Le rôle de ce dernier dans le métabolisme fermentaire a été très peu étudié. Tandis que la simple délétion des gènes *pflA* et *pflB* en conditions fermentaires redirige les flux métaboliques vers la production de lactate uniquement (Figure 1), les simples mutants *ΔpflC* et *ΔpflD* fermentent comme la souche WT (Zhu et Shimizu 2004).

Lors de la fermentation acide mixte, près d'un tiers du carbone issu du glucose est transformé en formiate par la PFL (R.G. Sawers 2005). L'accumulation d'une telle quantité de formiate sans devenir dans le cytoplasme n'a pas d'avantage pour la cellule. En effet, le formiate ne

peut pas être utilisé comme source de carbone par *E. coli*, mais est cependant un très bon donneur d'électrons étant donné son potentiel rédox très électronégatif (–420mV).

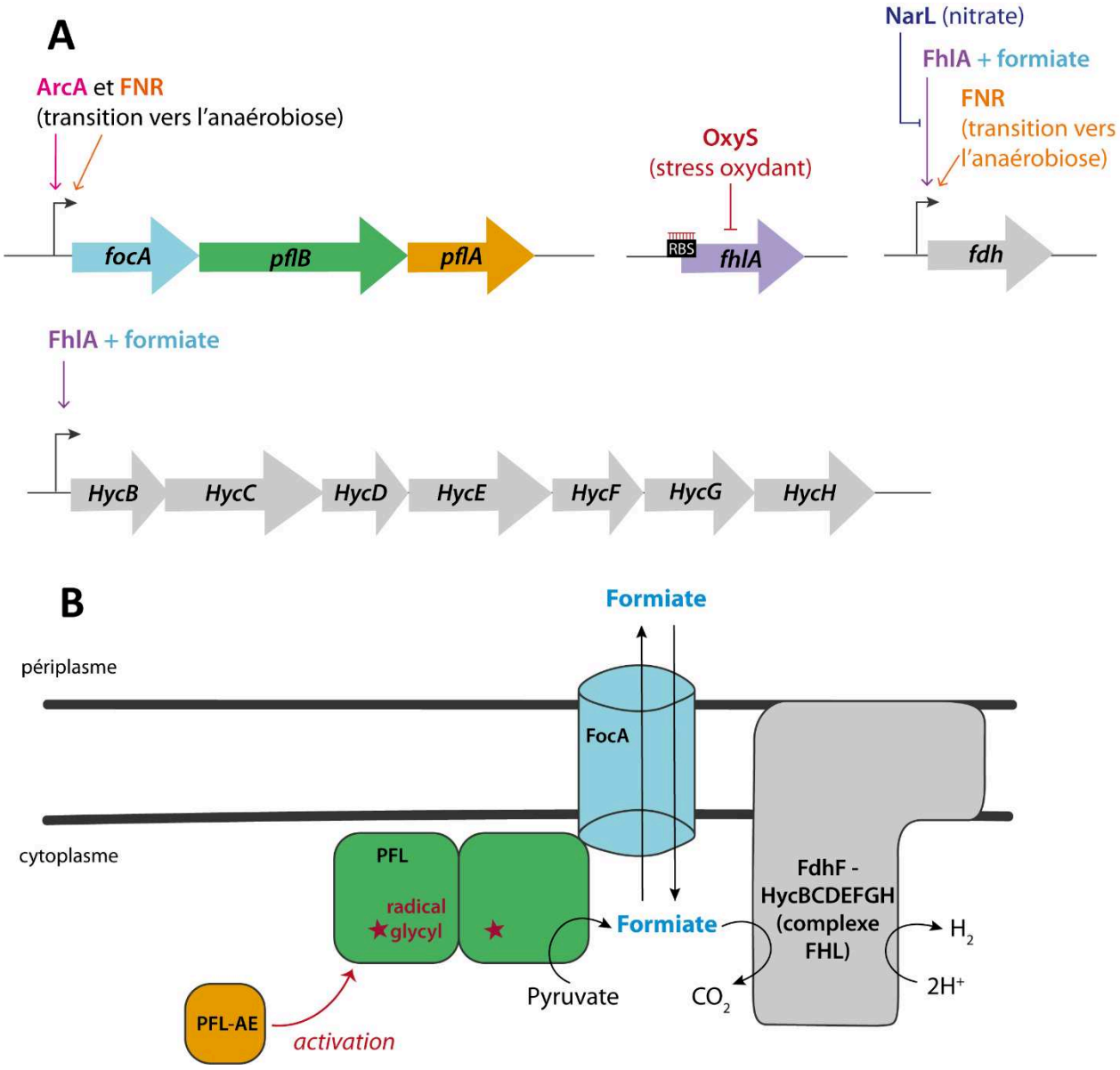


Figure 2 : Physiologie du formiate lors de la fermentation acide-mixte chez *E. coli*

A : Schématisation des gènes codants pour les différents acteurs du métabolisme du formiate lors de la fermentation. Les différentes régulations transcriptionnelles des gènes/opérons sont représentées par un seul promoteur (indiqué par une flèche noire) au-dessus duquel sont spécifiés les différents régulateurs et stimuli permettant leur régulation. La régulation traductionnelle est représentée par un carré noir correspondant au site de fixation du ribosome (RBS). La taille des gènes n'est pas à l'échelle. Schéma inspiré du site https://ecocyc.org/ et de (Sawers 1993; Iuchi et Lin 1993; Altuvia 1998; Wang et Gunsalus 2003)

B : Lors du passage en anaérobiose, l'enzyme PFL-AE (jaune) est produite et active l'enzyme PFL (vert) via la formation d'un radical glycyl. Une fois activée, la PFL convertie le pyruvate en formiate. Le formiate produit est exporté hors de la cellule par FocA (bleu), puis réimporté par ce dernier dans un second temps. Le formiate est ensuite disproportionné en CO_2 et dihydrogène par le complexe FHL (gris).

Afin d'exploiter ce formiate, *E. coli* est équipée de Formiate déshydrogénases (FDH) respiratoires capables d'oxyder le formiate, localisées dans le périplasme. Pour atténuer l'accumulation de cet acide faible dans le cytoplasme, le formiate est dans un premier temps exporté hors du cytoplasme par FocA (Figure 2B). En absence d'accepteurs terminaux d'électrons tels que l'oxygène ou le nitrate, il n'est pas consommé et est donc réinternalisé par FocA, puis disproportionné en CO_2 et H_2 par le complexe fermentaire Formiate Hydrogène Lyase (FHL), permettant la consommation de protons dans le cytoplasme. Les gènes codant pour le complexe FHL (*fdhf* et *hycBCDEFGH*) font partis du régulon formiate, dont l'expression est contrôlée par FNR et par l'activateur transcriptionnel FhlA (Iuchi et Lin 1993). La traduction de la protéine FhlA est réprimée par OxyS en condition de stress oxydant (Altuvia 1998). Ainsi, FhlA est produite lorsque la concentration en oxygène diminue, mais n'est seulement active qu'en présence de formiate (Hopper, Korsa, et Böck 1996). Une fois activée, la protéine se fixe sur l'ADN et recrute le facteur de transcription sigma^{54} permettant la transcription des gènes cibles du régulon formiate (Leonhartsberger, Ehrenreich, et Böck 2000). D'autre part, la fixation de FhlA en amont du gène *fdhF* est bloquée en présence de nitrate par le régulateur NarL (H. Wang et Gunsalus 2003). De cette manière, le complexe FHL n'est pas produit en présence de nitrate et le formiate est oxydé dans le périplasme par la FDH respiratoire, couplant la réaction à la réduction de quinones en quinols et alimentant la chaine de transport d'électrons (Pinske et Sawers 2016).

2. La décarboxylation de l'oxalate

La production de formiate est également possible via la décarboxylation de l'oxalate en formiate (Svedružić et al. 2007). L'oxalate étant communément présent dans les sols (Strobel 2001), il représente une source évidente de formiate pour les micro-organismes présents dans cet environnement et capables de le décarboxyler. Cette décarboxylation est catalysée par l'Oxalate décarboxylase selon la réaction suivante :

$$HOOC\text{-}COOH \rightarrow HCOOH + CO_2$$

La première Oxalate décarboxylase microbienne (OxdC) a été identifiée dans le cytoplasme de *Bacillus subtilis,* et est devenue l'une des Oxalate décarboxylases les mieux caractérisées à ce jour. Les différentes OxdC décrites jusqu'à présent partagent des propriétés communes. Si la présence d'oxygène est nécessaire à la catalyse (Shimazono et Hayaishi 1957; Reinhardt et al. 2003; Tanner et al. 2001), le mécanisme réactionnel n'est pas encore compris. Également, ces enzymes présentent un optimum d'activité lorsque le pH est acide (pH 4 pour OxdC de *Bacillus subtilis*) (Svedružić et al. 2005; Conter et al. 2019). L'expression du gène *oxdC* chez les champignons est

notamment induite par la diminution du pH extracellulaire ou l'ajout d'acides carboxyliques dans le milieu de culture. De la même manière chez *Bacillus subtilis*, OxdC est produite dans le cytoplasme en réponse à un stress acide (pH 5,4) (MacLellan, Helmann, et Antelmann 2009), et une activité significative de dégradation de l'oxalate est détectée (Svedružić et al. 2005). Tandis que la majorité des études réalisées à ce jour se sont penchées sur le mécanisme catalytique de l'enzyme, son rôle physiologique chez *B. subtilis* n'est pas bien compris. Néanmoins, une étude récente démontre qu'OxdC est également surproduite dans les cellules en conditions de vie communautaire comme le biofilm (Cui et al. 2020). Cette observation permet d'envisager une production formiate au sein du biofilm de *Bacillus subtilis*, dans le cas où la bactérie a accès à une source d'oxalate.

En explorant les voies métaboliques annotées au sein de la banque de donnée KEGG, je n'ai trouvé aucune enzyme permettant la production d'oxalate chez *B. subtilis*, suggérant que cette dernière le récupère dans son environnement. Les bactéries du genre *Oxalobacter* importent l'oxalate via le transporteur OxlT appartenant à la famille des Major Facilitating Proteins (MFS) (voir section C.3). En effectuant un Blast de la séquence d'OxlT *d'Oxalobacter formigenes* (Q51330) contre les génomes de *B. subtilis,* j'ai repéré deux transporteurs MFS putatifs YcxA et YbfB. Ces deux protéines partagent respectivement 17% et 21% d'identité avec OxlT, ce qui n'apporte aucune certitude sur le fait qu'il s'agisse réellement de transporteurs de l'oxalate.

Pour en revenir aux travaux de (Cui et al. 2020), la délétion du gène *oxdC* chez *B. subtilis* entraine également des changements au niveau de l'expression des gènes codant pour des déshydrogénases primaires. Les gènes *ndh* et *sdhABC* codant respectivement pour une NADH déshydrogénase et la succinate déshydrogénase sont induits dans la souche *oxdC*. Ceci souligne le fait qu'OxdC est vraisemblablement active dans le biofilm puisque sa délétion entraine des répercutions métaboliques sur la cellule, et que l'oxalate y est de ce fait disponible. A ce stade, le modèle proposé par les auteurs consiste à évoquer que le formiate issu de la décarboxylation de l'oxalate sert de donneur d'électron pour la respiration. Plus d'études sont cependant nécessaires pour évaluer la participation de cette voie dans la production endogène de formiate chez *B. subtilis*.

En parallèle, *B. subtilis* possède une seconde Oxalate décarboxylase OxdD (Tanner et al. 2001) qui partage 57% d'identité avec OxdC, et dont la prédiction de structure par Alphafold est hautement similaire à celle d'OxdC (PDB ID : 1J58) (Anand et al. 2002). Néanmoins, plusieurs études suggèrent qu'OxdC et OxdD exercent des fonctions physiologiques différentes au sein de la cellule. En effet, l'expression du gène *oxdD* est activée par SigK et GerE, qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la sporulation (Nicolas et al. 2012; T. Costa et al. 2004). Bien qu'OxdD présente une activité oxalate décarboxylase après expression hétérologue chez *E. coli* (Tanner et al. 2001), aucune production de formiate via OxdD n'est observée au sein de la spore

chez *Bacillus subtilis* (T. Costa et al. 2004). Dans cette même étude, les auteurs démontrent qu'OxdD est en réalité une protéine constituante de l'enveloppe sporale. Le métabolisme de la spore étant dormant (Tu et al. 2021), la cellule produit des protéines du métabolisme lors de la sporulation afin d'assurer un redémarrage de la croissance lors de la germination. Par analogie avec OxdC et sans apporter d'indices sur la source d'oxalate, ces travaux conduisent à s'interroger sur le rôle d'OxdD et d'une éventuelle production endogène de formiate lors du retour de la cellule à un état végétatif.

3. La voie de Wood Ljungdahl

Enfin, un troisième processus métabolique permettant la production de formiate chez les microorganismes est la voie de Wood Ljungdahl (WL). Il s'agit d'un processus métabolique clé chez les microorganismes autotrophes qui assurent leur croissance en transformant la matière inorganique en matière organique. Parmi les composés inorganiques utilisés comme source de carbone, on retrouve communément le dioxyde de carbone (CO_2), gaz atmosphérique ancestral ayant probablement contribué à l'apparition des premières formes de vie sur Terre (Fleury et al. 2017). A travers la voie de WL, le CO_2 fixé est transformé en acétyl-CoA via une succession de réactions enzymatiques, générant de multiples produits intermédiaires dont fait partie le formiate (Figure 3).

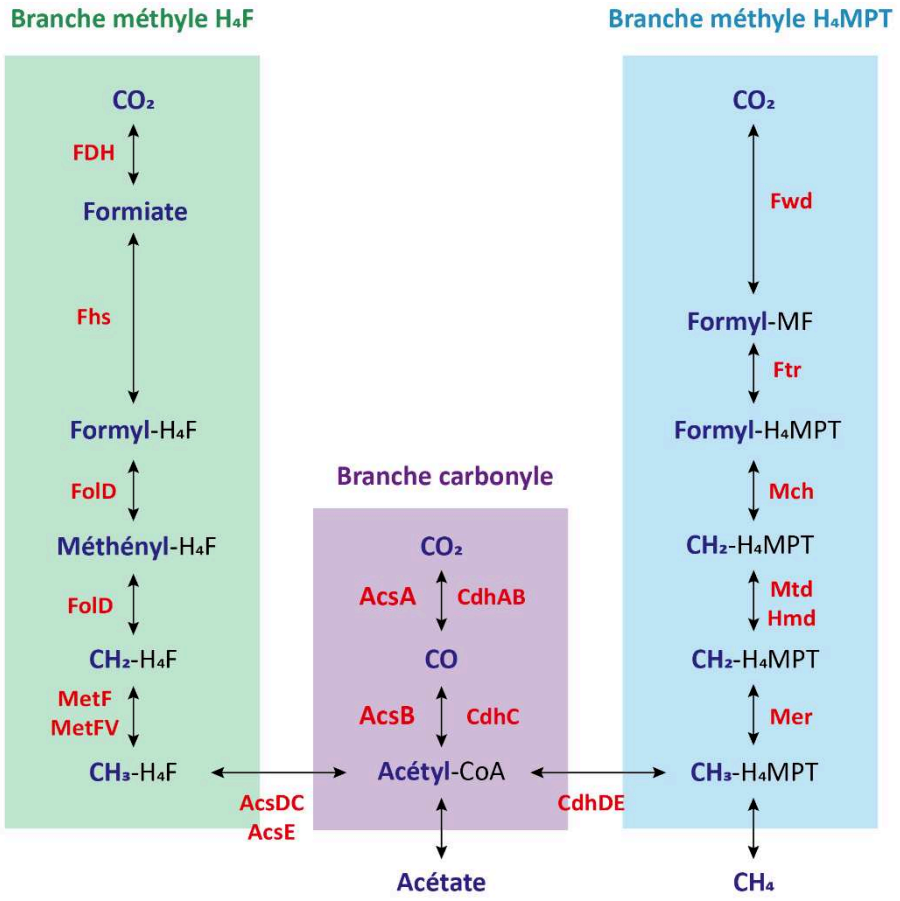


Figure 3 : La voie de Wood Ljungdahl (WL)

La voie de WL est composée d'une branche carbonyle (violet) et d'une branche méthyle (bleu et vert). Les organismes acétogènes réalisent la branche méthyle H_4F (vert), tandis que les organismes méthanogènes réalisent la branche méthyle H_4MPT (bleu). Les enzymes catalysant les différentes réactions sont représentées en rouge. Fwd = complexe formylmethanofuran déshydrogénase ; Ftr = formylmethanofuran:H4MPT formyltransférase ; Mch = méthényl-H_4MPT cyclohydrolase ; Mtd = méthylène-H4MPT déshydrogénase ; Hmd = méthylène-H_4MPT déshydrogénase formant de l'H_2 ; Mer = méthylène-H4MPT réductase ; CdhABCDE = complexe acétyl-CoA synthase/décarbonylase ; AscABDCE = complexe CO-méthylan acétyl-CoA synthase ; MetF = méthylène-H_4F synthase ; FolD = Méthényl-H_4F dehydrogenase /cyclohydrolase ; Fhs = Formiate-H_4F ligase. Figure adaptée de (Adam, Borrel, et Gribaldo 2019).

La voie de WL se distingue en deux branches appelées branche méthyle et branche carbonyle (Adam, Borrel, et Gribaldo 2019). La branche carbonyle, minimaliste, contient deux réactions permettant la réduction du CO_2 en CO puis en acétylCoA. La branche méthyle, plus complexe au regard du nombre de réactions enzymatiques qu'elle comporte, diffère selon les organismes. En effet, la fixation du CO_2 par la voie de WL aboutie à la production d'acétate chez les organismes acétogènes (Ragsdale et Pierce 2008) et à la production de méthane chez les organismes méthanogènes (Borrel, Adam, et Gribaldo 2016). Les branches méthyles acétogène et méthanogène diffèrent donc sur plusieurs points tels que les cofacteurs (H_4F ou H_4MPT) et enzymes utilisés, et les substrats intermédiaires générés. Le formiate est produit à partir du CO_2 lors de la première étape de la branche méthyle. Chez les acétogènes, un module FDH couple l'oxydation de l'H_2 en protons à la réduction du CO_2 en formiate (Lee et al. 2022). Chez *acétobacterium woodii*, la FDH est retrouvée au sein d'un complexe appelé HDCR (Hydrogen-dependent CO_2 reductase) (Schuchmann et Müller 2013). Chez les méthanogènes, le complexe Fwd réduit le CO_2 en formiate qui est directement pris en charge par ce même complexe pour être condensé en formyl-MF (Wagner, Ermler, et Shima 2016). Les complexes HDCR et Fwd seront décris plus en détail dans la section C.2.d. du chapitre 2. Également, la voie de WL peut fonctionner en sens inverse chez les organismes méthanotrophes ou acétogènes utilisant le méthane ou l'acétate comme source de carbone (Borrel, Adam, et Gribaldo 2016). Plus globalement, la conservation des gènes codant pour les différentes branches méthyles n'est pas systématique. De ce fait, on retrouve des voies de WL incomplètes dans certains phyla. D'un point de vue évolutif, cela soulève des interrogations toujours en suspens concernant l'ordre d'apparition de cette voie au sein des règnes archéen et bactérien (Adam, Borrel, et Gribaldo 2019). Toutefois, cette diversité donne également lieu à de la syntrophie entre espèces, avec notamment des échanges de formiate entre les organismes. Par exemple, certaines espèces du genre *Blautia* retrouvées communément dans le microbiote humain, sont des acétogènes dépourvus de FDH qui utilisent le formiate de leur environnement pour pousser, à défaut de pouvoir utiliser le CO_2 (Trischler et al. 2022). Une situation similaire a également été démontrée lors d'une co-culture entre la bactérie acétogène *Thermoacetogenium phaeum*, produisant du formiate à partir d'acétate par la voie de WL, et l'archée méthanogène *Methanothermobacter thermautotrophicus* incapable de fixer le CO_2 (Hattori et al., s. d.). Ces exemples illustrent l'importance du formiate en qualité de molécule échangeable donnant lieu à des interactions syntrophiques entre organismes dans des milieux anaérobies.

C. Trafic du formiate à travers l'enveloppe cellulaire

Dans la section précédente, nous avons vu que les microorganismes sont capables de produire du formiate à travers différentes voies métaboliques. Ce formiate peut être directement consommé par la cellule, ou devenir disponible pour d'autres organismes en étant exporté dans le milieu extracellulaire. Dans cette section, nous allons voir comment les microorganismes accèdent au formiate de leur environnement grâce à la diffusion passive de ce dernier ou à des transporteurs spécialisés dans son import.

1. Généralités sur les transporteurs membranaires

Les membranes cellulaires forment une bicouche protéolipidique imperméable aux molécules polaires et chargées. De ce fait, le passage des ions et autres molécules hydrophiles à travers les membranes nécessite une prise en charge par des transporteurs spécifiques. La classification des transporteurs du vivant est régulièrement mise à jour et comptait en 2021 plus de 50 superfamilles, catégorisées selon différents critères tels que l'homologie de séquence, la fonction, les motifs conservés, etc. (Saier et al. 2021; 2016).

Plus généralement, trois types majeurs de transport sont distingués (Figure 4). Tout d'abord, les transports nécessitant de l'énergie sont appelés transports actifs, et permettent la diffusion des molécules à l'encontre de leur gradient de concentration. (1) Lors d'un transport actif primaire, l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP (Joly et al. 2004). Les transporteurs à ATP binding cassette (ABC) notamment, sont constitués de modules permettant de fixer et d'hydrolyser l'ATP d'une part, et de fixer et transloquer le substrat d'autre part (Facey et Kuhn 2010). (2) Lors d'un transport actif secondaire, l'énergie est fournie par le gradient électrochimique. Le transport du substrat allant contre son gradient de concentration est ainsi permis par le co-transport d'un ion (H^+, Na^+, K^+, Cl^-, …) allant dans le sens de son gradient électrochimique (Lemieux 2008; Özkan et al. 2024). Parmi les transporteurs actifs secondaires, il existe les anti-porteurs et les symporteurs. Les anti-porteurs importent et exportent simultanément le substrat et l'ion, qui sont alors échangés de part et d'autre de la membrane. A l'inverse, les symporteurs co-transportent le substrat et l'ion dans une même direction. Enfin, (3) les transports ne nécessitant pas d'énergie sont appelés transports passifs, et sont plutôt dédiés à la diffusion facilitée des petites molécules et de l'eau (Özkan et al. 2024). Les aquaporines par exemple, facilitent le transport non exhaustif de l'eau, du glycérol, de l'H_2O_2 et du CO_2 (Tong et al. 2019). En opposition avec les transports actifs, le transport passif relève uniquement de l'équilibre des concentrations d'un soluté de part et d'autre de la membrane.

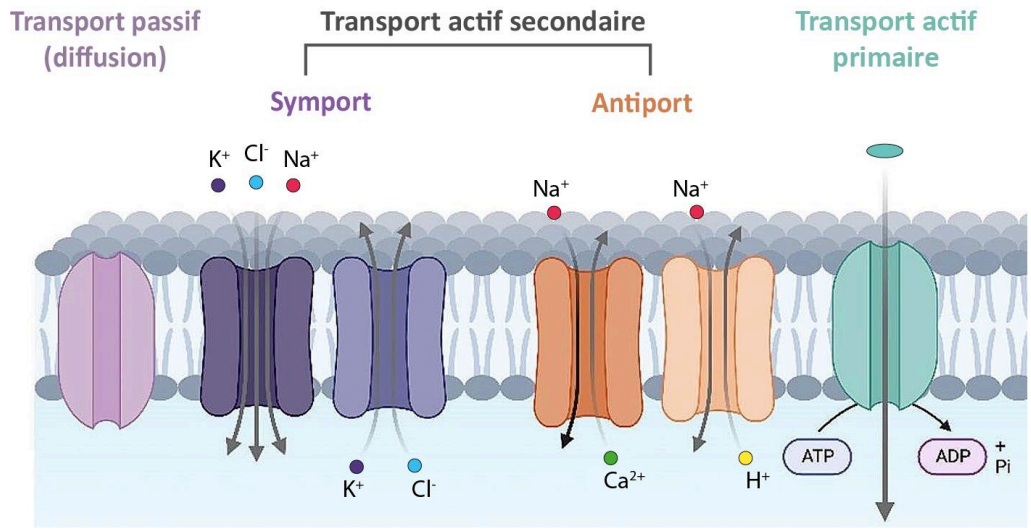


Figure 4 : Les différents types de transport

Les transports actifs utilisent de l'énergie pour déplacer le substrat contre son gradient de concentration. (1) Le transport actif primaire (vert) utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour franchir cette barrière énergétique. (2) Le transport actif secondaire utilise l'énergie du gradient électrochimique d'un autre soluté co-transporté avec le substrat (orange et violet). Les antiporteurs (orange) échangent le substrat et l'ion de part et d'autre de la membrane, tandis que les symporteurs (violet) les transportent dans la même direction. Enfin, (3) le transport passif (rose) diffuse le substrat à travers la membrane sans utiliser d'énergie. Schémas tiré de (Özkan et al. 2024).

2. Les transporteurs de formiate

a. Les Transporteurs Formiate-Nitrite (TFN)

Les Transporteurs Formiate-Nitrite (TFN) sont une famille de transporteurs membranaires permettant le transport d'anions monovalents à travers l'enveloppe cellulaire (Lü et al. 2013). Cette famille prend en charge trois principaux substrats : le formiate ($HCOO^-$), le nitrite (NO_2^-) et l'hydrogénosulfure (HS^-). A ce jour, le mécanisme de fonctionnement des TFN ainsi que le type de transport réalisé (actif ou passif) sont encore mal compris (Kammel, Pinske, et Sawers 2022).

(i). Découverte des TFN

L'existence d'un transport spécifique pour le formiate fut mise en lumière pour la première fois par Suppmann et al (Suppmann et Sawers 1994) en 1994, chez *E. coli.* Notamment, en utilisant une fusion transcriptionnelle entre le gène *lacZ* et le promoteur du gène *hycA* répondant à la présence de formiate, les auteurs ont démontré que la délétion du gène *focA* induit fortement l'expression de la fusion et entraine une accumulation de formiate dans la cellule. Autrement dit, ce dernier était produit mais pas exporté dans le milieu extracellulaire (Figure 5A).

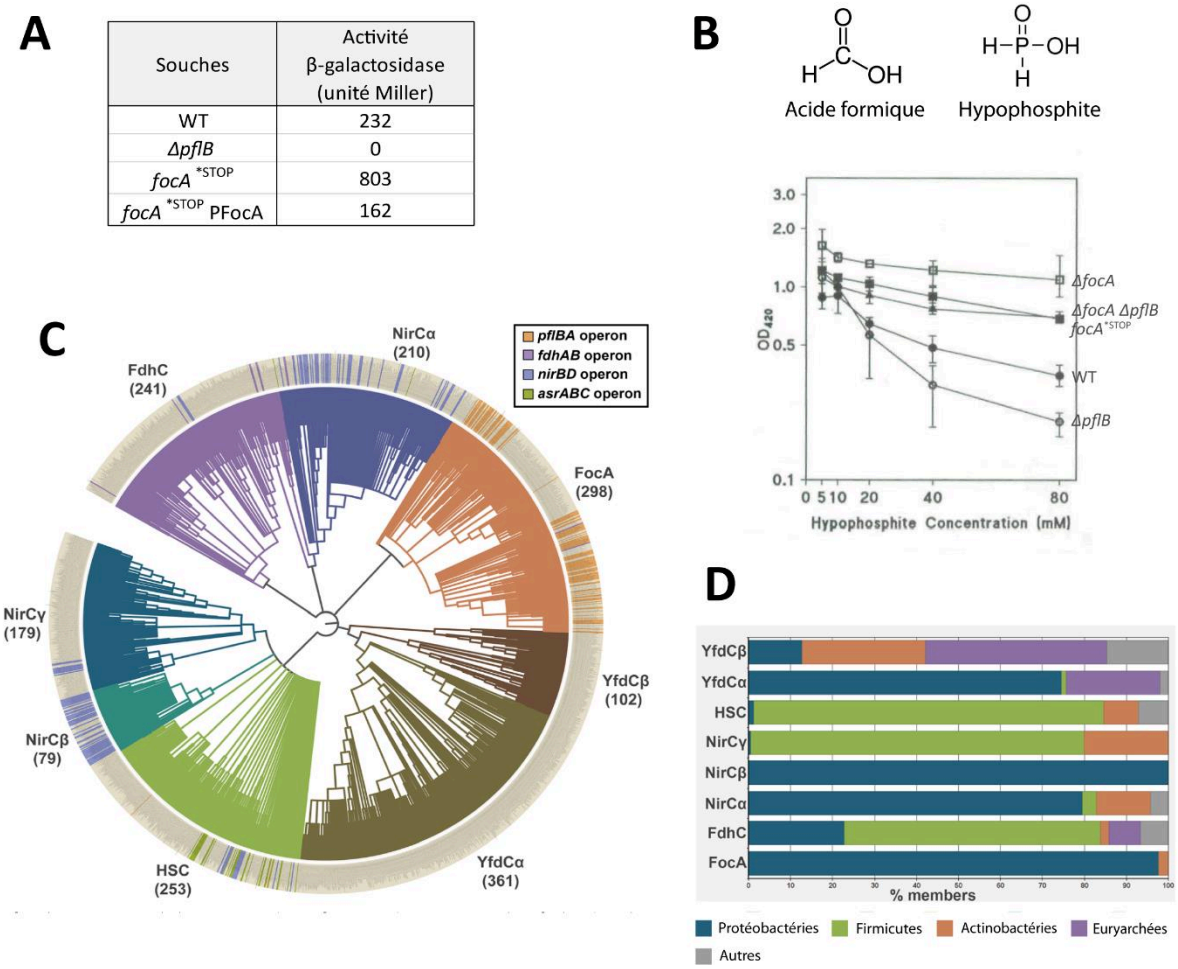


Figure 5 : Découverte et classification des TFN

A : FocA exporte le formiate intracellulaire produit lors de la fermentation. Le promoteur du gène *hycA* répondant à la présence de formiate a été fusionné au gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase. L'expression de la fusion P*hycA-lacZ* est utilisée comme rapporteur de la concentration de formiate intracellulaire. L'activité spécifique β-galactosidase a été mesurée sur des souches d'*E.coli* WT, *ΔpflB*, *focA*^{*STOP} contenant deux codons antisens au sein du gène *focA*, et *focA*^{*STOP} PFocA complémentée avec un plasmide permettant de surproduire FocA dans la souche précédemment décrite. En l'absence de PFL, aucun formiate n'est produit et l'activité β-galactosidase est nulle. En l'absence de FocA, le formiate produit par PFL s'accumule dans la cellule et l'activité β-galactosidase augmente significativement en comparaison avec celle de la souche WT. La surproduction de FocA dans cette même souche restaure un niveau WT d'activité β-galactosidase. Tableau créé à partir des données de (Suppmann et Sawers 1994).

B : FocA importe l'hypophosphite qui est un analogue toxique du formiate. La survie des souches WT (ronds pleins), *ΔpflB* (ronds vides), *ΔfocA ΔpflB* (carrés pleins), *focA*^{*STOP} (triangles pleins) et *ΔfocA* (carrés vides) a été mesurée en anaérobiose en présence de différentes concentrations en hypophosphite. La délétion ou l'inactivation du gène *focA* confère une résistance à l'hypophosphite en comparaison avec la souche WT. Figure tirée de (Suppmann et Sawers 1994). L'hypophosphite est un inhibiteur de la croissance pouvant se fixer de manière irréversible à la PFL *in vitro* chez *E. coli* (Knappe et al. 1984) et à la FDH chez *Syntrophus aciditrophicus* (Agne et al. 2022). Il entraine également un clivage de la molécule de pyruvate (Brush, Lipsett, et Kozarich 1988).

C : Analyse phylogénétique sur 1723 séquences de TFN procaryotes. Les séquences sont regroupées en huit sous-groupes différents (FocA, FdhC, NirC-α, NirC-β, NirC-γ, HSC, YfdC-α et YfdC-β), en tenant compte de leur distribution phylogénétique, leur environnement génomique, leurs membres caractérisés et les résidus ou motifs qui leurs sont spécifiques. Le nombre de séquences pour chaque groupe est indiqué entre parenthèse. La présence de l'opéron est indiquée dans le cercle extérieur avec les codes couleur correspondants. Figure tirée de (Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017).

D : Distribution taxonomique des séquences de TFN procaryotes présentées dans le panel 4C. Figure tirée de (Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017).

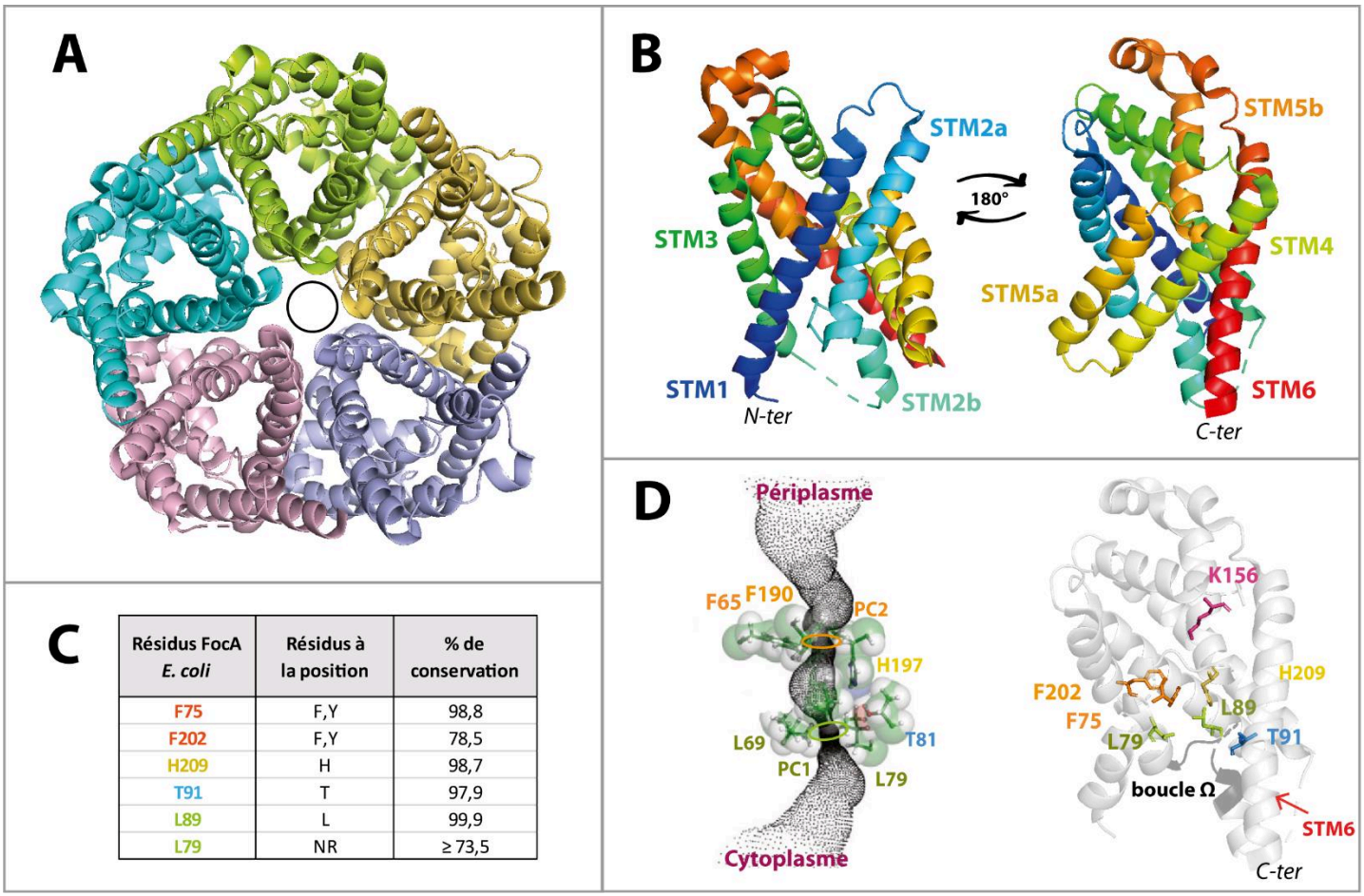
Pour aller plus loin dans la caractérisation de FocA, ils ont également cherché à savoir si cette protéine est impliquée dans l'import du formiate extracellulaire, après que ce dernier ait été exporté hors de la cellule. Pour cela, ils ont ajouté dans le milieu de culture un analogue toxique du formiate, l'hypophosphite, qui inhibe la croissance anaérobie d'*E. coli* (Figure 5B). Constatant que la délétion du gène *focA* entraine une résistance à l'hypophosphite, ils concluent que FocA permet également l'import du formiate au sein de la cellule. Par la suite, les TFN NirC (Clegg et al. 2002) et AsrD (aussi appelé HSC) (Czyzewski et Wang 2012) ont été respectivement attribués au transport du nitrite chez *E. coli* et de l'HS^- chez *Clostridium difficile* (Lü et al. 2013). Plus récemment, l'analyse phylogénétique de (M. Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017) sur plus de 1700 séquences de TFN microbiens a fourni une vue d'ensemble sur les différents types de TFN existants, en montrant notamment une répartition en 8 groupes distincts (Figure 5C). De manière intéressante, le positionnement des TFN déjà caractérisés au sein de l'arbre suggère que les séquences sont regroupées selon leur fonction métabolique. Par ailleurs, l'analyse de l'environnement génétique soutient ces observations. Comme c'est le cas sur le génome d'*E. coli,* un bon nombre de séquences du groupe FocA sont en opéron avec *pflBA* codant pour la PFL. Cette organisation génomique n'est pas retrouvée dans le groupe FdhC, où quelques séquences sont en opéron avec *fdhAB* codant pour une Formiate déshydrogénase. Les transporteurs du formiate FocA d'*E. coli* et FdhC de *Métanobacterium formicicum* (White et Ferry 1992) sont ainsi retrouvés dans deux groupes distincts (appelés FocA et FdhC). En parallèle, NirC d'*E. coli* est retrouvé dans le groupe NirC-β, contenant de nombreux membres en opéron avec *nirBD* encodant pour une Nitrite réductase cytoplasmique. Par ailleurs, deux autres groupes NirC-α et NirC-γ sont également distingués. La synténie avec *nirBD* est fortement retrouvée dans le groupe NirC-α, ce qui appuie sa classification en tant que groupe Nir. Cependant, très peu de séquences sont en synténie avec *nirBD* dans le groupe NirC-γ, et aucun membre n'y est caractérisé. C'est pourquoi la fonction métabolique de ce cluster reste incertaine. Enfin, au sein de l'unique groupe HSC, certaines séquences sont en opéron avec *asrABC* codant pour une sulfite réductase, et on y retrouve la protéine HSC caractérisée chez *Clostridium difficile*. Pour finir, les deux groupes YfdC-α et YfdC-β n'ont pas de membres caractérisés, et leurs gènes respectifs n'ont pas de synténie particulière, ils transportent donc des substrats inconnus à ce jour.

Également, la distribution taxonomique des séquences montre des répartitions différentes entre les groupes de séquences d'une même fonction métabolique (Figure 4D). En effet, les séquences de FocA et FdhC visiblement dédiées au transport du formiate ne sont pas retrouvées dans les mêmes phyla. Tandis que 95% des séquences de FocA sont retrouvées chez les protéobactéries (bactéries à gram-négatif), 60% des séquences FdhC sont retrouvées chez des

firmicutes (bactéries à gram-positif) mais aussi chez des archées. Également, les séquences NirC-γ sont majoritairement retrouvées chez les firmicutes et les actinobactéries, tandis que le groupe NirC-β est exclusivement retrouvé chez les protéobactéries. Enfin, il semblerait que les transporteurs de types NirC et HSC, tous groupes confondus, soient absents chez les euryarchées.

(ii). Caractérisation structurale des TFN

A ce jour, différentes structures de TFN bactériens ont été résolues. Parmi elles, trois structures de FocA (Y. Wang et al. 2009; Waight, Love, et Wang 2010; Lü et al. 2011), une structure de NirC (Lü, Schwarzer, et al. 2012) et une structure d'HSC (Czyzewski et Wang 2012). La comparaison des structures montre une organisation en homo-pentamère (Figure 6A) similaire pour les trois types de TFN. Un monomère de TFN se compose de 6 segments transmembranaires (TM1-TM6) (Figure 6B), présentant une topologie en répétition inversée similaire à celle des aquaporines (Lü et al. 2013). Les cinq monomères s'agencent en cylindre de manière à former un pore central qui ne transporte pas d'anions mais permet à la protéine d'être enchâssée dans la membrane en se remplissant de phospholipides (Y. Wang et al. 2009). Cette organisation les distingue des aquaporines, qui sont organisées en homo-tétramère (Lü et al. 2013). Chaque monomère TFN possède son propre canal dédié au passage de l'anion (Figure 6D), et les acides aminés qui le constituent sont hautement conservés dans cette famille (Figure 6C) (Kammel, Pinske, et Sawers 2022; Kammel, Trebbin, et Sawers 2022; M. Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017). Parmi les 6 segments constituant les monomères, les hélices TM2 et TM5 sont discontinues (TM2a/b et TM5a/b) et séparées par des boucles. Elles enveloppent un pore central hydrophobe (Figure 6C et 6D) délimité par des vestibules localisés aux interfaces membrane-cytoplasme et membrane-périplasme. Chez FocA d'*E. coli*, le mouvement de ces deux boucles permet le rapprochement de deux phénylalanines (F75 et F202) et deux leucines (L79 et L89) qui définissent des points de constrictions (PC1 et PC2) hydrophobes au centre du canal (Figure 6D). Ces derniers permettent notamment de filtrer le passage des molécules non spécifiques en fonction de leur taille et de leur charge. Entre les points de constriction, une histidine (H209) se trouve au cœur du pore hydrophobe, et forme une liaison hydrogène avec une thréonine (T91) portée par l'une des deux boucles appelée boucle Ω (Figure 6D). L'analyse de la structure cristallographique de FocA chez *E. coli* montre des différences conformationnelles de la boucle Ω entre monomères, suggérant que le canal pourrait alterner entre un état ouvert et un état fermé. L'état fermé du canal serait notamment médié par la liaison H209-T91. En position ouverte, la boucle Ω basculerait dans une autre conformation, la liaison H209-T91 serait rompue et les PC seraient élargis. Le formiate pourrait alors transiter au sein du canal.



C

Résidus FocA *E. coli*	Résidus à la position	% de conservation
F75	F,Y	98,8
F202	F,Y	78,5
H209	H	98,7
T91	T	97,9
L89	L	99,9
L79	NR	≥ 73,5

Figure 6 : Organisation structurale des TFN

La structure cristallographique de FocA provenant d'*E. coli* a été utilisée comme modèle (PDB 3KCU).

A : FocA est un homo-pentamère. 5 monomères (vert, jaune, lilas, rose et cyan) s'agencent en cylindre et forment un pore central hydrophobe (cercle noir).

B : Un monomère de FocA est composé de 6 segments transmembranaires (STM1 à STM6). Les segments interrompus sont annotés a et b (STM2a/b et STM5a/b). La chaine polypeptidique est colorée depuis le domaine N-terminal (bleu marine) vers le domaine C-terminal (rouge) (code couleur « chainbow »). Les domaines N-ter et C-ter sont annotés en italique. NB : l'extrémité désordonnée du domaine N-terminal a été tronquée (insertion d'un codon STOP) pour améliorer la résolution structurale et n'est donc pas visible.

C : Les acides aminés constituants le canal à substrat sont hautement conservés au sein des TFN. Tableau construit avec les données provenant de (Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017). La conservation des résidus a été analysée sur 2206 séquences de TFNs eucaryotes et procaryotes annotées dans la base de données. La numérotation des résidus est basée sur la séquence de FocA d'*E. coli.* Le code couleur est en lien avec la figure de droite du panneau D. La colonne centrale représente les différents résidus retrouvés à cette position. La colonne de droite représente le % de conservation de l'acide aminé à cette position.

D : Chaque monomère de TFN contient un canal hydrophobe permettant le transport du substrat à travers la membrane. La figure de gauche est tirée de la revue (Lü et al. 2013). Elle représente le canal à substrat de NirC provenant de *Salmonella enterica*, calculé avec le logiciel HOLE. Certains résidus importants du canal hydrophobe ont été annotés. Les points de constriction formés par les acides aminés L69/L79 (PC1) et F65/F190 (PC2) sont représentés par des cercles. La figure de droite représente le monomère de FocA (orienté comme dans la partie droite du panneau B). Les acides aminés H209 (jaune), T91 (bleu), L79 et L89 (vert), F75 et F202 (orange) et K156 (fuchsia) sont représentés en batônnets. La lysine K26 n'est pas visible puisque située dans l'extrémité N-terminale tronquée. La boucle Ω (noir) établie la liaison entre STM2a et STM2b. Par soucis de visibilité, le segment SMT4 a été retiré de la représentation.

Pour appuyer cette théorie, la purification de FocA en présence de 120mM de formiate révèle la présence de l'anion au sein du canal, à l'emplacement libéré par la boucle Ω. Également, il a été proposé que des lysines hautement conservées (K156 et K26 chez *E. coli*) dans les vestibules cytoplasmique et périplasmique du canal permettraient d'attirer l'anion via des interactions électrostatiques (Kammel, Pinske, et Sawers 2022). Enfin, une partie de l'extrémité N-terminale localisée dans le cytoplasme (~20 acides aminés) n'est pas résolue dans la plupart des structures car elle est désordonnée.

(iii). Spécificité de substrat

Les TFNs n'ont pas une grande spécificité de substrats *in vitro*, puisqu'ils sont capables de transporter d'autres ions monovalents en plus de celui qui leur est dédié (Lü et al. 2013). Une étude a notamment démontré que FocA de *S. enterica* est capable de transporter le formiate, le nitrite, l'acétate, le lactate, le pyruvate et le chlorure, à l'aide de protéoliposomes constitués de lipides d'*E. coli* (Figure 7) (Lü, Du, et al. 2012). Toutefois, en évaluant la perméabilité de ces différents substrats, il est possible de déterminer le niveau de préférence de FocA pour chacune des molécules testées. Notamment, le chlorure présente une perméabilité équivalente à celle du formiate, tandis que le nitrite et l'acétate montrent des taux de perméabilité de 70% et 49% respectivement. En complément, une étude similaire réalisée sur la protéine NirC montre une perméabilité de 70% pour le formiate (Lü, Schwarzer, et al. 2012). Bien que ces résultats suggèrent que les substrats sont interchangeables entre les TFN, il faut garder en tête que ces mesures ont été réalisées *in vitro* avec de fortes concentrations en ions (20mM) et qu'elles ne reflètent peut-être pas la réalité *in vivo*.

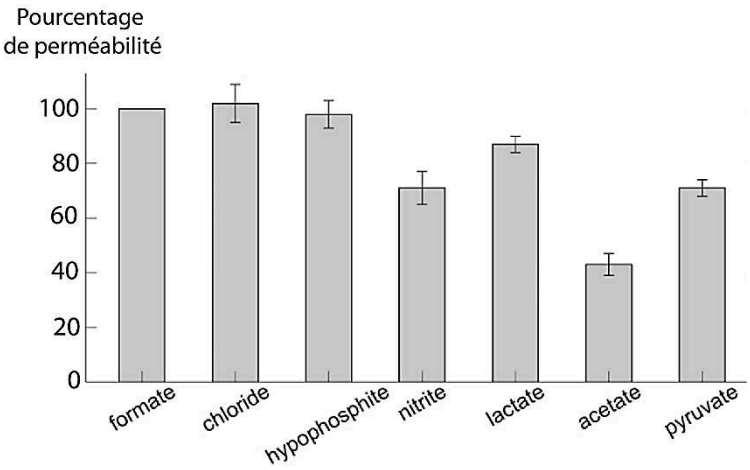


Figure 7 : Perméabilité *in vitro* de FocA aux anions

La perméabilité de FocA a été testée par électrophysiologie (Lü et al. 2012). Brièvement, un courant électrique est mesuré de part et d'autre d'une bicouche lipidique artificielle plane contenant le transporteur. Pour initier l'expérience, 20mM d'anion sont ajoutés dans le compartiment cis. Le transfert des ions depuis le compartiment *cis* vers le compartiment *trans*, induit une réversion du potentiel électrique détectable par l'électrode. La perméabilité est ensuite calculée d'après l'équation de Goldman, puis rapportée en pourcentage en utilisant le formiate comme référence (100%).

En effet d'autres éléments de la littérature laissent penser que FocA serait uniquement dédié au transport du formiate. Par exemple, son interaction avec la PFL *in vivo* (voir paragraphe suivant) (Doberenz et al. 2014), n'est pas prise en compte dans l'expérience *in vitro*. De plus, l'expression de l'opéron *pflABfocA* est assujettie à la présence de formiate, et FocA n'importe pas l'acétate en présence de formiate lors d'une culture en conditions fermentaires *in vivo* (Beyer et al. 2013; Metcalfe, Smith, et Hippler 2020).

(iv). Mécanisme de transport de l'anion : les questions en suspens

Comme évoqué précédemment, lors de la fermentation, le formiate produit est premièrement évacué hors de la cellule par FocA, puis réimporté dans un second temps par ce même transporteur (Figure 2). Bien que de nombreuses études se soient penchées sur ce processus, plusieurs questions restent toujours en suspens concernant le mécanisme moléculaire de transport du formiate. Etant donné que les acides aminés du canal sont hautement conservés entre les TFNs (Figure 6C), il est admis que ces derniers fonctionnent de manière similaire, quel que soit leur substrat. Ainsi, les questions adressées à travers le transport du formiate chez FocA s'appliquent également aux autres transporteurs de la famille des TFN. Premièrement, il semblerait que l'import et l'export du formiate s'effectuent via deux mécanismes différents. En effet, les travaux de mutagénèse dirigée de Michelle Kammel sur les acides aminés du canal H209 et T91 soutiennent cette théorie. Par exemple, la substitution de l'H209 en glutamine, asparagine ou thréonine augmente la capacité d'efflux du formiate *in vivo*, mais abolit son influx (Kammel et al. 2022). A l'inverse, la substitution de l'H209 par des acides aminés chargés ou hydrophobes, ou la substitution de la T91 par A, C et H abolit l'efflux mais pas l'influx (Kammel, Trebbin, et Sawers 2022; Kammel, Pinske, et Sawers 2022). Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'importance de ces deux résidus dans le transport du formiate, mais leur rôle précis n'est toujours pas bien compris. Deuxièmement, la bidirectionnalité de FocA a suscité des questions concernant le switch de l'efflux vers l'influx, et inversement. Etant donné que la réimportation du formiate par FocA à l'intérieur de la cellule est observée lorsque le pH extracellulaire diminue, Lü et ses collaborateurs ont initialement proposé que le pH influencerait la directionnalité de FocA. Pour démontrer cela, ils ont comparé la structure de FocA de *S. enterica* cristallisée à pH 4 (Lü et al. 2011) avec la structure de FocA de *V. cholerae* cristallisée à pH 7,5 (Waight, Love, et Wang 2010). Ils ont notamment observé que l'extrémité N-terminale, désordonnée à pH 7,5, se structure en hélice α à pH 4 et obstrue le côté cytoplasmique du canal. Observant également des changements conformationnels au sein du canal à substrat, dont une rupture de la liaison H209-T91, ils concluent que l'acidification du milieu entraine les modifications nécessaires pour favoriser l'import du formiate plutôt que l'export. Cependant, cette hypothèse a

été écartée par les travaux de (Metcalfe, Smith, et Hippler 2020). En utilisant des techniques de spectroscopie analytique et du formiate marqué, ils démontrent que du formiate ajouté dans le milieu dès le départ de la croissance bactérienne est internalisé, tandis que le pH est égal à 7 (Figure 8A).

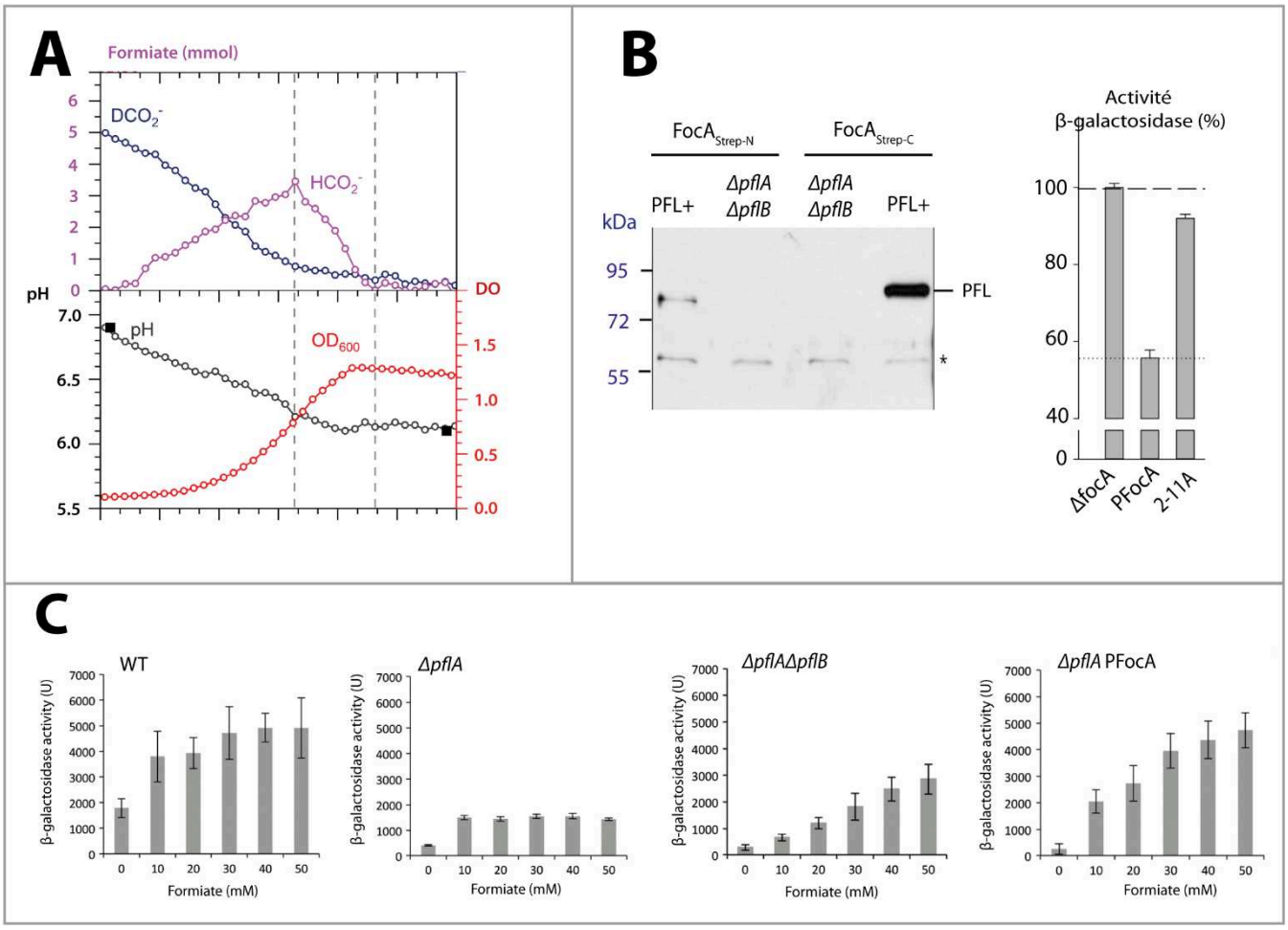


Figure 8 : L'interaction entre FocA et la PFL module le transport du formiate via FocA

A : L'import du formiate extracellulaire lors de la fermentation chez *E. coli* est indépendant du pH. Les cellules ont été cultivée en anaérobiose en présence de formiate deutéré (DCO_2^-). La croissance des cellules a été suivie par spectroscopie à 600nm (courbe rouge). Le pH (courbe noire) a été calculé au cours de la croissance via l'équation d'Henderson-Hasselbalch, à partir de la concentration en espèces tampons mesurées par spectroscopie liquide Raman. La concentration en formiate exogène marqué (courbe bleue) et non marqué produit par les cellules (courbe rose) a été mesurée par spectroscopie gazeuse Raman. Les différentes phases relatives à l'export du formiate endogène puis son réimport sont délimitées par des pointillés. Figure tirée de (Metcalfe, Smith, et Hippler 2020).

B : La PFL module l'activité de FocA en interagissant avec l'extrémité N-terminale de cette dernière. Panneau gauche : L'enzyme FocA purifiée avec un strep-tag fusionné à son domaine N/C-terminal, a été incubée dans un extrait total d'une souche d'*E. coli* surproduisant PflB (PFL+) ou *ΔpflAΔpflB*. Après incubation, l'enzyme FocA strep-taguée est purifiée de l'extrait cytoplasmique et l'éluât est analysé par western-blot avec des anticorps anti-PFL. La PFL présente dans l'extrait cytoplasmique de la souche PFL+ est co-purifiée avec FocA étiquetée en C-terminal. Lorsque que FocA est étiquetée en N-terminal, l'interaction avec la PFL est considérablement réduite. Figure tirée de (Doberenz et al. 2014). Panneau droit : L'activité β-galactosidase de la fusion PfdhF-lacZ a été mesurée pour *E. coli ΔfocA*, PFocA (*ΔfocA* surproduisant FocA), 2-11A (*ΔfocA* surproduisant FocA dont les acides aminés 2 à 11 du domaine N-terminal ont été remplacés par une alanine). Le formiate s'accumule dans la cellule lorsque l'extrémité N-terminale de FocA est remplacée par des alanines. Figure tirée de (Kammel, Hunger, et Sawers 2021).

C : L'import du formiate par FocA est aboli lorsque la PFL est sous forme inactive. Le promoteur du gène *fdhF* a été fusionné au gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase. L'activité spécifique β-galactosidase a été mesurée sur des souches d'*E. coli* WT, *ΔpflA*, *ΔpflA* PFocA surproduisant FocA, et *ΔpflAΔpflB*. Des concentrations croissantes (0 à 50mM) de formiate exogène sont ajoutées dans le milieu. En l'absence de PFL-Activating Enzyme (*ΔpflA*), la PFL est produite sous-forme inactive et l'import du formiate exogène est diminué. En absence de la PFL *ΔpflAB*, l'import du formiate est toujours possible, démontrant que c'est la PFL sous forme inactive qui empêche l'import du formiate. Enfin, lorsque FocA est surproduite dans une souche *ΔpflA*, l'import du formiate est restauré, démontrant que FocA était le facteur limitant pour l'import du formiate dans une souche *ΔpflA*. Ceci suggère que le ratio PFL inactive/FocA serait déterminant pour l'inactivation du transport, et démontre que la PFL sous-forme inactive bloque l'import du formiate. Figure tirée de (Doberenz et al. 2014).

En parallèle, les travaux de l'équipe de R. Gary Sawers ont démontré que le domaine N-terminal de FocA interagit avec la PFL (Figure 8B) (Doberenz et al. 2014 ; Kammel, Hunger, et Sawers 2021), et que l'état actif ou inactif de la PFL module l'activité du transporteur (Figure 8B et 8C). En effet, lorsque la cellule ne peut plus produire de formiate car la PFL est inactivée, cette dernière bloque l'activité du transporteur vraisemblablement via son interaction avec l'extrémité N-terminale de FocA. Enfin, étant donné que l'export du formiate hors de la cellule est corrélé avec l'acidification du milieu extracellulaire (Figure 8A) (Metcalfe, Smith, et Hippler 2020), le formiate pourrait être exporté avec un proton. D'après Sargent 2023, cela ferait sens d'un point de vue bioénergétique, puisque cela permettrait de ne pas perturber l'équilibre des charges de part et d'autre de la membrane. De plus, cette théorie est appuyée par le fait que l'H209, essentielle pour le transport du formiate, est un acide aminé protonable. Ici encore, la problématique de la bidirectionnalité revient, et il est difficile de s'avoir si ce transfert de proton s'appliquerait également lors de l'import. Enfin de manière intéressante, l'expérience présentée Figure 8A démontre que le formiate exogène marqué est importé et consommé simultanément avec l'export du formiate produit de manière endogène (distinguable car non marqué). Cette observation montre qu'*E. coli* est donc capable d'importer et d'exporter le formiate simultanément via le même transporteur, et soulève la question de la bimodalité au sein d'une même population. En effet, cela amène à considérer qu'une partie de la population pourrait être équipée d'un FocA configuré pour l'efflux, tandis qu'une autre sous-population produirait un FocA configuré pour l'influx (Peters et Sargent 2023). La configuration du complexe pourrait notamment être modulée par son interaction avec une PFL active ou inactive.

b. L'antiporteur oxalate/formiate (AOF)

Outre les TFN, le transporteur de l'oxalate OxlT est également impliqué dans le transport du formiate chez les micro-organismes. OxlT catalyse le transport des acides carboxyliques à travers les membranes, dans le sens de leur gradient de concentration. Notamment, il fonctionne comme un anti-porteur oxalate/formiate (AOF), qui importe l'oxalate et exporte le formiate simultanément.

Les AOF sont une sous-famille de la « Major Facilitator superfamily » (MFS) (S. C. Wang et al. 2020). A titre comparatif, leur mécanisme de transport est totalement différent de celui des TFN. En effet, OxlT est composée de deux modules formant un canal, et ce dernier s'ouvre et se ferme alternativement d'un côté de la membrane puis de l'autre afin de permettre la translocation des substrats (Drew et al. 2021) (Figure 9).

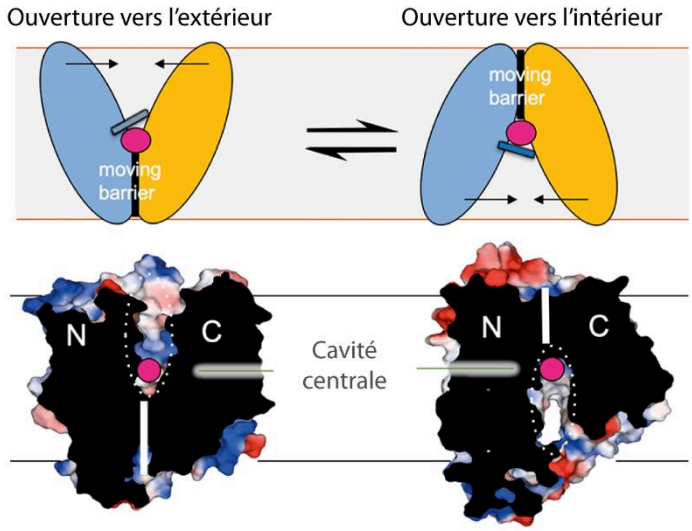


Figure 9 : Fonctionnement des MFS

Image tirée de (Drew et al. 2021). Le transporteur du fructose GLUT5 a été utilisé comme modèle. Les deux domaines similaire (N en bleu et C en jaune) se réarrangent symétriquement autour de la cavité centrale où se situe le substrat (rond rose). L'accès d'un côté à l'autre de la membrane se fait de manière alternative.

OxlT est une protéine clé du métabolisme de l'oxalate chez *Oxalobacter formigenes*. Cette bactérie utilise l'oxalate comme seule source de carbone pour se développer dans l'intestin des animaux et êtres humains (Jaunet-Lahary et al. 2023). L'oxalate issu de l'alimentation de l'hôte est internalisé via OxlT puis transformé en formiate en présence de formyl-CoA (Figure 10).

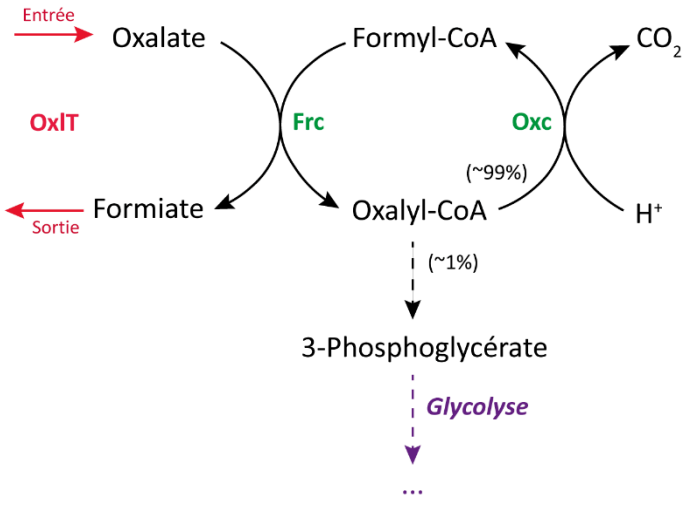


Figure 10 : Métabolisme de l'oxalate chez *Oxalobacter formigenes*

Figure adaptée de (Stewart, Duncan, et Cave 2004). L'anti-porteur oxalate/formiate OxlT est représenté en rouge. Les enzymes sont représentées en vert. Les flèches pleines représentent une réaction enzymatique. Les flèches en pointillé représentent la somme de plusieurs réactions enzymatiques. La glycolyse est représentée en violet. Frc= Formyl-CoA : Oxalate CoA transférase. OxC= Oxalyl-CoA décarboxylase.

Cette production de formiate est essentielle, puisqu'elle assure la continuité de l'import de l'oxalate. Lors de la dégradation de l'oxalate en formiate, un proton est consommé dans le cytosol par l'action de l'enzyme Oxc, entrainant la formation d'un gradient de proton de l'autre côté de la membrane (Stewart, Duncan, et Cave 2004). De ce fait, OxlT est indirectement impliqué dans la synthèse de la Force Proton Motrice (FPM) et est considéré comme électrogénique en tant que « pompe virtuelle à proton » (Iyalomhe, Khantwal, et Kang 2015).

En lien avec la section B.2, je me suis demandé si le formiate excrété pouvait être réutilisé par la bactérie à d'autres fin métaboliques. Pour cela, j'ai effectué un BlastP avec la séquence de FdnG (P24183) contre les génomes de différentes espèces d'*Oxalobacter*. FdnG est la sous-unité catalytique de la FDH périplasmique d'*E. coli* permettant la respiration du formiate en présence de nitrate. Pour chaque organisme, j'ai obtenu des séquences annotées comme sous-unités catalytiques de FDH, présentant environ ~30% d'identité avec FdnG. Ce résultat indique que le formiate produit et/ou excrété pourrait potentiellement être réoxydé par une FDH et fournir de l'énergie supplémentaire à la cellule. Pour aller plus loin, j'ai effectué un BlastP avec des séquences protéiques de TFN provenant de trois sous-groupes différents présentés Figure 5c (YfdC : A0A446A2Y0 ; FocA : P0AC23 ; HSC : A0A1I7H3U8) contre les génomes d'espèces d'*Oxalobacter*. Je n'ai obtenu aucun résultat pour les trois séquences testées. J'ai également recherché si des séquences de TFN annotées dans la banque de donnée UniProtKB étaient retrouvées chez des organismes du genre *Oxalobacter*, et ce n'a pas été le cas. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que le formiate transite seulement par OxlT chez ces bactéries. Etant donné que l'excrétion du formiate hors du cytoplasme est cruciale pour que la bactérie puisse accéder à sa source de carbone, il semble finalement logique que le formiate excrété hors du cytoplasme ne soit pas réimporté. Par ailleurs, le mécanisme d'antiport implique que le formiate diffuse selon son gradient de concentration. Ainsi, la présence d'une FDH périplasmique oxydant le formiate permettrait de tirer avantage d'un export du formiate continu, et un import de l'oxalate par la même occasion.

Chez les bactéries du genre *Oxalobacter*, la production de formiate à partir d'oxalate s'appuie sur une voie métabolique différente de la voie OxdC présentée en section B.2. Par curiosité, j'ai effectué un BlastP de la séquence protéique d'OxdC de *Bacillus subtilis* (O34714) contre les génomes d'espèces d'*Oxalobacter*, et n'ai obtenu aucun résultat. Ceci suggère que ces bactéries n'ont visiblement pas d'intérêt à avoir deux systèmes redondants permettant la production de formiate à partir d'oxalate.

3. Diffusion passive du formiate à travers les membranes

Comme évoqué plus haut, les membranes cellulaires sont imperméables aux molécules polaires et chargées. Seules de petites molécules, apolaires ou faiblement polaires, peuvent diffuser de manière passive à travers les membrane (Yang et Hinner 2015). Notamment, les acides faibles comme l'acide formique peuvent diffuser passivement sous leur forme acide protonée (AH) en atteignant l'équilibre de concentration de part et d'autre de la membrane (Figure 11) (Gabba et al. 2020).

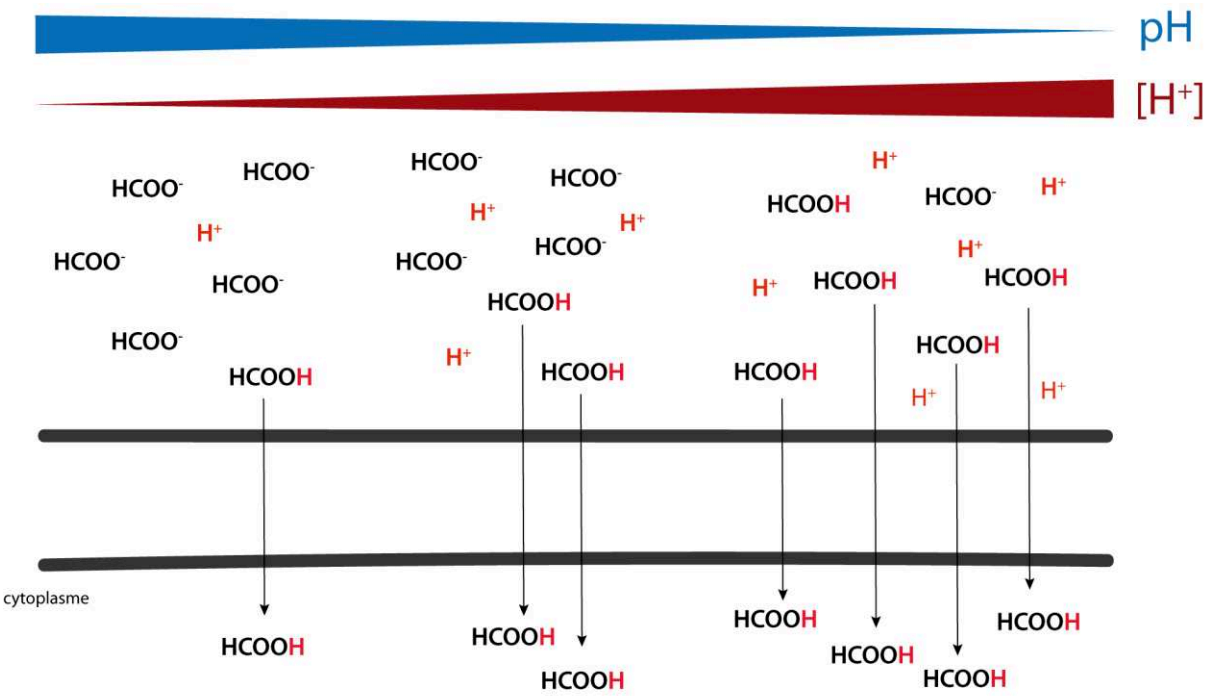


Figure 11 : Diffusion passive du formiate à travers la membrane cytoplasmique

Les acides faibles, dont le formiate, diffusent passivement à travers les membranes sous leur forme protonée. La proportion de forme protonée (AH) et déprotonée (A^-) d'un acide dépend de son pK_a et du pH de l'environnement. Plus le pH environnemental est acide et plus la forme protonée domine. Sur le schéma, le pH et la concentration en proton sont représentés par une flèche bleue et une flèche rouge respectivement. Le formiate (pK_a =3.75) est utilisé comme exemple d'acide faible, et représenté sous ses formes protonée (HCOOH) et déprotonée ($HCOO^-$).

L'équilibre acido-basique d'une espèce en solution représente sa capacité à libérer un proton pour dissocier sa forme acide en forme basique. Cette dissociation est quantifiée par la valeur de pK_a, aussi appelée constante d'acidité. Dans une solution dont la valeur de pH est égale à la valeur du pK_a, les formes acide et basique sont retrouvées en proportions égales. Lorsque le pH est supérieur au pK_a, la forme basique déprotonée domine. A l'inverse, lorsque le pH est inférieur au pK_a, la forme acide protonée domine. D'après l'équation d'Henderson-Hasselbalch (Birmingham et Elliott 1952) qui établit le lien entre pH et pK_a, la diminution d'une unité pH divise par 10 le ratio

[base]/[acide] au sein d'une solution. Avec un pK_a= 3.75, l'acide formique est donc majoritairement retrouvé sous sa forme anionique $HCOO^-$ (formiate) dans un environnement « physiologique » (pH 7). De ce fait, seule la proportion minoritaire d'acide sous forme HCOOH peut diffuser à travers la membrane, tandis que l'autre proportion majoritaire $HCOO^-$ a besoin d'un transport spécifique pour pénétrer dans la cellule (section B.2). En parallèle lorsque le pH extracellulaire diminue, un nouvel équilibre [base]/[acide] se crée et la proportion d'HCOOH augmente, entrainant la diffusion d'une plus grande quantité d'acide au sein du cytoplasme (Kammel et Sawers 2022). La perméabilité de la cellule vis-à-vis du formiate dépend donc du pH environnemental auquel elle est confrontée. Un autre paramètre clef pour décrire le caractère diffusible d'une molécule au travers de la membrane est son hydrophilicité définie par le coefficient de partage octanol/eau appelé LogP. Le formiate a une valeur de -2.1 signifiant que la molécule est hydrophile et diffusera moins bien à travers la membrane que d'autres acides organiques faibles comme le sorbate, le benzoate, le malate ou encore l'acétate (valeurs issues de http://www.inchem.org/).

Puisque les microorganismes œuvrent pour maintenir leur pH intracellulaire à une valeur physiologique, l'acide diffusant dans la cellule est alors déprotoné, entrainant à la fois l'acidification du cytoplasme mais aussi la diminution du gradient de pH de part et d'autre de la membrane (Mollapour, Shepherd, et Piper 2008; Azeredo et al. 2016; Beales 2004; Booth et Stratford 2003). Sur la base de ce phénomène, plusieurs études démontrent le pouvoir antimicrobien des acides organiques faibles tels que l'acide acétique (pK_a=4.76), l'acide sorbique (pK_a=4.76) et l'acide formique, sur des levures et bactéries contaminantes de l'industrie agroalimentaire (Moro et al. 2022; Azeredo et al. 2016; Beales 2004). Notamment, il a été démontré que la croissance de *B. subtilis* est inhibée par l'acide sorbique à pH 6,4 (Figure 12) (Beek et al. 2008).

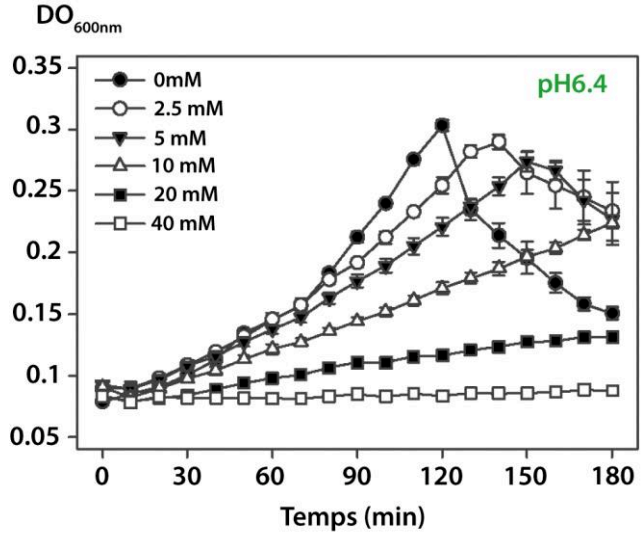


Figure 12 : L'acide sorbique inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* à pH6,4

Figure tirée de (Beek et al. 2008)**.** Courbe de croissance de la souche *Bacillus subtilis* WT cultivée en milieu minimum à pH6.4, supplémenté avec 0 à 40mM d'acide sorbique.

Pour une valeur de pH donnée, on observe une corrélation entre la diminution du taux de croissance et la quantité d'acide ajoutée dans le milieu. De manière similaire, à mesure que le pH augmente, la quantité d'acide requise pour atteindre un certain degré d'inhibition augmente également. Avec des pK_a similaires (4.75), il est attendu que l'acide sorbique et l'acide acétique exercent la même toxicité à pH égal, la concentration des espèces protonées étant identique. Cependant, alors que 3 mM d'acide sorbique suffisent à réduire de 30% la vitesse de croissance de *B. subtilis*, 25 mM sont requis pour l'acide acétique (Van Beilen et al. 2014; Ter Beek et al. 2015). Il est vraisemblable que la différence s'explique par la plus grande hydrophobicité de l'acide sorbique avec une valeur de LogP de 1.33 versus -0.17 pour l'acide acétique. Ce même raisonnement permet aussi d'expliquer le caractère découplant du CCCP, un autre acide organique faible de très forte affinité pour la membrane (LogP 3.38 et pKa 5.95) (Ter Beek et al. 2015). Ainsi, en considérant que la quantité d'acide pénétrant dans la cellule repose uniquement sur la diffusion passive, il est possible d'estimer théoriquement le niveau d'acidification cytoplasmique attendu en fonction de la quantité d'acide ajouté. Néanmoins, cela n'est pas aussi simple, puisque les bactéries possèdent plusieurs systèmes élaborés permettant d'évacuer et/ou neutraliser les protons excédentaires ayant pénétrés au sein de la cellule. Ces systèmes, mis en place lors de la réponse au stress acide, seront détaillés dans la section suivante.

D. Les microorganismes face au stress acide

Comme vu précédemment, le formiate est un acide faible capable de diffuser passivement dans le cytoplasme, entrainant ainsi son acidification. Au cours de leur vie, les microorganismes sont vraisemblablement amenés à rencontrer du formiate lorsque le pH environnemental est faible, notamment au cours de la fermentation acide mixte ou de la décarboxylation de l'oxalate. Pour y survivre, ils mettent en place différentes stratégies permettant de contrecarrer cette acidité. Dans cette section, nous allons voir quels sont les enjeux qui se cachent derrière le maintien de l'homéostasie du pHi, ainsi que les mécanismes mis en place par les microorganismes pour y parvenir.

1. Importance du maintien de l'homéostasie intracellulaire

Les microorganismes occupent diverses niches écologiques, les exposant à différents niveaux d'acidité. Tandis que les acidophiles se développent dans des environnements dont le pH est inférieur à 5, les neutrophiles ont une croissance optimale dans des environnements dont le pH

avoisine la neutralité. Ces organismes, qu'ils soient acidophiles ou neutrophiles, font face à des fluctuations constantes du pH environnemental et doivent s'y adapter afin de maintenir leur homéostasie acido-basique (P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014). Notamment, l'acidification du pH intracellulaire (pH_i) peut s'avérer létale en entrainant l'inactivation de certaines enzymes clés du métabolisme, l'agrégation des protéines, ou encore la dégradation du chromosome (Jeong et al. 2008; Hong et al. 2012; Booth et Stratford 2003). A titre d'exemple, après avoir été exposée à un changement de pH extracellulaire (de 7,5 à 5,5), *E. coli* voit son pH_i diminuer presque instantanément à 6. Après seulement 1min30, ce dernier est restauré au-dessus de 7, proche de sa valeur physiologique (Figure 13) (Martinez et al. 2012). Sur le même principe, la bactérie acidophile *Acidiphilium acidophilum* maintient son pH_i autour de 5,65 tandis que le pH environnemental varie entre 4,5 et 1 (P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014).

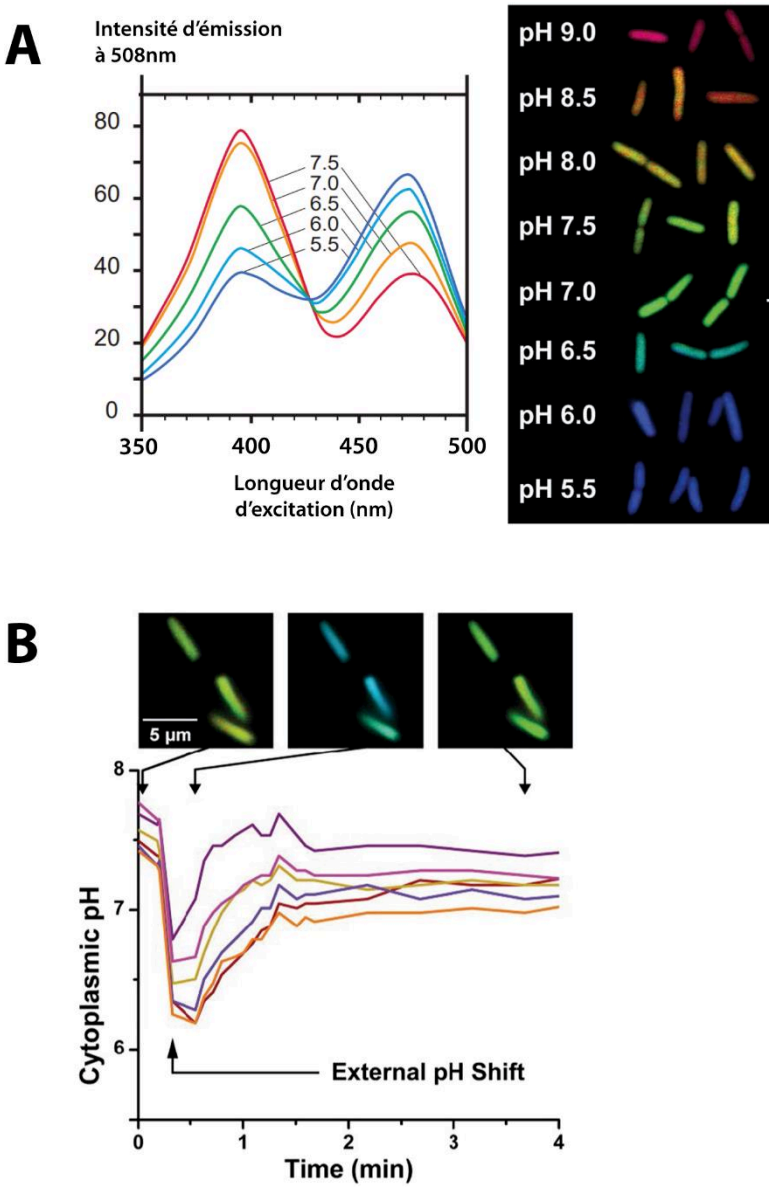


Figure 13 : *E. coli* restaure l'homéostasie du pH intracellulaire après avoir été exposée à un stress acide

A : Utilisation de la pHluorine pour mesurer le pH intracellulaire des cellules. La pHluorine ratiométrique est une protéine GFP mutée possédant deux optimums d'excitation (395 et 475nm), et dont l'intensité d'émission du ratio [395/475] varie en fonction du pH (panneau de gauche). Chaque courbe représente l'intensité d'émission de la protéine en fonction de la longueur d'onde, à pH 7.5 (rouge), 7 (orange), 6.5 (vert), 6 (cyan) et 5.5 (violet). Plus le pH diminue et plus le ratio d'émission [395/475] diminue également. Figure tirée de (Miesenböck, De Angelis, et Rothman 1998). Sur le panneau de droite, le pH cytoplasmique de cellules individuelles d'*E. coli* a été mesuré avec la pHluorine ratiométrique, dans un milieu extracellulaire dont le pH varie de 5,5 à 9. Le ΔpH des cellules a été collapsé en présence de méthylamine, de manière à ce que le pH intracellulaire soit équivalent au pH du milieu. De ce fait, chaque valeur de pH a pu être associée à une intensité de fluorescence du ratio [395/475] donnée. Figure tirée de (Martinez et al. 2012).

B : Mesure du pH intracellulaire d'*E. coli* lors d'un changement de pH de 7,5 à 5,5. Les valeurs de pH ont été déterminées en utilisant l'expérience de droite du panneau A comme référence. Chaque tracé de couleur représente une cellule individuelle. Des images illustrant la fluorescence aux temps 0min, 40sec et 3min45 sont présentée au-dessus du graphique. Le pHi diminue très rapidement lors du stress, et est restauré à une valeur

2. Les mécanismes de protection face au stress acide

Comme vu précédemment, le stress acide résulte d'une accumulation des protons dans le cytoplasme. L'entrée des protons repose principalement sur leur diffusion facilitée via des porines et des perméases, en fonction de leur gradient de concentration. Ainsi, la simple diminution du pH extracellulaire suffit à perturber l'homéostasie du pH_i. D'autre part, les acides organiques faibles sont également une source de proton pour la cellule par leur capacité à les échanger et à diffuser passivement à travers les membranes. Ainsi, quelle que soit la nature du stress acide auquel ils font face, les microorganismes ont pour objectif d'éliminer le plus rapidement possible l'excès de protons envahissant le cytoplasme afin de maintenir un pHi tolérable pour la cellule ainsi qu'un gradient de pH de part et d'autre de la membrane (P. A. Lund et al. 2020). Les sous-sections suivantes ont pour but d'illustrer les différents mécanismes de réponse au stress acide connus chez les microorganismes, à travers quelques exemples précis. Globalement, on distingue 4 stratégies majeures qui sont : (1) l'efflux des protons hors de la cellule, (2) leur consommation au sein du cytoplasme, (3) l'imperméabilisation de la membrane, et (4) la protection des constituants cellulaires. L'ensemble de ces processus sont illustrés en Figure 14.

a. Efflux des protons hors de la cellule

Pour faire face à l'augmentation de la quantité de protons dans le cytoplasme, une première stratégie consiste à exporter hors de la cellule les protons excédentaires. Pour cela, la bactérie dispose de protéines telles que les transporteurs secondaires ou les complexes respiratoires, dont le fonctionnement repose sur l'extrusion des protons. Notamment, la pompe à proton ATP synthase-F_1F_0 est un acteur majeur de la réponse au stress acide chez de nombreux organismes (Figure 14) (Guan et Liu 2020). L'ATP synthase F_1-F_0 est une enzyme bifonctionnelle qui catalyse la synthèse ou l'hydrolyse de l'ATP, selon le sens de la réaction. Elle se compose d'un complexe F_0 transmembranaire permettant de transloquer les protons de part et d'autre de la membrane, et d'un complexe F_1 cytoplasmique permettant la synthèse ou l'hydrolyse de l'ATP (Zharova, Grivennikova, et Borisov 2023). Les principales fonctions de cette enzyme sont le contrôle de la production d'ATP et du potentiel membranaire (Vlasov et al. 2022). En effet, lors de la respiration cellulaire, le gradient électrochimique de protons généré de part et d'autre de la membrane est utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP, envoyant ainsi les protons dans le cytoplasme (Zharova, Grivennikova, et Borisov 2023). Lorsque la FPM diminue, le sens de fonctionnement s'inverse, les protons intracellulaires sont expulsés de l'autre côté de la membrane au prix de l'hydrolyse d'ATP. Le lien entre le fonctionnement de l'ATP synthase-F_0F_1 et le maintien de l'homéostasie du pH a été établi à travers différentes études. Notamment, la transcription de

l'opéron *atp* est induite lors de l'exposition à un stress acide chez *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus mutans* (Liu et al. 2015). Également, lorsqu'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* présentant une augmentation de l'activité ATP synthase est exposé à 1% d'acide acétique, l'acidification de son pHi est plus faible en comparaison avec celui obtenue dans le cas de la souche WT (Zheng et al. 2011). Enfin, la délétion de l'opéron *atp* chez *E. coli* diminue d'un facteur 20 (en comparaison avec la souche WT) le taux de survie des cellules après 1h d'exposition à pH=2,5 (Sun et al. 2012). A travers ce mécanisme, la réponse au stress acide est couteuse en énergie pour la cellule. De ce fait, il a été montré que l'ajout d'un substrat fermentescible tel que le citrate, en supplément du substrat initial, permet à *Candida glabrata* d'augmenter sa production d'ATP ainsi que sa croissance lors d'un stress acide induit par l'acide pyruvique (Zhou, Liu, et Chen 2011).

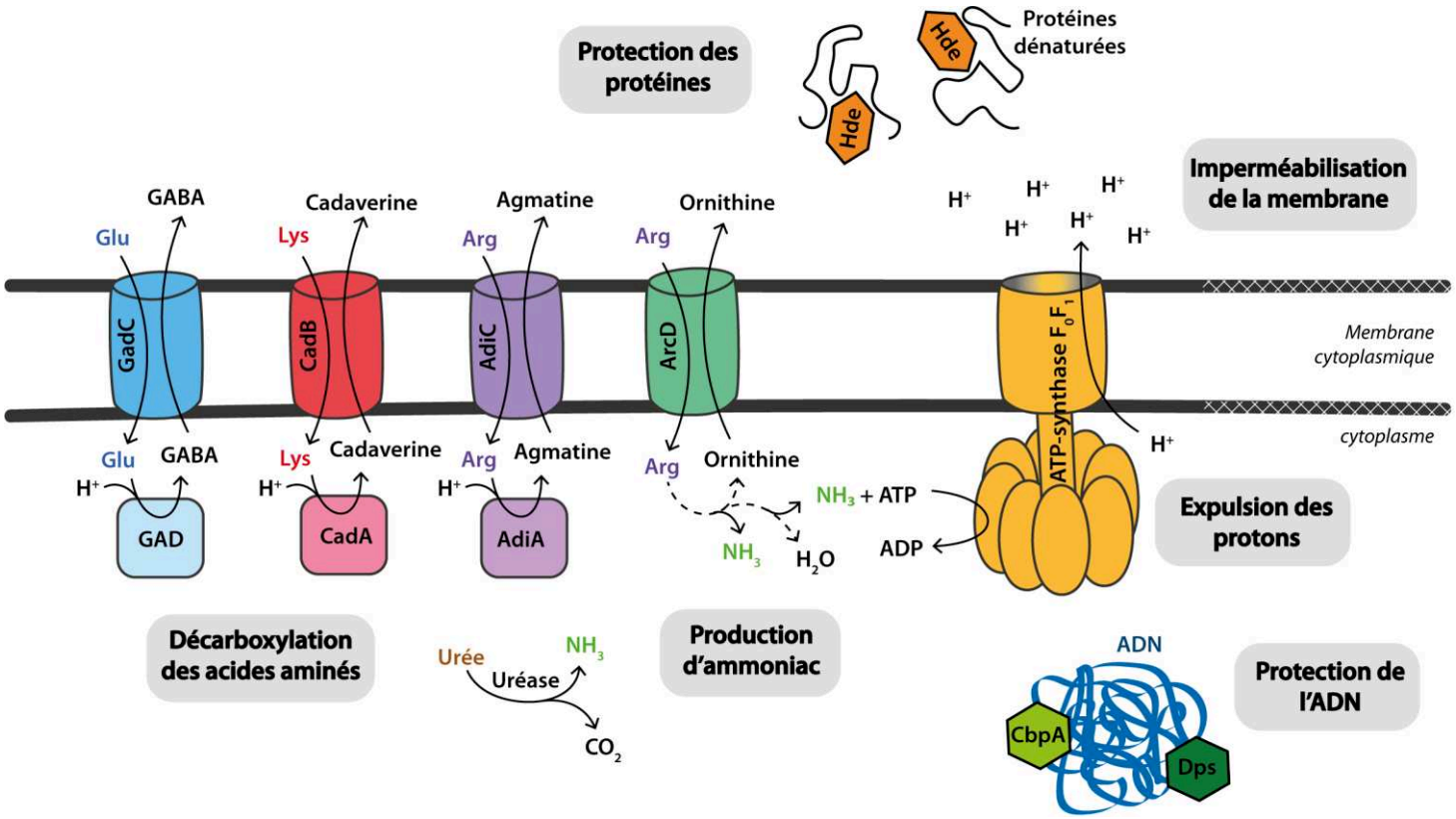


Figure 14 : Mécanismes de protection des microorganismes face au stress acide

Schéma inspiré de (Lund et al. 2020; Guan et Liu 2020). Pour faire face à la diminution du pH intracellulaire, les microorganismes éliminent les protons excédentaires en les expulsant hors de la cellule via l'ATP-synthase, et en les consommant via la décarboxylation des acides aminés. De plus, ils réduisent la perméabilité de la membrane cytoplasmique en modifiant sa composition (motif hachuré). Également, ils produisent de l'ammoniac (NH_3) permettant de basifier le cytoplasme. Enfin, ils produisent des chaperonnes permettant de protéger l'ADN endommagé de la dégradation et les protéines dénaturées de l'agrégation. L'ATP synthase est représentée en jaune. Les systèmes GAD, Cad et Adi sont représentés en bleu, rouge et violet respectivement. Les chaperonnes sont représentées par des hexagones. Les flèches pleines représentent une réaction enzymatique. Les flèches en pointillé représentent la somme

b. Consommation des protons et production de composés alcalins

Un second moyen permettant de se débarrasser des protons cytoplasmiques est de les consommer dans des réactions enzymatiques. Chez *Bacillus cereus*, la décarboxylation des acides aminés tels que la lysine, l'arginine ou le glutamate participe au maintien du pH_i et à la tolérance du stress acide (Senouci-Rezkallah, Schmitt, et Jobin 2011). Comme illustré en Figure 14, chaque acide aminé est importé et décarboxylé par des protéines qui lui sont spécifiques au cours d'une réaction consommant un proton du cytoplasme. L'arginine peut être importée par AdiC et décarboxylée par AdiA ; la lysine est importée par CadB et décarboxylée par CadA ; et le glutamate est importé par GadC et décarboxylée par GAD (Guan et Liu 2020). *E. coli* possède ces trois systèmes, et une étude récente montre qu'ils ne sont pas régulés dans les même conditions chez cette bactérie (Brameyer et al. 2022). Le système Gad est activé lors d'un stress acide quel que soit son intensité, ou lors de la phase stationnaire de croissance. Le système Cad est induit en présence de lysine, à pH 5.8 lors d'un stress acide modéré. Enfin le système Adi est induit à pH 4.4 lors d'un stress acide fort. A l'échelle de la population, le système Gad est produit dans toutes les cellules, quelle que soit l'intensité du stress, bien que son niveau d'expression varie d'une cellule à une autre. En parallèle, lorsque le pH est inférieur ou égal à 5.8, certaines cellules exprimeront fortement Cad ou Adi. Les auteurs proposent notamment que l'export de la cadaverine et de l'agmatine via Cad et Adi permettrait d'alcaliniser le milieu extracellulaire, au profit de l'ensemble de la population. De plus, le système Gad permettrait de diminuer le pH intracellulaire de chaque cellule via la consommation des protons. Des analyses phylogénétiques sur plus de 2000 séquences d'homologues montrent que GadC est majoritairement retrouvé chez les Protéobactéries et les Firmicutes (43 et 56% respectivement), tandis que Adic et CadB sont majoritairement présents chez les Protéobactéries. Enfin, il existe également des systèmes permettant de générer de l'ammoniac à partir d'urée et d'arginine afin d'alcaliniser le cytoplasme (Figure 14). Lors du catabolisme de l'arginine par cette voie, l'ATP produit pourrait notamment être utilisé par l'ATP synthase pour effluer les protons hors de la cellule (Guan et Liu 2020).

c. Protection des constituants cellulaires

En plus des mécanismes permettant d'éliminer les protons du cytoplasme, les cellules mettent en place des processus visant à protéger les composants cellulaires des dégâts causés par le stress acide (Figure 14). Chez les bactéries à Gram négatif, de nombreuses protéines essentielles sont retrouvées au sein du périplasme. Lors d'un stress acide, ce dernier est directement confronté aux variations du pH étant donné que les mécanismes de décarboxylation décrits plus haut se

trouvent dans le cytoplasme (Hong et al. 2012; P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014). Face au stress acide, les protéines du périplasme perdent ainsi leur repliement et s'inactivent. Pour pallier à ce problème, il a été démontré que les chaperonnes périplasmiques HdeA et HdeB minimisent l'agrégation des protéines dépliées, ce qui favorise leur repliement par d'autres chaperonnes une fois le stress passé. L'analyse des interactions protéine-protéine *in vivo* chez *E. coli* a permis d'établir une liste de substrats potentiels à ces chaperonnes. Ils sont notamment impliqués dans des processus physiologiques variés (métabolisme, transport des protéines, protéases, etc…), soulignant l'importance du système Hde lors du stress acide (Zhang et al. 2011). Également, une autre chaperonne HSP31 protège les protéines cytoplasmiques de l'agrégation lors de divers stress incluant l'acidité. Enfin, une autre conséquence du stress acide est la détérioration de l'intégrité du chromosome via des cassures de l'ADN. En effet, une étude démontre que l'ADN chromosomique commence à se dégrader après que *E. coli* ait été exposée plus de 2 h à un pH égal à 2 (Jeong et al. 2008). Dans ces conditions, la délétion du gène codant pour la protéine réparatrice de l'ADN RecA impacte fortement la survie de la bactérie, soulignant l'importance de la réparation de l'ADN lors du stress acide. Afin que l'ADN puisse être efficacement réparé une fois le stress passé, il est au préalable protégé de la dégradation par des chaperonnes telles que Dps ou CbpA (Cosgriff et al. 2010).

d. Imperméabilisation de la membrane cytoplasmique

Enfin, une dernière stratégie permettant de protéger la cellule du stress acide est tout simplement d'empêcher les protons de rentrer. Chez les bactéries à Gram négatif, il est admis que la membrane externe n'est pas une barrière physique pour les protons, étant donné que le diamètre des porines est suffisamment large pour les laisser passer (P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014). C'est pourquoi le périplasme est le premier compartiment touché lorsque le pH extracellulaire s'acidifie. La membrane cytoplasmique par contre, constitue une barrière plus imperméable aux protons et permet de protéger le cytoplasme de l'acidité (P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014). La composition en lipides de la membrane cytoplasmique bactérienne varie grandement entre les différents phyla, et est également modulée au sein d'une même espèce en réponse à des changements environnementaux (Sohlenkamp et Geiger 2016). Les différences en composition lipidique modifient les propriétés de la membrane. Notamment, il a été démontré que des acides gras insaturés sont convertis en acides gras saturés, chez *E. coli* et *S. enterica,* pour rigidifier la membrane et la rendre imperméable aux protons (Kim et al. 2005; Chang et Cronan 1999; Elferink et al. 1994). A l'inverse, une augmentation de la quantité d'acides gras insaturés entraine une fluidification de la membrane et améliore sa perméabilité. Ainsi, il est connu que la prise en charge

du stress acide repose également sur un remodelage de la composition lipidique de la membrane cytoplasmique (Figure 14) (P. Lund, Tramonti, et De Biase 2014; Sohlenkamp et Geiger 2016).

CHAPITRE 2 : LES FORMIATE DESHYDROGENASES

A. Généralités

Les Formiate déshydrogénases (FDH) sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation du formiate en CO_2 selon la réaction suivante :

$$HCOO^- \rightarrow CO_2 + H^+ + 2e^-$$

Dans cette famille, deux grandes classes de FDH diffèrent par leurs caractéristiques structurales et leur mécanistique. La première regroupe les FDH dites indépendantes des métaux. Leur fonctionnement ne requiert pas la présence d'ions métalliques au sein du site actif. Elles couplent l'oxydation du formiate à la réduction du NAD^+ en NADH via un mécanisme de transfert d'hydrure depuis le formiate vers le NAD^+ (Popov et Lamzin 1994). Cette réaction, pouvant également s'effectuer en sens inverse, a lieu au sein d'un site actif constitué d'acides aminés permettant de fixer les substrats, formiate et NAD^+, à proximité l'un de l'autre (Yilmazer et al. 2020). Ces FDH sont généralement organisées en homodimères, et retrouvées dans de nombreux règnes du vivant tels que les bactéries, les champignons ou encore les végétaux (Alekseeva, Savin, et Tishkov 2011). La seconde classe de FDH regroupe les FDH dites dépendantes des métaux, qui catalysent l'oxydation du formiate grâce à un site actif contenant un atome de molybdène (Mo) ou de tungstène (W) lié à un cofacteur inorganique (Maia, Moura, et Moura 2015). La suite du manuscrit concernera exclusivement cette classe d'enzymes, et le terme FDH sera utilisé pour décrire les FDH dépendantes des métaux. Exclusivement retrouvées chez les procaryotes, ces enzymes forment une famille très diversifiée présentant une importante hétérogénéité d'organisation structurale, médiée par l'association combinatoire d'un panel de modules liants divers substrats et cofacteurs (Maia, Moura, et Moura 2015). Cette modularité est responsable de leur intégration dans des voies métaboliques variées. Enfin, tandis que certaines FDH catalysent spécifiquement l'oxydation du formiate, d'autres effectuent la réduction du CO_2 (CO_2 réductases CO_2R).

Depuis la révolution industrielle, les émissions de gaz à effet de serre dans l'atmosphère par les activités humaines n'ont cessé d'augmenter, jusqu'à atteindre un niveau critique au cours des dernières décennies (Hervé 2023). Parmi ces gaz, on retrouve notamment le CO_2. Ainsi, le développement de stratégies biotechnologiques visant à dépolluer l'atmosphère est d'un intérêt

grandissant au fil des années. Notamment, de nombreuses études portent sur l'utilisation des FDH dans la valorisation du CO_2 atmosphérique en formiate, ce dernier étant une source d'énergie chimique stockable et réutilisable pour d'autres applications (Yishai et al. 2016; Bierbaumer et al. 2023; Maia et al. 2016). Hormis les CO déshydrogénases (CODH) réduisant le CO_2 en CO, les FDH présentent l'avantage d'être les seules enzymes réduisant directement le CO_2 sans l'intermédiaire d'autres substrats (Bierbaumer et al. 2023). De plus, elles sont préférées aux CODH étant donné que le formiate n'est pas un gaz et qu'il est de ce fait récupérable plus facilement en sortie de réaction. Néanmoins, la réduction du CO_2 par les FDH n'est pas une réaction très efficace, si on la compare à l'oxydation du formiate par exemple. A titre indicatif, le complexe HDCR de la voie de WL chez *Acetobacterium woodii*, évoqué dans le chapitre 1, réduit physiologiquement le CO_2 avec un turnover de 28 s^{-1} en présence de son substrat physiologique, l'hydrogène (Figure 15) (Schuchmann et Müller 2013; Schwarz, Schuchmann, et Müller 2018; Nielsen, Lange, et Meyer 2019). Toutefois, en comparaison avec la RubisCO dont le turnover est peu efficace (<12 s^{-1}) et l'affinité pour le CO_2 est faible (Galmés et al. 2019), l'utilisation des FDH apparait comme une bien meilleure alternative pour la réduction du CO_2. Les systèmes FDH les plus efficaces connus à ce jour pour la réduction du CO_2 *in vitro* sont les FDH de *Desulfovibrio desulfuricans* (Maia et al. 2016) et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Oliveira et al. 2020). Elles présentent des efficacités catalytiques de 3066 s^{-1}. mM^{-1} et 750 s^{-1}.mM^{-1} respectivement, ce qui en fait de bon candidats pour la biocatalyse du CO_2 atmosphérique (Figure 15). Cependant, les déterminants moléculaires qui régissent l'efficacité catalytique ne sont pas encore bien compris, et beaucoup de FDH sont inactivées en présence d'oxygène, ce qui les rend difficiles à manipuler à l'échelle industrielle. En conclusion, une meilleure compréhension du mécanisme catalytique des FDH est nécessaire pour optimiser leur utilisation biotechnologique.

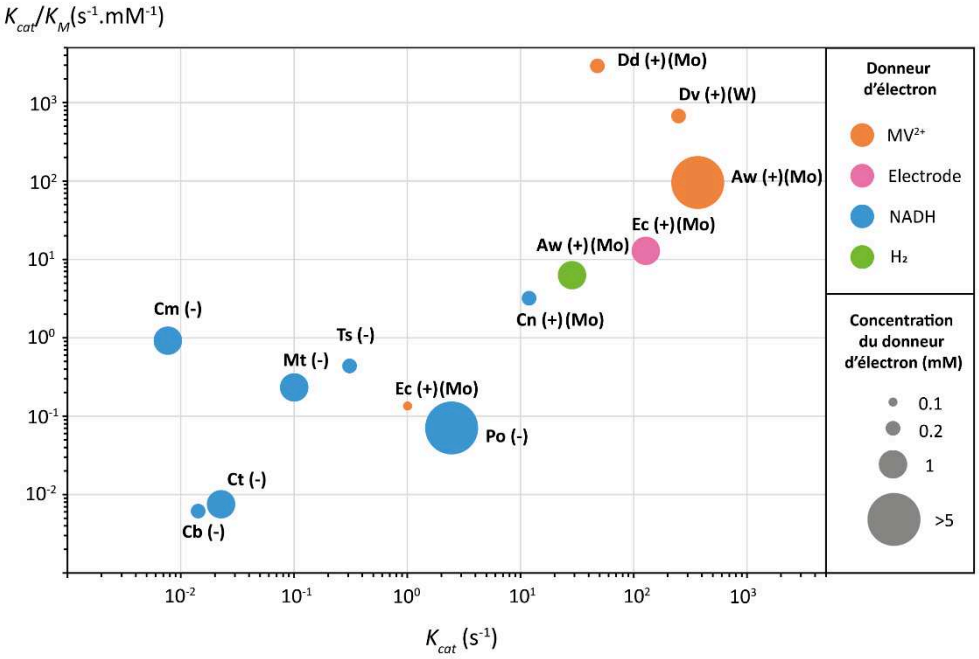


Figure 15 : Efficacité catalytique des FDH pour la réduction du CO_2

Propriétés catalytiques de l'activité CO_2 réductase de 12 FDH caractérisées dans la littérature. Le graphique représente l'efficacité catalytique K_{cat}/K_m en fonction du turnover K_{cat}. Chaque enzyme est représentée par un cercle dont le diamètre indique la quantité de donneur d'électron utilisé pour la réaction, et dont la couleur indique le type de donneur d'électrons. Les enzymes indépendentes des métaux (-) et dépendentes des métaux (+) sont distinguées. La nature du métal (Mo ou W) est précisée si necessaire. Cm: *Candida methylica*, Cb: *Candida boidinii*, Ct: *Chaetomium thermophilum*, Mt: *Myceliophthora thermophile*, Ts: *Thiobacillus sp.* KNK65MA, Ec: *Escherichia coli*, Po: *Pseudomonas oxilatus* (100 mM NADH), Cn: *Cupriavidus necator*, Dd: *Desulfovibrio desulfuricans*, Aw: *Acetobacterium woodii*, Dv : *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. Figure adaptée de (Nielsen, Lange, et Meyer 2019).

Outre les aspects catalytiques, nos connaissances sur les FDH sont limitées par la caractérisation d'un nombre restreint de types, au regard de la vaste diversité existante. Notamment, la connaissance incomplète des modules constituant les FDH et, plus largement les oxydoréductases, laisse des zones d'ombre sur de nombreuses facettes du métabolisme microbien (Rodríguez Del Río et al. 2024; Le et al. 2022) Les avancées récentes de métagénomique ont considérablement fait progresser notre compréhension de la génomique microbienne en découvrant de nombreuses lignées de bactéries et d'archées jusqu'alors inconnues. Toutefois, environ 25 % à près de 50 % des gènes environnementaux ne trouvent pas d'homologues dans les organismes cultivés, ce qui représente des millions de nouveaux gènes dont les aspects fonctionnels et l'importance écologique et évolutive sont actuellement inconnus (Rodríguez Del Río et al. 2024). Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont porté sur l'identification d'une nouvelle famille de FDH, les ForCEs, au sein de la bactérie modèle *Bacillus subtilis*. Ces enzymes possèdent des propriétés atypiques qui les distinguent des autres FDH précédemment caractérisées. Notamment, un site actif non consensus et un module partenaire inédit, que nous avons révélé être

commun à d'autres oxydoréductases, permettant de relier ces dernières à la membrane. Ainsi, l'objectif de ce second chapitre est de fournir une vue d'ensemble sur les différentes FDH caractérisées à ce jour, afin de contextualiser mon travail. Dans une première section, je détaillerai la sous-unité catalytique des FDH dont la structure est très conservée, et dans une seconde section, la diversité et l'importance des modules partenaires dans la versatilité métabolique des FDH. Enfin, je discuterai du caractère évolutif des FDH dans une troisième section.

B. Le site actif des FDH/CO_2R

Comme évoqué précédemment, les FDH possèdent un site actif contenant un atome de molybdène ou de tungstène, essentiel pour assurer l'activité de l'enzyme. Dans cette section, nous allons voir quels sont les éléments qui constituent ce site actif, et quel est l'état des connaissances actuelles sur les paramètres qui déterminent l'activité enzymatique. Notamment, nous aborderons la controverse autour du mécanisme catalytique, ainsi que les mécanismes connus de tolérance à l'oxygène.

1. Disponibilité en Mo et W dans l'environnement

Le molybdène (Mo) et le tungstène (W) sont des métaux de transition ayant une sous-couche électronique incomplète. Ils peuvent donc transiter entre différents états d'oxydation en gagnant ou perdant des électrons. Ainsi, ces métaux sont communément impliqués dans les réactions d'oxydoréduction, où ils échangent des électrons avec les substrats rédox (Hille 2002). La famille des enzymes à Mo/W compte à ce jour une cinquantaine de membres caractérisés, retrouvés au sein des trois grands règnes du vivant (Magalon 2023). Bien que le Mo et le W aient des propriétés physico-chimiques similaires, les enzymes à Mo sont bien plus représentées que les enzymes à W chez les organismes dont on connait la séquence (Grimaldi et al. 2013). De par sa grande solubilité dans l'eau, le molybdène est retrouvé abondamment sur Terre sous forme de molybdate. *A contrario* le tungstène, dont la concentration dans l'océan est 100 fois moins élevée que celle du Mo (Magalon et Mendel 2015), est plutôt disponible dans les environnement réduits et anoxiques. En effet, en étant situé sur la période sous-jacente au Mo dans le tableau périodique, il possède une couche électronique supplémentaire ce qui diminue son électronégativité. Ainsi, en fonction de leur niche écologique, les organismes vont avoir plus facilement accès au Mo ou au W. Notamment, les microorganismes thermophiles possèdent des enzymes à W (Grimaldi et al. 2013). De ce fait, la sur-représentation des enzymes à Mo dans le vivant est très probablement exacerbée par le fait que les organismes ayant accès au W ne sont pas forcément ceux ayant été les mieux caractérisés (De La Haba, Antunes, et Hedlund 2022). Par ailleurs, il est parfois mentionné dans des

publications que le tungstène était certainement bien plus abondant que le molybdène avant la Grande Oxydation, impliquant son utilisation majoritaire par les organismes présents aux origines de la vie (Catling et Zahnle 2020; Anbar 2008).

2. Le cofacteur à molybdène/tungstène

Le cofacteur à Mo/W n'est pas spécifique aux FDH mais commun à de nombreuses autres enzymes catalysant le plus souvent des réactions d'oxydoréduction mais pas seulement et formant collectivement la superfamille des enzymes à Mo/W *bis*-PGD (Grimaldi et al. 2013) (Figure 16). Ce terme renvoi au cofacteur inorganique commun situé au niveau de leur site actif. Ce dernier est constitué d'un atome de Mo ou de W lié à deux molécules de Pyranoptérine Guanosine Dinucléotide (PGD) (Magalon et Mendel 2015) (Figure 16A). En lien avec le fait que les enzymes à Mo/W soient retrouvées chez la majorité des organismes vivants, la biosynthèse des premières étapes du Moco/Wco est conservée dans les trois domaines du vivant (Magalon et al. 2002). La sphère de coordination du métal est composée des deux groupements dithiolènes provenant des PGD et d'un acide aminé de la chaine polypeptidique. Chez les FDH, il s'agit d'une cystéine ou sélénocystéine conservée, dont l'atome de soufre ou de sélénium lie le métal. Enfin, un sixième ligand formé par un atome de soufre inorganique complète la sphère de coordination (Figure 16A). Etant donné que la nature du métal (Mo ou W) n'a pas d'influence sur la coordination du site actif, ni sur le mécanisme catalytique de l'enzyme, seul le terme Moco sera utilisé dans la suite du manuscrit pour parler du cofacteur à Mo ou W, par souci de simplicité. Plus généralement, la superfamille des enzymes à Mo/W *bis*-PGD dont font partie les FDH fait preuve d'une extraordinaire diversité (Magalon, Ceccaldi, et Schoepp-Cothenet 2016). La liste des substrats que ces enzymes utilisent est longue et ne cesse de s'élargir au fil des découvertes, jusqu'à des molécules parfois inattendues telles que la dopamine (Maini Rekdal et al. 2020). Et pourtant, parmi plus de 129 000 séquences recueillies dans les bases de données, seulement 0.1% d'entre elles ont été expérimentalement caractérisées (Le et al. 2022) (Figure 16A). Également, près de 27.5% de ces séquences ne peuvent pas être reliées à une fonction métabolique par manque d'annotation. L'analyse du réseau de similarité de séquence (SSN) présentée en (Figure 16B) illustre la répartition des membres de la superfamille des enzymes à Mo/W *bis*-PGD en une multitude de clusters. La fonction enzymatique des membres d'un cluster est parfois extrapolée par l'identification d'un acteur caractérisé au sein du cluster (Le et al. 2022). Si la fonction de plusieurs clusters est prédite, cela ne reflète qu'une infime partie de la diversité siégeant dans la superfamille, puisque la fonction de près de 98% des clusters reste inconnue.

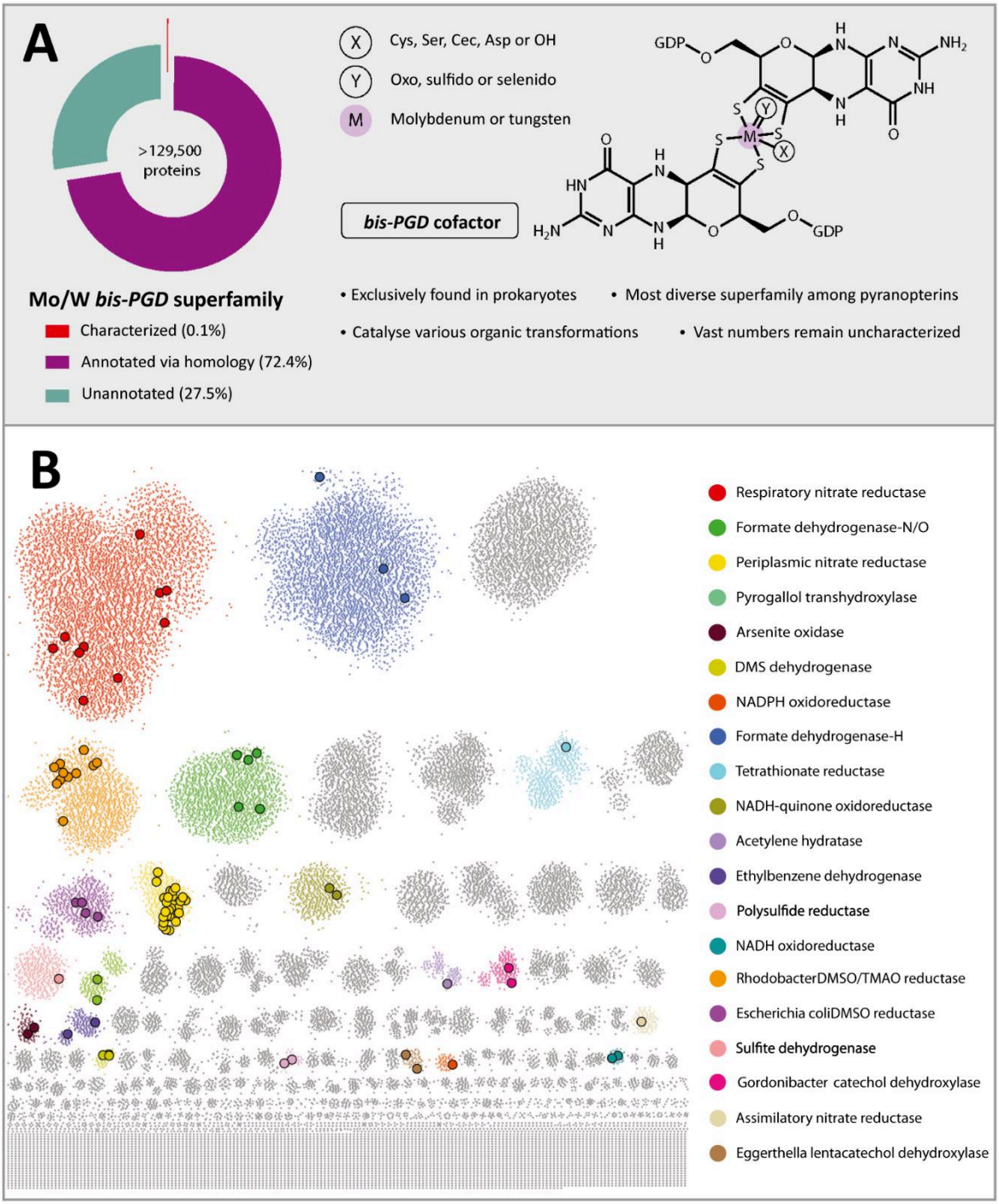


Figure 16 : Les enzymes à Mo/W *bis*-PGD

A : Description du cofacteur à Mo/W *bis*-PGD. Le graphique en anneau représente la proportion de séquences dont la fonction protéique a été caractérisée (rouge), annotée (violet) et non annotée (vert). La structure du Mo/Wco est représentée sur la droite de la figure. Le ligand protéique est représenté par la lettre X. Le ligand axial est représenté par la lettre Y. La diversité des ligands axiaux et protéiques retrouvés en position X et Y dans la superfamille des enzyme à Mo/W *bis*-PGD est détaillée dans la légende au centre de la figure. Figure tirée de (Le et al. 2022)

B : Analyse SSN (Sequence Similarity Network) sur les séquences provenant de la superfamille des enzymes à Mo/W *bis*-PGD (identifiant UniProt : IPR006657). Chaque point représente des séquences ayant plus de 70% d'identité, et deux points sont reliés entre eux si leur pourcentage d'identité est supérieur à 40%. Les groupes ont été définis en utilisant une valeur seuil au sein desquels les membres caractérisés expérimentalement sont représentés par une pastille ronde. Chaque couleur représente une famille d'enzymes dont la fonction est caractérisée. Figure tirée de (Le et al. 2022)

De manière plus fascinante encore, nous verrons dans la section C, à travers l'exemple des FDH, que les familles possèdent également leur propre diversité, et ce malgré une sous-unité catalytique bien conservée.

3. La sulfuration du métal

La présence du soufre inorganique dans la sphère de coordination des FDH n'est pas anodine, et est apparue comme un élément essentiel à leur réactivité. L'enzyme impliquée dans cette étape de sulfuration du métal a été découverte dans l'équipe où j'ai réalisé ma thèse. Il s'agit de la soufre transférase FdhD dont le modèle de fonctionnement est décrit en Figure 17 (Thomé et al. 2012). Chez *E. coli*, l'atome de soufre est initialement extrait d'une cystéine par l'action de la Cystéine désulfurase IscS. L'atome de soufre libéré est séquestré sous la forme de persulfure (SSH) au niveau de la cystéine catalytique d'IscS. Lorsque la soufre transférase FdhD interagit avec IscS, l'atome de soufre est transféré depuis IscS vers le résidu cystéine 121 de FdhD, entrainant la formation d'un nouveau groupement persulfure (Thomé et al. 2012). Par ailleurs, il a été démontré que FdhD et son homologue FdsC chez *Rhodobacter capsulatus*, interagissent *in vivo* avec le Moco (Böhmer, Hartmann, et Leimkühler 2014; Arnoux et al. 2015), laissant penser que la sulfuration de ce dernier se produit en amont de son insertion définitive dans la protéine. Cela fait notamment sens, étant donné que le site actif est enfoui profondément dans la protéine et donc peu accessible. Une fois le Moco soufré puis inséré dans la FDH, cette dernière devient active. Il est important de préciser que la sulfuration du site actif est une étape indispensable pour que la FDH soit fonctionnelle. En effet, l'enzyme FdhF est produite sous forme inactive en absence de FdhD (Thomé et al. 2012) ou lorsque FdhD n'est plus capable de lier le Moco (Arnoux et al. 2015). De manière équivalente, l'enzyme FdsABGD chez *R. capsulatus* est inactive en l'absence de FdsC (Hartmann et Leimkühler 2013).

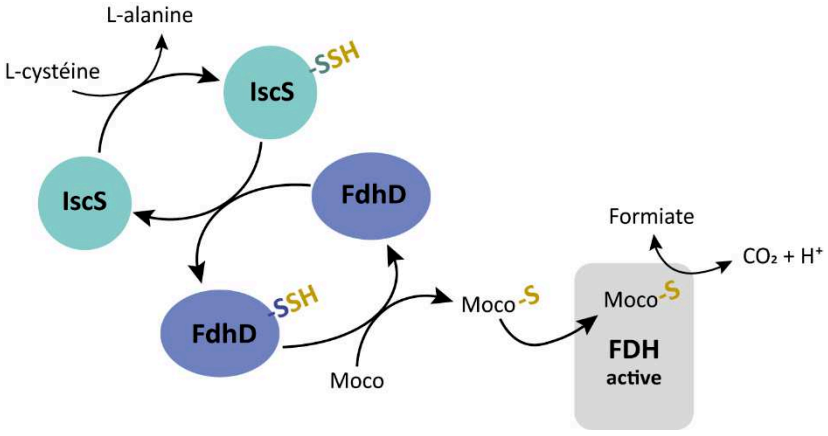


Figure 17 : Modèle proposé pour la sulfuration du Moco

La cystéine désulfurase IscS extrait un atome de soufre d'une L-cystéine, et le séquestre sous la forme de persulfure (SSH) au niveau de la cystéine catalytique. IscS interagit ensuite avec la soufre transférase FdhD, qui récupère l'atome de soufre en formant un persulfure au niveau de la cystéine 121. FdhD interagit ensuite avec le Moco et ajoute un atome de soufre inorganique sur le métal. Le Moco soufré est ensuite inséré dans la protéine cible et cette dernière devient active. Figure adaptée de (Thomé et al. 2012)

4. La sensibilité à l'oxygène du site actif

Les FDH métalliques sont le plus souvent sensibles à l'oxygène, ce qui conduit à leur purification et caractérisation en anaérobiose. Le processus d'inactivation par l'oxygène repose sur la substitution de l'atome de soufre inorganique présent au niveau du site actif par un atome d'oxygène, comme illustré (Figure 18A) (Duffus et al. 2020). Par ailleurs, l'utilisation de molécules telles que l'azide, le cyanate et le cyanide protège le site actif de l'oxydation en empêchant l'oxygène d'accéder au ligand soufre (Leimkühler 2023). En parallèle, une seconde étude démontre que l'enzyme Fds de *Cupriavidus necator* est inactivée par l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Hakopian, Niks, et Hille 2022) qui est une espèce réactive de l'oxygène. Ici encore, l'ajout d'azide et de nitrate permettent de protéger l'activité enzymatique de l'enzyme. En dépit de ce constat, de nombreux travaux rapportent non seulement l'existence d'un métabolisme du formiate faisant appel à des FDH en présence d'oxygène chez de nombreux microorganismes, mais aussi celle de FDH naturellement tolérantes à l'oxygène (Graham et al. 2022; C. Costa et al. 1997; Almendra et al. 1999; Hartmann et Leimkühler 2013). Sur cette base, le paradigme traditionnel selon lequel les FDH sont sensibles à l'oxygène et dédiées au métabolisme anaérobie est remis en question. Néanmoins, les FDH quel que soit leur degré de tolérance à l'oxygène sont extrêmement similaires au niveau de leur séquence protéique ou de leur site actif (Figure 18B), ce qui ne facilite pas la compréhension de ce phénomène.

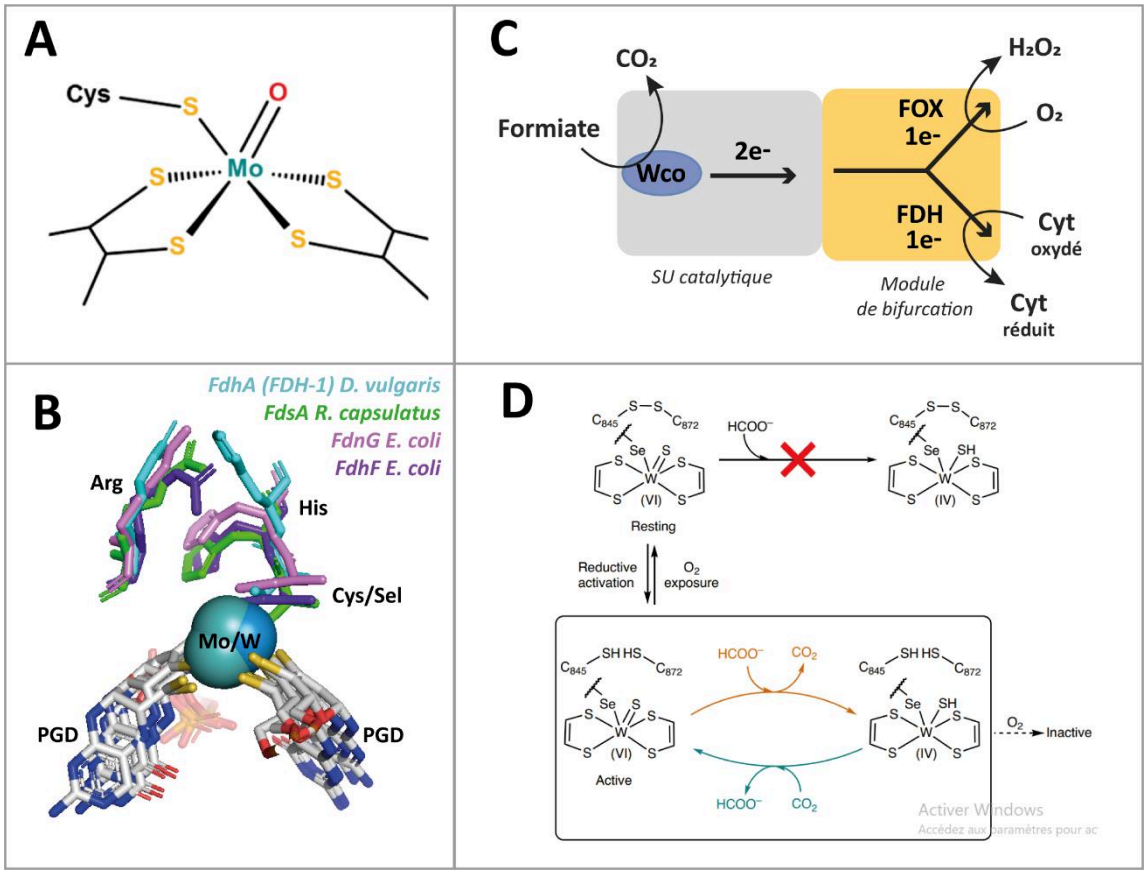


Figure 18 : Les FDH face à l'oxygène

A : En présence d'oxygène, le ligand soufre inorganique est remplacé par un groupement oxo, rendant l'enzyme inactive. Figure tirée de (Duffus et al. 2020).

B : Superposition structurale des sites actifs d'enzymes décrites comme sensibles (FdnG (PDB : 1KQF) et FdhF (PDB : 1FDO)) et tolérante (FdsA (PDB : 6TGA) et FdhA (PDB : 6SDR)) à l'oxygène (Jormakka et al. 2002; Steinhilper et al. 2022; Radon et al. 2020; Oliveira et al. 2024). Les atomes de molybdène et tungstène sont représentés par des sphères tuquoises et bleues, respectivement. Les PGD sont représentées en batônnets blancs, bleus, jaunes et rouges. Les acides aminés consensus arginine, histidine et cystéine/sélénocystéine sont représentés par des batonnets cyan, rose, vert et violet en fonction de l'enzyme dont ils proviennent.

C : L'enzyme FDH-2 de *D. vulgaris* tolère l'oxygène grâce à son activité formiate-oxygène oxydoréductase (FOX). Modèle proposé par Graham et ses collaborateurs (Graham et al. 2022) pour le trajet électronique permettant d'assurer l'activité FOX et la réduction des cytochromes.

D : L'enzyme FDH-1 de *D. vulgaris* tolère l'oxygène grâce à la formation d'un pont disulfure. Schéma représentant le cycle catalytique de FdhAB. Le site actif à l'état W^{IV} est fortement sensible à l'oxygène. En présence d'O_2, un pont disulfure se forme entre les Cys 845 et 872 et l'enzyme reste dans un état oxydé inactif, empêchant le passage du W^{VI} à l'état W^{IV}. En absence d'O_2, les cystéines sont réduites et le pont disulfure est clivé. L'enzyme est active et peut catalyser l'oxydation du formiate ou la réduction du CO_2. Figure tirée de (Oliveira et al. 2024).

Dans ce contexte, des travaux récents sur deux FDH provenant de bactéries anaérobies du genre *Desulfovibrio*, ont ouvert de nouvelles perspectives concernant la compréhension du mécanisme de tolérance à l'oxygène chez ces enzymes. En effet, une première étude de Graham et ses collaborateurs démontre que la FDH-2 de *Desulfovibrio vulgaris*, tolérante à l'oxygène, couple l'oxydation du formiate à la réduction de l'O_2 en H_2O_2 et se protège ainsi de l'oxydation (Graham et al. 2022). Ce résultat inédit montre pour la première fois une activité formiate-oxygène oxydoréductase (FOX) chez les FDH à des concentrations en O_2 atmosphériques et illustre un mécanisme élégant de protection d'une FDH face à l'oxygène. Les auteurs proposent notamment qu'un module de bifurcation électronique permettrait de rediriger un électron issu de l'oxydation du formiate vers l'oxygène (Figure 18C). A ce stade, cela n'est qu'une hypothèse étant donné que la structure de l'enzyme n'a pas été résolue, et qu'il est difficile de prévoir comment va s'effectuer la bifurcation au sein de ce module. D'autre part, l'étude de Oliveira et ses collaborateurs sur la FDH-1 de *D. vulgaris* révèle un autre mécanisme de tolérance à l'oxygène basé sur la formation d'un pont disulfure à 25Å du site actif (Figure 18D) (Oliveira et al. 2024). En présence d'oxygène, les cystéines C845 et C872 forment un pont disulfure qui entraine des réarrangement structuraux au niveau du site actif, empêchant l'enzyme de catalyser l'oxydation du formiate. Cette dernière ne passe donc pas à l'état réduit dans lequel elle est sensible à l'oxygène, et reste protégée dans un état oxydé inactif. En présence d'agent réducteur comme le DTT, les cystéines sont réduites et le pont disulfure rompu, ce qui permet à l'enzyme de retrouver son activité. Ce mécanisme, appelé « switch rédox », a été montré *in vivo*. Les *Desulfovibrio* n'étant pas des organismes vivants en

présence d'oxygène, les auteurs proposent que ce mécanisme soit mis en place pour répondre ponctuellement à un stress oxydant. Plus généralement, ce mécanisme de tolérance semble être seulement spécifique à quelques organismes des ordres des *Thermodesulfobactériota* et des *Nitrospirota*, tout comme la description d'une activité FOX n'a jamais été observée auparavant pour d'autres enzymes. A travers ces deux exemples spécifiques, il apparait donc que la tolérance à l'oxygène par les FDH ne repose pas sur un mécanisme universel. De toute évidence, la caractérisation d'autres types de FDH est requise pour mieux appréhender le phénomène et identifier des pistes d'intervention pour la maîtrise de ces biocatalyseurs réduisant le CO2 dans le cadre d'applications en biotechnologie.

5. Mécanisme catalytique

a. Deux modèles qui s'opposent

Le mécanisme catalytique des FDH est un sujet encore très débattu à ce jour, n'ayant pas abouti à un consensus. Néanmoins, deux modèles alimentés par un certain nombre de publications, sortent du lot. Il est communément accepté que l'oxydation du formiate en CO_2 résulte de l'abstraction d'un proton du formiate. Cette situation est d'ailleurs commune aux FDH qu'elles possèdent ou non un cofacteur métallique au niveau de leur site actif (Leimkühler 2023). Ainsi, la problématique du mécanisme catalytique repose sur deux principales interrogations : (1) comment le formiate est-il stabilisé au niveau du site actif ? et (2) comment le proton est-il arraché au formiate ? Le premier modèle, initialement proposé par Niks et ses collaborateurs (Niks et al. 2016), soutient que le transfert d'hydrure entre le Cα du formiate et le groupe sulfido terminal du site actif s'accompagne de la réduction à deux électrons du Mo/W (Figure 19A). Le retour à l'état Mo^{VI} se ferait en 2 étapes (Mo^{IV} → Mo^{V} → Mo^{VI}) car le centre [4Fe-4S] proximal du Moco accepte un seul électron à la fois. L'utilisation de la spectroscopie à Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) permet d'observer des électrons célibataires. C'est donc une technique particulièrement adaptée à l'étude des métaux de transition oscillant entre différents états d'oxydation (Beinert et Palmer 1965), parmi lesquels certains présentent un électron célibataire observable et dont la signature renseigne sur la nature chimique de son environnement. Cette technique a permis d'observer la présence d'un proton fortement lié au Mo^{V} (état semi-réduit), vraisemblablement au niveau du soufre inorganique axial de la première sphère de coordination (Niks et al. 2016). Par ailleurs, ce modèle est en accord avec le fait que le ligand soufre inorganique est essentiel pour l'activité de l'enzyme, et que sa substitution par un groupement oxo en présence d'oxygène abolit le transfert d'hydrure depuis le formiate. Le second modèle, proposé par Cerqueira et al via des modélisations computationnelles (Cerqueira et al. 2013), soutient que le ligand cystéine/sélénocystéine se dissocie du métal pour

créer une position vacante permettant la fixation du substrat (Figure 19B). Ce mécanisme de « sulfur shift » serait notamment commun aux nitrate réductases périplasmiques (NRs) et aux FDH qui partagent une même sphère de coordination du métal en dépit de 2 substrats (nitrate *versus* formiate) et 2 réactions catalytiques différentes (transfert d'oxo *versus* transfert d'hydrure) (Grimaldi et al. 2013). Les travaux de Hartmann et al (Hartmann et al. 2016) ont montré que le résidu cystéine est détaché du métal, dans des expériences d'alkylation. Ce modèle est également soutenu par le fait que la Cys/SeCys est parfois observée désolidarisée du métal dans certaines structures cristallographiques (Mota et al. 2011; H. C. A. Raaijmakers et Romão 2006). Cependant, l'observation d'un ligand protéique détaché du Moco pourrait résulter de la cristallisation d'une forme inactive de l'enzyme (Oliveira et al. 2020).

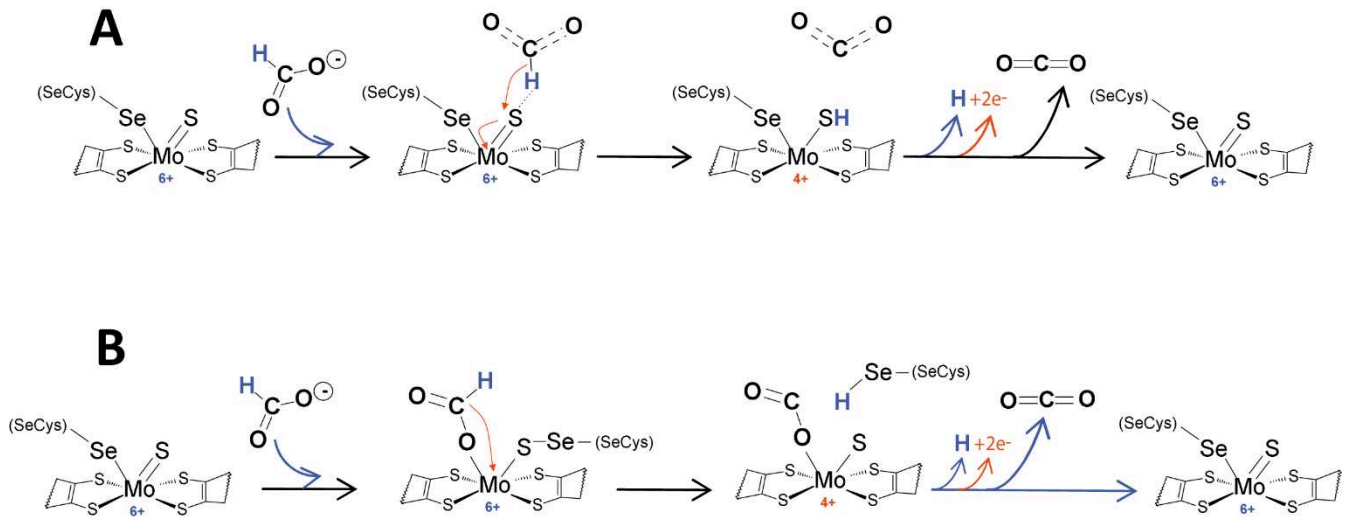


Figure 19 : Modèles décrivant le mécanisme catalytique d'oxydation du formiate en CO_2.

A : Modèle du **transfert d'hydrure** proposé par Niks et ses collaborateurs (Niks et al. 2016). L'atome d'hydrogène (bleu) est arraché au formiate et transféré sur le ligand soufre inorganique. Simultanément, les électrons (orange) sont transmis au Mo/W qui passe de son état oxydé (6+) à réduit (4+). Le CO_2, les protons et les électrons sont ensuite libérés, et le site actif retourne à son état oxydé.

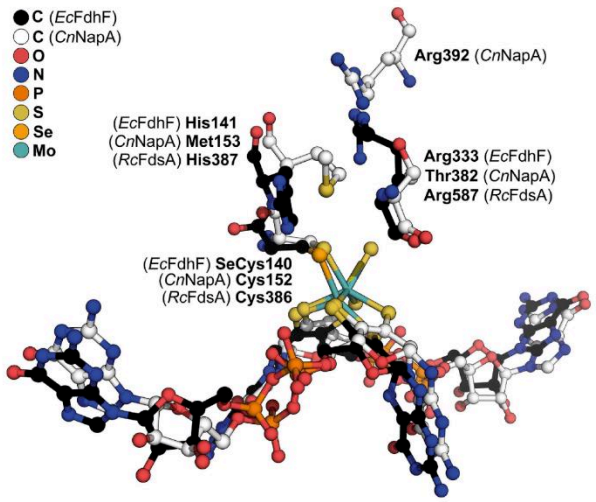
B : Modèle du **sulfur schift** proposé par Cerqueira et ses collaborateurs (Cerqueira et al. 2013). Au cours du cycle catalytique, la décoordination du ligand protéique Cystéine/Sélénocystéine et sa liaison au soufre inorganique libère une position vacante dans la sphère de coordination du métal. Cette position est alors occupée par le formiate. Les électrons (orange) sont transférés au Moco qui devient réduit (+4), et la Cys/Se se désolidarise du ligand soufre pour récupérer le proton du formiate. Le CO_2, les protons et les électrons sont ensuite libérés, le site actif retourne à son état oxydé, et la Cys/Se se coordine au métal.

Figures adaptées de (Maia et al. 2016).

b. Importance des résidus à proximité du Moco

Chez les FDH, les trois acides aminés précédemment évoqués : la cystéine/sélénocystéine, l'arginine et l'histidine sont strictement conservés et localisés à proximité du Mo/W, et constituent une signature de cette famille (Boyington et al. 1997). Comme évoqué ci-dessus, les nitrate réductases périplasmiques et les FDH partagent une même sphère de coordination du métal mais catalysent des réactions à priori totalement différentes, et dans des gammes de potentiel rédox complètement éloignés (-420mV pour les FDH *versus* +400mV pour les NRs). De toute évidence, l'importance de l'environnement protéique est capitale pour ajuster et contrôler la réactivité et la sélectivité de ces enzymes. En effet, les acides aminés retrouvés dans le voisinage immédiat du Mo/W dans les NRs sont différents (Figure 20A). A travers une approche de mutagénèse dirigée, Hartmann et al ont notamment montré que la substitution de l'arginine par une thréonine ainsi que l'ajout d'une arginine supplémentaire, conservées chez les NRs, permettait à la FDH de *R. capsulatus* de réduire le nitrate en nitrite (Hartmann et al. 2016) (Figure 20B). Les acides aminés environnant le site actif contribue donc à spécifier la catalyse. Néanmoins, leur rôle précis chez les FDH est encore débattu. Comme expliqué plus haut, la cystéine/sélénocystéine coordine directement le métal et il a été proposé qu'elle participe à la fixation du formiate en se détachant du Moco, créant ainsi une place vacante pour la fixation de ce dernier (Cerqueira et al. 2013; Hartmann et al. 2016). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont également proposé que l'arginine et l'histidine permettraient l'orientation correcte et la stabilisation du formiate à proximité du site actif (Hartmann et al. 2016). En effet, ils montrent par mutagénèse dirigée que la substitution de l'arginine en thréonine (ayant une chaine latérale non chargée) abolit l'activité de l'enzyme, tandis que la substitution par une lysine (chargée positivement) réduit le K_m de l'enzyme pour le formiate (Hartmann et al. 2016). Également, la substitution de l'histidine par une méthionine décale l'optimum de pH de l'enzyme, et diminue le Km pour le formiate. A ma connaissance, cette étude est la seule à avoir véritablement appréhendé le rôle de ces acides aminés expérimentalement, et il serait intéressant d'appuyer ces conclusions en les validant sur d'autres modèles, étant donné la très haute conservation de ces acides aminés au sein des FDH. En parallèle, il a également été proposé que l'histidine et l'arginine modulent l'accès du substrat au site actif en obstruant les canaux à substrats lors de la catalyse (voir paragraphe suivant) (Oliveira et al. 2020; Radon et al. 2020).

A



B

Protéine	K_{cat} (min^{-1}) Activité MV:Nitrate oxydoréductase
WT	0,21± 0,03
R587T	0,13 ± 0,01
R597+	1,2 ± 0,45
R587T/R597+	2,23 ± 0,43

Figure 20 : Les acides aminés environnants le site actif contribuent à définir la fonction biochimique de l'enzyme.

A : Superposition structurale des sites actifs des FDH FdhF *(E. coli*) et FdsA (*R. capsulatus*) avec le site actif de la Nitrate réductase périplasmique NapA (*Cupriavidus necator*). Chez NapA, l'histidine est remplacée par une méthionine, et l'arginine est remplacée par une thréonine. Une arginine supplémentaire est retrouvée en position 392. Figure tirée de (Hartmann et al. 2016).

B : Tableau listant les valeurs de K_{cat} mesurées lors de la réduction du nitrate en présence de méthyl viologene réduit (MV). L'activité a été mesurée sur l'enzyme FdsA (*R. capsulatus*) WT, R587T, R597+ (mimant la présence de l'arginine retrouvée en position 392 dans NapA) et R587T/ R597+. Valeurs tirées de (Hartmann et al. 2016).

6. L'accès du substrat au site actif

Comme mentionné précédemment, le site actif est généralement enfoui profondément chez les FDH. A titre d'exemple, le site actif de la FDH de *Desulfovribrio gigas* se trouve à 25 Å de la surface de la protéine (H. Raaijmakers et al. 2002). L'accès du substrat au site actif implique donc la présence de tunnels lui permettant de diffuser à travers la protéine. La prédiction de tunnels dans la FDH de *Desulfovibrio vulgaris* a révélé la présence de deux tunnels potentiellement impliqué dans l'accès du formiate et du CO_2 au site actif (Figure 21) (Oliveira et al. 2020). Ces deux tunnels sont différents, l'un est majoritairement composé d'acides aminés protonables, et l'autres d'acides aminés hydrophobes. Au regard des propriétés physico-chimiques du formiate et du CO_2, il a été proposé que le formiate diffuse par le tunnel hydrophile et le CO_2 par le tunnel hydrophobe. Néanmoins, les acides aminés du tunnel à CO_2 sont faiblement conservés au sein des autres séquences de FDH. Notamment, la prédiction du tunnel à CO_2 dans la FDH de *R. capsulatus* (Radon et al. 2020) est différente de celle de *D. vulgaris*, bien que les sous-unités catalytiques soient similaires (Figure 21B). *A contrario*, le tunnel à formiate est conservé entre ces deux protéines avec au moins 70% d'identité (Oliveira et al. 2020).

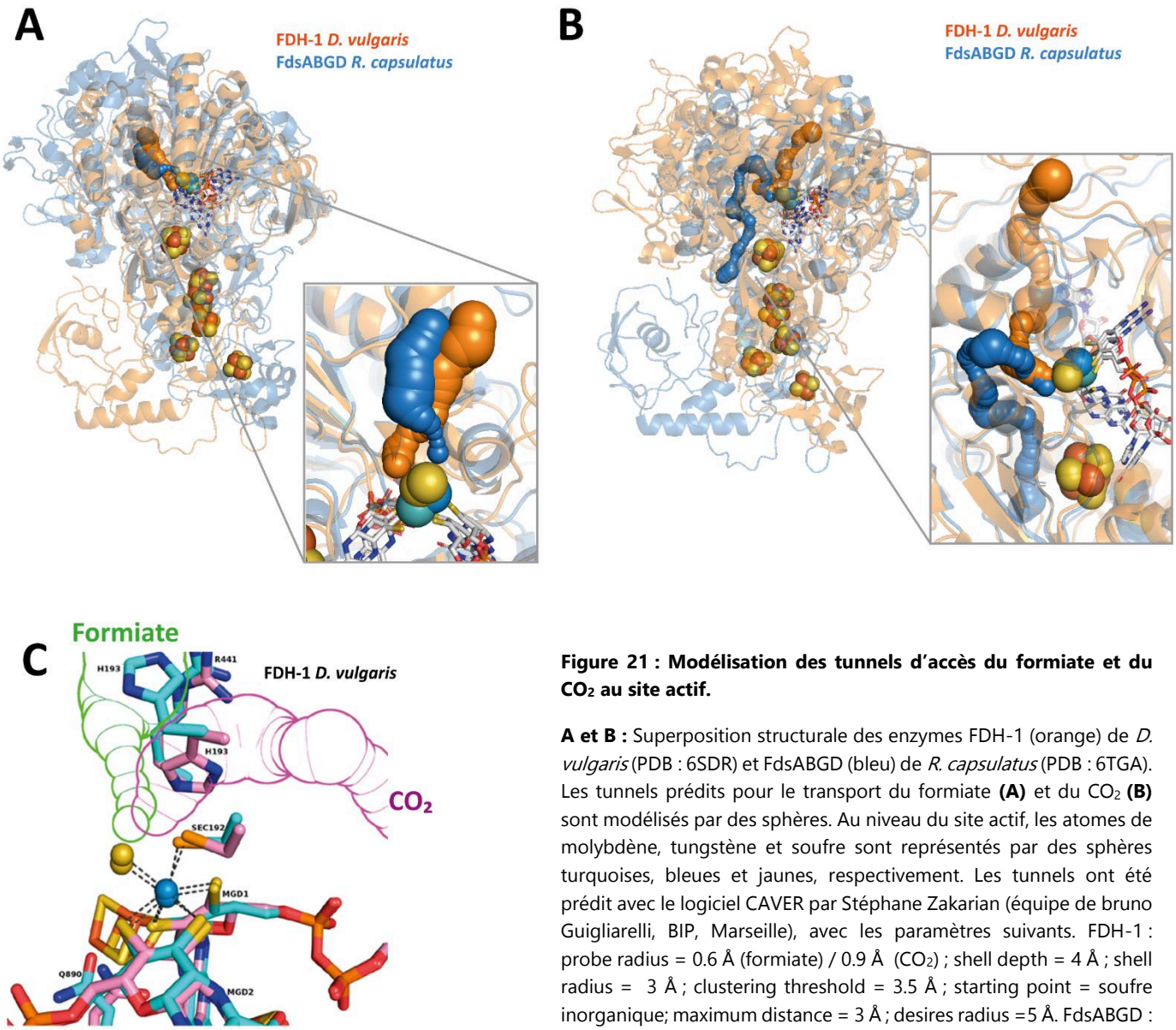


Figure 21 : Modélisation des tunnels d'accès du formiate et du CO_2 au site actif.

A et B : Superposition structurale des enzymes FDH-1 (orange) de *D. vulgaris* (PDB : 6SDR) et FdsABGD (bleu) de *R. capsulatus* (PDB : 6TGA). Les tunnels prédits pour le transport du formiate **(A)** et du CO_2 **(B)** sont modélisés par des sphères. Au niveau du site actif, les atomes de molybdène, tungstène et soufre sont représentés par des sphères turquoises, bleues et jaunes, respectivement. Les tunnels ont été prédit avec le logiciel CAVER par Stéphane Zakarian (équipe de bruno Guigliarelli, BIP, Marseille), avec les paramètres suivants. FDH-1 : probe radius = 0.6 Å (formiate) / 0.9 Å (CO_2) ; shell depth = 4 Å ; shell radius = 3 Å ; clustering threshold = 3.5 Å ; starting point = soufre inorganique; maximum distance = 3 Å ; desires radius =5 Å. FdsABGD : probe radius = 0.97 Å ; shell depth = 8 Å ; shell radius = 3 Å ; clustering threshold = 1 Å ; starting point = soufre inorganique; maximum distance = 3 Å; desires radius =5 Å

C : Superposition structurale des formes oxydée (rose) et réduite (bleu) de l'enzyme FDH-1 de *D. vulgaris*. La chaine latérale du résidu histidine change d'orientation et bascule alternativement du canal à CO_2 (magenta) au canal à formiate (vert) lors du passage de l'état oxydé à l'état réduit. Figure tirée de (Oliveira et al. 2020).

Cependant, ce tunnel se rétrécie significativement à environ 5Å de distance du molybdène, et atteint un diamètre trop petit pour qu'une molécule de formiate puisse passer (Figure 21A). Cela soulève donc des interrogations concernant la capacité de ce tunnel à assurer l'acheminement du formiate jusqu'au site actif. En parallèle, l'accès du substrat au site actif semble requérir des mouvement de l'environnement immédiat. En effet, l'étude d'Ana Rita Oliveira montre un changement de conformation de la chaine latérale de l'histidine conservée entre les états réduit et oxydé de l'enzyme (Oliveira et al. 2020) (Figure 21C). Notamment, dans la structure oxydée, l'anneau imidazole de l'histidine bouche le canal à CO_2, tandis qu'il bouche le canal à formiate dans la structure réduite. En considérant une telle configuration des tunnels, le canal du formiate est donc ouvert à l'état oxydé et permet au formiate de rentrer jusqu'au site actif. Une fois oxydé en CO_2, l'enzyme devient réduite et la chaine latérale de l'histidine bascule dans le canal à formiate. Ce dernier se ferme, tandis que le canal à CO_2 s'ouvre pour relarguer ce dernier hors du site actif. Par ailleurs, dans la structure 3D de la FDH de *R. capsulatus* (Radon et al. 2020) et de la formyl-méthanofuran déshydrogénase de *M. wolfeii* (Wagner, Ermler, et Shima 2018), cette même fonction serait plutôt portée par le résidu arginine, qui pourrait contrôler l'ouverture et la fermeture du canal. Ces données remettent évidemment en cause le tableau général sur les hypothèses formulées jusqu'à présent concernant le rôle associé aux résidus His et Arg. De toute évidence, il est difficile d'extrapoler des conclusions sur le rôle exercé par les acides aminés conservés dans le voisinage immédiat du site actif à partir des quelques données de la littérature, puisqu'elles ne concernent qu'un nombre limité de systèmes. Cela appelle ainsi à la conduite d'études similaires sur d'autres FDH et même sur d'autres enzymes de la famille des Mo/W *bis*-PGD.

C. Organisation modulaire des FDH/CO_2R

Les FDH/CO_2R forment une famille d'enzyme très diversifiée. Elles partagent une sous-unité catalytique conservée, qui les définit en tant que FDH via un site actif à Mo/W *bis*-PGD et un consensus d'acides aminés cystéine ou sélénocystéine, histidine et arginine. Cette sous-unité catalytique est retrouvée seule ou associée à un ou plusieurs modules supplémentaires. Dans cette section, nous verrons comment les différents modules dictent la diversité des FDH en leur donnant accès à des cofacteurs et substrats supplémentaires, permettant leur intégration dans un panel de voies métaboliques. Ces FDH, intégrées dans des voies métaboliques ancestrales telles que la fixation du CO_2, pourraient avoir été héritées du Dernier Ancêtre Commun Universel LUCA.

1. La sous-unité catalytique

En plus du site actif Mo/W *bis*-PGD, la sous-unité catalytique contient un centre [4Fe-4S] (Magalon, Ceccaldi, et Schoepp-Cothenet 2016). Ce dernier est localisé à proximité du site actif, à une distance compatible avec un transfert électronique. De ce fait, il participe au relais électronique entre le donneur et l'accepteur d'électron. En plus du Moco et du centre [4Fe-4S] proximal, la sous-unité catalytique peut lier 3 à 4 centres [Fe-S] supplémentaires au niveau d'une extension de séquence N-terminale, comme l'illustrent les enzymes FdsABGD de *R. capsulatus* (Radon et al. 2020) (Figure 22) et FoDH1 de *Methylorubrum extorquens* AM1 (Yoshikawa et al. 2022). Cette extension N-terminale est un module commun à d'autres oxydoréductases telles que les Hydrogénases ou le Complexe I (Zuchan et al. 2021; Sazanov et Hinchliffe 2006; Broderick et al. 2014). Comme le montre la Figure 22, les centres [Fe-S] de la sous-unité FdsA sont positionnés entre eux à des distances compatibles avec un transfert d'électrons. Leur organisation dans la sous-unité n'est pas linéaire mais définie une forme Y décrite comme « Y junction » par Zuchan et al (Zuchan et al. 2021), où le trajet électronique de sépare en deux voies distinctes formées par deux centres différents. L'enzyme FdsABGD couple l'oxydation du formiate à la réduction du NAD^+ en NADH. Au regard de l'organisation structurale du complexe et du module Y junction, le trajet électronique le plus probable est le suivant (Radon et al. 2020) : l'oxydation du formiate, effectuée au niveau du site actif, libère des électrons qui transitent successivement à travers les centres A1, A2, A3 et A5 de la sous-unité FdsA, puis à travers le centre B1 et le FMN de la sous-unité FdsB. Le FMN est alors le dernier relais électronique avant le site de réduction du NAD^+ en NADH. A travers ce trajet électronique, les électrons circulent ainsi sur une distance d'au moins 76 Å. Lorsque la sous-unité catalytique ne possède pas d'extension N-terminale, les électrons transitent directement entre le centre A1 et le relais électronique suivant (Jormakka et al. 2002; Schuchmann et Müller 2013).

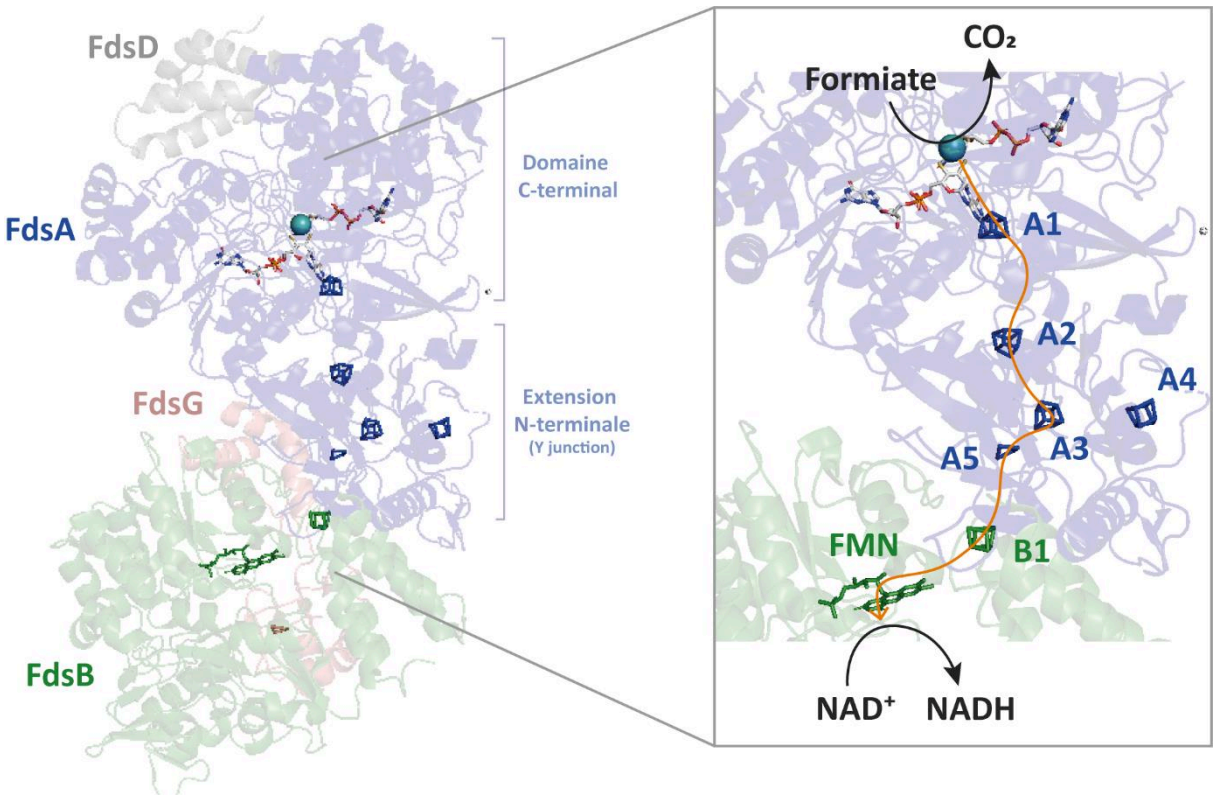


Figure 22 : L'extension N-terminale illustrée chez le complexe FdsABGD.

Représentation structurale du complexe FdsABGD de *R. capsulatus* (PDB : 6TGA). La sous-unité catalytique FdsA est constituée d'un domaine C-terminal contenant le site actif à molybdène et le centre Fe-S proximal (A1), et d'un domaine N-terminal contenant 4 centres Fe-S (A2,A3,A4 et A5). La sous-unité partenaire FdsB, réduisant le NAD^+ en NADH, contient un centre Fe-S (B1) et un FMN. Le trajet électronique probable depuis le donneur d'électron vers l'accepteur d'électron est représenté en orange. Enfin, la sous-unité FdsG contient un centre Fe-S.

2. Les sous-unités partenaires

a. Diversité des modules et voies métaboliques

L'association de FdsA avec FdsB au sein du complexe FdsABGD permet de coupler l'oxydation du formiate à la réduction du NAD^+ (Radon et al. 2020). A travers cette réaction, l'enzyme contribue à un processus métabolique essentiel qui est la régénération du NADH. La nature de la sous-unité partenaire dicte donc la fonction métabolique de la FDH au sein de la cellule. Sur ce principe, la figure 23 illustre, de manière non exhaustive, les différents modules partenaires retrouvés chez les FDH ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles elles s'intègrent. En m'appuyant sur cette figure, et à travers les exemples décrits ci-dessous, je chercherai à souligner la grande variabilité d'organisation modulaire associée à une activité d'oxydation du formiate ou de réduction du CO_2 portée par un domaine FDH. Ces exemples n'ont pas vocation à démontrer les uniques solutions pour catalyser ces réactions. Pour la réduction du CO_2 par exemple, d'autres

flux électroniques pourraient reposer sur l'utilisation du mécanisme de bifurcation électronique (S. Wang et al. 2013), processus qui consiste de façon schématique à pouvoir réaliser une réaction endergonique en la couplant à une réaction exergonique (Baymann et al. 2018; Schut et al. 2022)

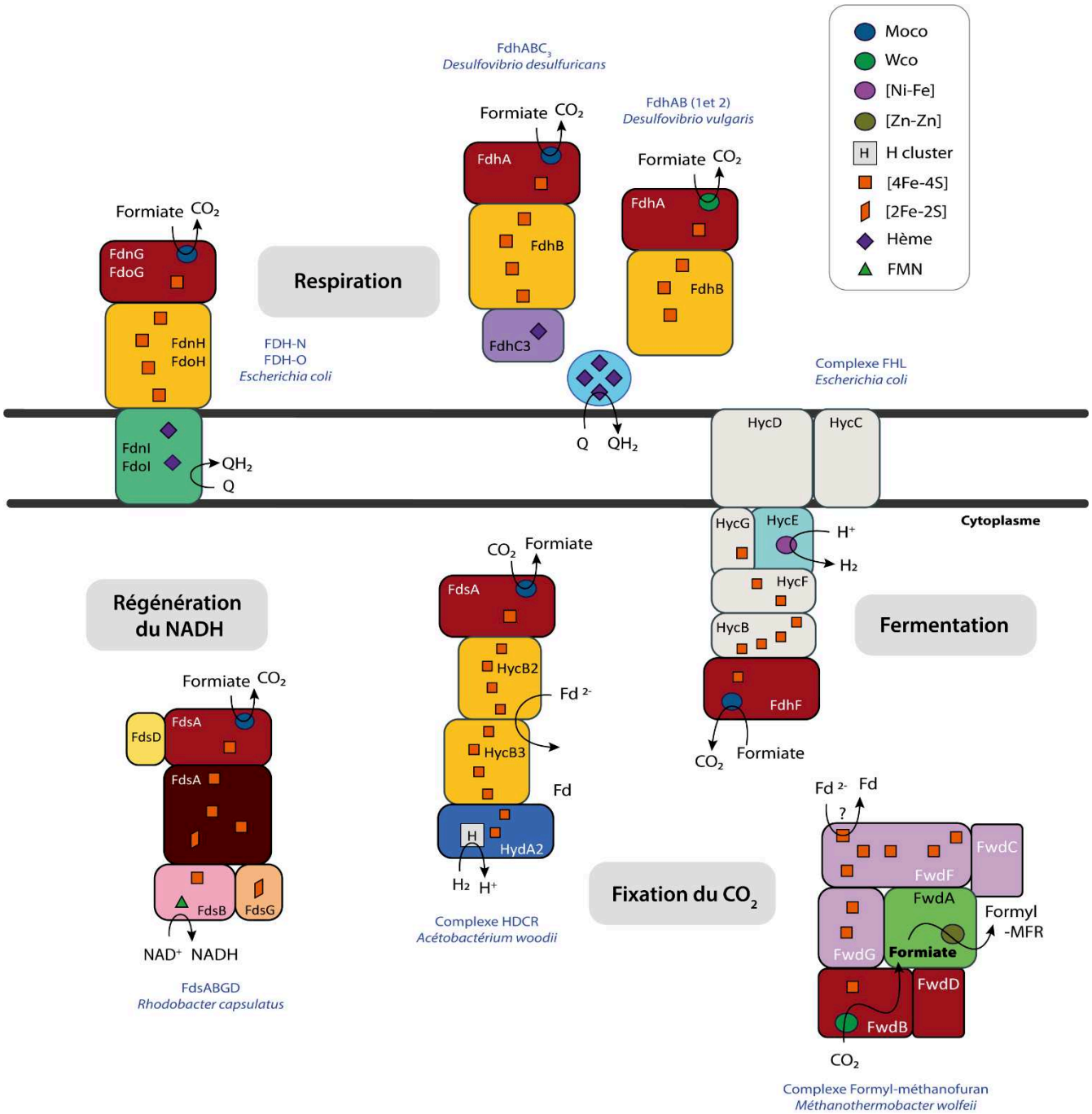


Figure 23 : Schéma non exhaustif illustrant la diversité modulaire des FDH.

Les modules identiques (sur la base de leur repliement tridimentionel) sont représentés de la même couleur. La sous-unité catalytique commune aux FDH est représentée en rouge clair, et l'extension N-terminale en rouge foncé. Chaque protéine est représentée sous sa forme monomérique. La taille des modules et des complexes protéiques n'est pas à l'échelle. Les voies métaboliques dans lesquelles interviennent ces enzymes sont mentionnées à proximité. Figure inspirée de (Nielsen, Lange, et Meyer 2019; Jormakka et al. 2002; Costa et al. 1997; Da Silva, Pacheco, et Pereira 2012; Steinhilper et al. 2022; Wagner, Ermler, et Shima 2016; Radon et al. 2020; Schuchmann et Müller 2013; Oliveira et al. 2020)

Concernant la respiration, *E. coli* possède deux FDH respiratoires périplasmiques (Unden, Steinmetz, et Degreif-Dünnwald 2014), FDH-N et FDH-O (Figure 23), qui couplent l'oxydation du formiate à la réduction des quinones avec un bilan net électrogénique. FDH-N et FDH-O sont des isoenzymes respectivement constituées des sous-unités FdnGHI et FdoGHI. Les sous-unités catalytiques FdnG et FdoG, qui incluent un Moco et un centre [4Fe-4S], interagissent avec les modules FdnH et FdoH contenant 4 centres [4Fe-4S], eux-mêmes reliés aux modules transmembranaires FdnI et FdoI contenant deux hèmes de type b (Jormakka et al. 2002). Ainsi, les électrons provenant de l'oxydation du formiate dans le périplasme transitent via le relais électronique formé par 5 centres [Fe-S] et 2 hèmes, et permettent la réduction des quinones dans la membrane. Grâce à leurs modules supplémentaires, ces FDH s'intègrent ainsi dans le métabolisme respiratoire (Unden, Steinmetz, et Degreif-Dünnwald 2014). Chez les bactéries sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio,* les FDH FdhAB et $FdhABC_3$ solubles dans le périplasme s'inscrivent également dans la respiration en interagissant avec des cytochromes solubles (Figure 23) (Da Silva, Pacheco, et Pereira 2012; Maia, Moura, et Moura 2015; Graham et al. 2022). Ces cytochromes sont des navettes à électrons qui transitent entre les oxydoréductases et les quinones membranaires (Da Silva, Pacheco, et Pereira 2012). Ils ont des potentiels rédox variés qui leur permet de transférer des électrons à un panel d'accepteurs tels que le nitrate, le sulfate ou encore l'oxygène (cas particulier à certaines *Desulfovibrio*) (Da Silva, Pacheco, et Pereira 2012). En tant que sous-unités partenaires transitoires des FDH, ces cytochromes leur permettent de s'intégrer dans différentes voies respiratoires et leur confèrent une versatilité au sein de la cellule.

Comme évoqué dans le chapitre 1, les FDH interviennent également lors de la fixation du CO_2 au sein de la voie de Wood Ljungdahl (WL) (Figure 3 et 23). Chez la bactérie *Acetobacterium woodii*, la réduction du CO_2 en formiate est couplée à l'oxydation du dihydrogène (H_2) par le complexe HDCR (Hydrogen-Dependent CO_2 Reductase) (Schuchmann et Müller 2013). Il est composé de la FDH FdhF associée à l'hydrogénase $HydA\text{-}HycB_{23}$. La sous-unité catalytique de l'hydrogénase HydA oxyde l'H_2 en H^+ avec un site catalytique appelé « H-cluster » composé d'un centre [4Fe-4S] associé à un cluster [2Fe] contenant deux atomes de fer (Britt, Rao, et Tao 2020). Les électrons générés transitent ensuite à travers les 2 modules identiques $HycB_2$ et $HycB_3$ contenant chacun 4 centres [4Fe-4S], jusqu'au site actif à molybdène de FdhF. Le CO_2 est alors réduit en formiate, relargué hors de la protéine, et transformé *in fine* en acétyl-coA puis acétate (Figure 3) (Fuchs 2011). D'autre part, chez les méthanogènes, la réduction du CO_2 en formiate est assurée par l'enzyme Formyl-méthanofuran déshydrogénase (Fwd) (Figure 3 et 23). Structuralement caractérisée chez *Methanothermobacter wolfeii*, il s'agit d'un immense multimère de 24 sous-unités regroupant 4 complexes FwdABCDFG identiques (contenant chacun 6 sous-unités) (Wagner, Ermler,

et Shima 2016) (Figure 24). Les électrons nécessaires à la réduction du CO_2 seraient fournis par une ferrédoxine exogène réduite (E_0'=-500mv) (Wagner, Ermler, et Shima 2016; K. C. Costa et al. 2010) et entreraient par le centre [Fe-S] annoté en vert, localisé en périphérie de la sous-unité FwdF. Ils suivraient ensuite le trajet électronique, formés par les centres Fe-S des sous unités FwdFGB, jusqu'au tungstène où le CO_2 est réduit en formiate. Il est proposé que ce dernier pénètrerait dans le complexe en passant par un tunnel hydrophobe situé dans FwdBD. Le formiate généré transite jusqu'à la sous-unité FwdA à travers un tunnel hydrophile, se lie de manière covalente à un ligand MFR situé à proximité du site actif Zn-Zn, et est condensé en formyl-MFR. Le formyl-MFR est enfin relargué hors de la protéine, et convertit en acétyl-coA et méthane par différentes enzymes (Adam, Borrel, et Gribaldo 2019) (Figure 3).

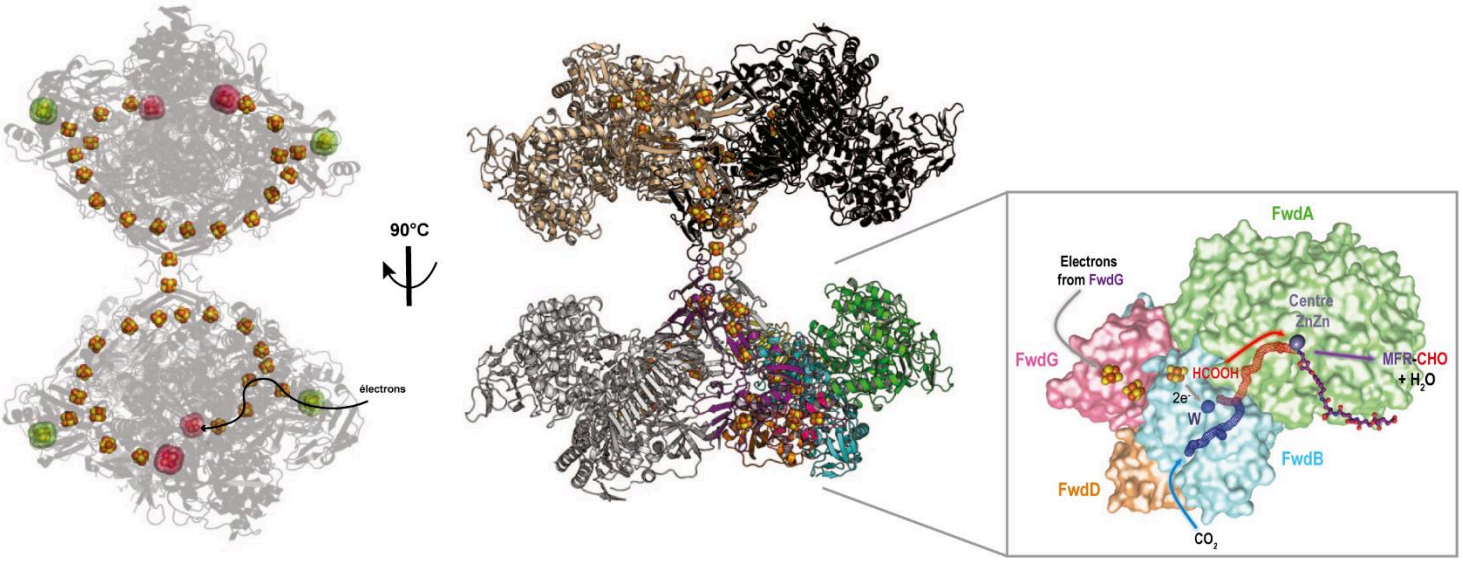


Figure 24 : Le complexe Formyl-méthanofuran de *M. wolfeii*.

La structure du complexe tétramérique $(FwdABCDFG)_4$ (PDB : 5T61) est représentée au **centre** de la figure. Les quatres hétérohexamères FwdABCDFG sont représentés en noir, gris, beige et multicolore, respectivement. FwdA est une amydohydrolase condensant le formiate avec du formyl-méthanofuran (MFR) pour produire du formyl-MFR. Les sous-unités FwdBD forment la FDH réduisant le CO_2 en formiate. FwdC présente une faible identité de séquence avec la glutamate synthase. Enfin, FwdF est une polyferredoxine (4 domaines différents) formant avec FwdG (une autre ferredoxine) un module dédié aux transferts électroniques. Les centres Fe-S sont représentés par des sphères jaune et orange. **Sur la partie gauche**, le complexe est vu de profil et transparent. Pour chaque monomère, le centre Fe-S vert marque le point d'entrée supposé des électrons, et le centre Fe-S rose est le centre proximal localisé proche du site Wco. Le trajet électronique proposé depuis le donneur d'électron vers l'accepteur d'électron est représenté par une flèche noire. **Sur la partie droite**, les sous-unités FwdABDG sont respectivement représentées en vert, bleu, orange et rose. Le tunnel prédit pour le traffic du CO_2 est représenté en bleu. Le tunnel prédit pour le traffic du formiate est représenté en rouge. La molécule du Méthanofuran (MFR) est représentée en violet. Figures tirées de (Wagner, Ermler, et Shima 2016).

Enfin, lors de la fermentation chez *E. coli*, le formiate endogène est consommé par le complexe FHL composé de la formiate déshydrogénase FdhF associée à l'hydrogénase HycBCDEFG (Pinske et Sawers 2016; Steinhilper et al. 2022) (Figure 2 et 23). FdhF est une FDH avec un Moco et un centre [4Fe-4S] qui oxyde le formiate en CO_2. HycE et HycG forment un module hydrogénase contenant un site actif [NiFe] pour la réduction des protons en H_2, et un centre [Fe-S] proximal. HycF et HycB sont des modules ferrédoxines. Enfin, HycD et HycC sont des sous-unités transmembranaires. Ainsi, grâce à son interaction avec l'hydrogénase, la FDH valorise le formiate sous forme d'équivalents réducteurs tel que l'H_2 réutilisables pour d'autres réactions métaboliques (Peters et Sargent 2023).

A travers ces différents exemples, il apparait donc que l'intégration des FDH dans une voie métabolique n'est pas médiée par un module en particulier (Figure 23). La sous-unité catalytique est commune à toute les FDH, mais n'est pas le seul module partagé. En effet, la nature a fait le choix de conserver des modules communs entre les différentes FDH, bien que leur contenu en cofacteur soit modulable (perte ou gain). La diversité des modules donne un accès à différents cofacteurs (centres Fe-S, hèmes, FMN, H-cluster, sites actifs à Moco, Wco, (Ni-Fe], [Zn-ZN], …), permet l'utilisation d'un panel de substrats avec des potentiels rédox variés (Q, NAD^+, H_2, Fd, …) et l'intégration dans diverses voies métaboliques. Finalement, à la simple lecture de cette Figure 23, il est difficile de conclure sur ce qui définit l'activité FDH ou CO_2R de ces enzymes étant donné que les sous-unités catalytiques sont conservées et similaires. L'information concernant la directionnalité des FDH pourrait alors être portée par le module partenaire.

b. Directionnalité des FDH/CO_2R

L'examen de la séquence primaire en acides aminés où même celle de la structure tridimensionnelle lorsqu'elle est disponible ne permet pas de déceler de différences notables entre une FDH et une CO_2R. Ces enzymes partagent un environnement du métal, qu'il soit un atome de Mo ou de W, comparable sur la base d'une description qui ne prend en compte que le ligand protéique (cystéine/sélénocystéine) et deux acides aminés conservés, histidine et arginine. *De facto*, les déterminants moléculaires qui permettent d'orienter la réaction dans un sens plutôt que dans l'autre sont encore mal compris. A ce jour, aucune étude a permis de décrire une FDH capable de catalyser à la fois l'oxydation du formiate et la réduction du CO_2 dans un contexte physiologique. Certaines sont donc dédiées spécifiquement à l'oxydation du formiate (FdsABGD, FoDH1AB, FDH-N, etc…) et d'autres à la réduction du CO_2 (HDCR, Fwd, …). Cela suggère donc qu'un facteur externe à la sous-unité catalytique, en l'occurrence les modules partenaires, pourraient influencer la directionnalité de l'enzyme. Le potentiel redox du couple Formiate/CO_2 est très électronégatif (E_0' = -

432mv) (Maia, Moura, et Moura 2015). Par conséquent, pour que le CO_2 puisse accepter des électrons, ces derniers devront être apportés par un couple ayant un potentiel à minima proche ou plus électronégatif encore que celui du formiate. Avec un potentiel de -410mv (Magalon, Ceccaldi, et Schoepp-Cothenet 2016), le couple H^+/H_2 est un bon candidat. Également, il a été montré que le complexe HDCR est capable de produire du formiate en présence de ferrédoxine (Fd) réduite (Schuchmann et Müller 2013). Les ferrédoxines sont des protéines contenant un ou plusieurs centres [Fe-S] impliquées dans les échanges d'électrons. Il en existe différents types dont les potentiels redox varient de -340mV à -500mV (Buckel et Thauer 2018), ce qui en fait également de bons donneurs d'électrons pour la réduction du CO_2. En résumé, les donneurs d'électrons à très bas potentiels ressortent comme le point commun aux enzymes réduisant le CO_2 dans la Figure 23, et il semble que l'association avec un module hydrogénase ou ferrédoxine plutôt qu'un autre contribue à orienter le sens de la réaction. De manière intéressante, les travaux de M. Roger ont montré que le complexe FHL est également capable de réduire le CO_2 en formiate lors de la croissance *in vivo,* sous haute pression (10 bars) d'H_2 (Roger et al. 2018). Par ailleurs, il avait déjà été proposé en 2009 que le complexe FHL ait pu contribuer aux origines de la vie à travers l'utilisation du CO_2 et de l'H_2 (Nitschke et Russell 2009), dans des environnements où les conditions géochimiques et la biodisponibilité des substrats aient été en faveur de la réduction du CO_2 plutôt que de l'oxydation du formiate (Nitschke 2018; Wells et al. 2023). La question de la réversibilité, c'est-à-dire la capacité à catalyser physiologiquement une réaction dans les deux sens (Fourmond, Plumeré, et Léger 2021), chez les FDH est abordée sous un nouvel angle avec cette enzyme. En effet, de tels résultats laissent imaginer que le complexe FHL pourrait potentiellement fonctionner comme CO_2R dans un organisme vivant au sein d'une niche écologique où les conditions environnementales seraient propices à la réduction du CO_2. Il est d'autant plus intriguant que cette réversibilité ait été démontrée chez *E. coli* ne vivant pas sous haute pression.

En résumé, dans cette section C, nous avons vu l'importance des fonctions portées par les modules partenaires des FDH. Certains de ces modules, comme la sous-unité catalytique ou le module à centres Fe-S, sont d'ailleurs commun à différentes FDH et indépendamment du contexte physiologique dans lequel l'enzyme intervient (Figure 23). A plus grande échelle, ces mêmes modules sont également retrouvés dans d'autres oxydoréductases telles que les enzymes de la famille à Mo/W-*bis*PGD ou encore les Hydrogénases et le Complexe I (Baymann et al. 2003; Zuchan et al. 2021; Grimaldi et al. 2013; Steinhilper et al. 2022). La notion de « kit de construction rédox » définie par Frauke Baymann (Baymann et al. 2003), selon laquelle un set de module rédox aurait servi de base pour façonner l'ensemble des enzymes que l'on connait aujourd'hui, se reflète ainsi à

travers le caractère modulatoire de la famille des FDH. Cela amène à se questionner au sujet de l'histoire évolutive de ces enzymes.

D. Evolution des FDH

Les FDH font partie de la superfamille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD dont la dénomination porte sur la nature du cofacteur présent au niveau de leur site actif (Grimaldi et al. 2013). Les enzymes de cette superfamille partagent un même repliement structural, incluant les motifs permettant la fixation du cofacteur. Néanmoins, elles sont distinguées en différentes familles au regard de leur fonction catalytique (Figure 16B) (Magalon, Ceccaldi, et Schoepp-Cothenet 2016). En effet, en fonction des résidus et ligands qui coordinent le site actif, et de l'environnement proche de ce dernier, elles ne catalysent pas la même réaction (Le et al. 2022). Ainsi, la superfamille des Mo/W-*bis*PGD fait preuve d'une extraordinaire diversité. Cette classification a récemment été étendue par la désignation « Mo/W-*bis*PGD binding domain » (MopB), qui inclue des séquences de protéines ayant conservées le repliement structural mais perdu la capacité à lier le cofacteur (Wells et al. 2023). C'est le cas notamment de NuoG, l'une des sous-unités du complexe NADH : quinone oxydoréductase ou complexe I retrouvé chez de nombreux organismes procaryotes mais aussi eucaryotes. La protéine NuoG possède un domaine de type Mo-*bis*PGD (dont les motifs de fixation sont dégénérés) fusionné à un module Y junction (Zuchan et al. 2021).

La notion de perte de fonction ou encore de fusion ou gain de module est centrale dans l'histoire évolutive de ces enzymes. En combinant des analyses phylogénétiques et des données géochimiques relatant de la disponibilité des substrats, plusieurs auteurs ont pu conclure que certains membres de la superfamille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD ont très certainement été présent chez l'ancêtre commun, LUCA (Weiss et al. 2016; Martin et al. 2016). C'est le cas notamment de certains membres de la famille des FDH (Schoepp-Cothenet et al. 2012; Wells et al. 2023; Miralles-Robledillo et al. 2019) (Figure 25). L'analyse phylogénétique présentée dans la figure 25A porte sur quelques membres de la superfamille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD. Les différentes familles d'enzymes se discriminent les unes des autres par des clades, au sein desquelles sont distinguées les séquences archéennes (orange et violet) des séquence bactériennes (bleu, vert et cyan). Les auteurs constatent que dans la famille FDH, les séquences d'archées et de bactéries se placent dans des embranchements distincts ayant évolués indépendamment. Le fait que la phylogénie d'une famille de protéines, ici les FDH, recrée une distribution monophylétique similaire à celle de l'arbre de la vie est un argument en faveur de sa présence chez LUCA (Weiss et al. 2016; Ducluzeau et al. 2014).

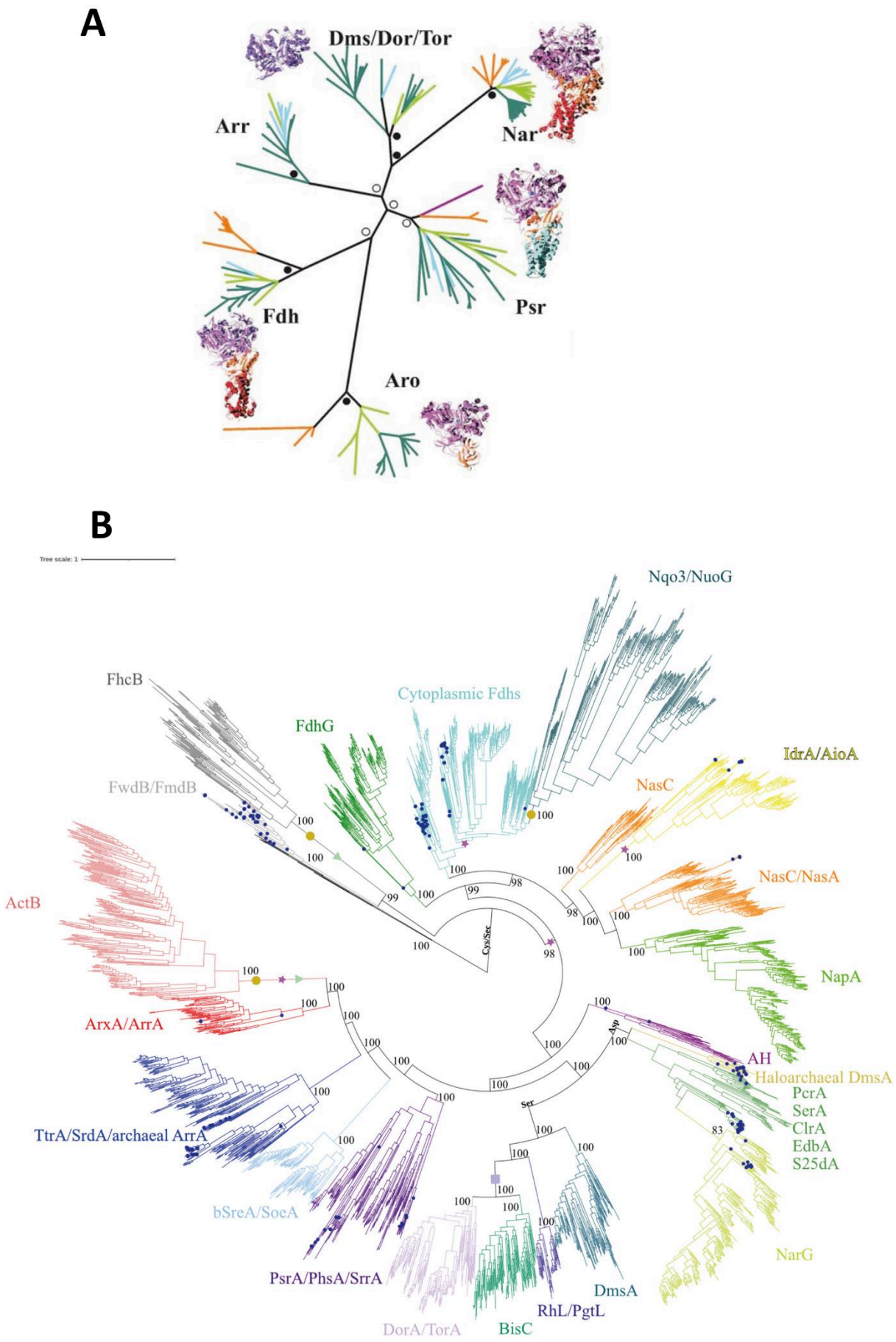

A
Dms/Dor/Tor
Arr
Nar
Psr
Fdh
Aro
B
Tree scale: 1
Nqo3/NuoG
FhcB
Cytoplasmic Fdhs
FdhG
IdrA/AioA
FwdB/FmdB
NasC
NasC/NasA
ActB
NapA
ArxA/ArrA
AH
Haloarchaeal DmsA
PcrA
SerA
ClrA
EdbA
S25dA
TtrA/SrdA/archaeal ArrA
bSreA/SoeA
NarG
PsrA/PhsA/SrrA
DmsA
RhL/PgtL
DorA/TorA
BisC
Cys/Sec
Asp
Ser

Figure 25 : Phylogénie des FDH

A : Analyse phylogénétique de séquences d'enzymes à Mo/W *bis*-PGD réalisée à partir d'alignements multiples de séquences et tenant en compte de l'alignement structural des sous-unités catalytiques. Sur la base des membres dont la fonction a été caractérisée, 6 familles ont été distinguées. Les branches d'euryarchées et crénarchées sont représentées en violet et orange, respectivement. Les branches de protéobactéries, firmicutes et autres embranchements bactériens sont représentées en vert foncé, bleu et vert clair, respectivement. Les ronds vides et pleins indiques des valeurs de bootsrap supérieures à 70 et 90% respectivement. Les structures 3D de membres caractérisés au sein d'une famille sont représentées. La sous-unité catalytique est colorée en violet. Figure tirée de (Schoepp-Cothenet et al. 2012).

B : Analyse phylogénétique sur plus de 3000 séquences MopB. Les séquences proviennent d'organismes cultivables dont le génome a été séquencé. Les pastilles bleues représentent les séquences provenant d'archées. Les différentes familles d'enzymes MopB sont représentées par des couleurs différentes. Les pastilles oranges représentent l'évènement de perte du cofacteur Mo/W *bis*-PGD au sein d'une famille. Les étoiles roses représentent l'acquisition d'un domaine protéique au sein d'une famille. Les triangles verts indiquent que la famille a perdu sa fonction catalytique. Les carrés violets indiquent la perte du centre Fe-S proximal. Figure tirée de (Wells et al. 2023).

Au sein des FDH, cette répartition est également observée pour le cas de la Formylméthanofuran déshydrogénase dont les séquences forment deux groupes monophylétiques distincts, l'un bactérien, l'autre archéen (Figure 25B) (Wells et al. 2023). Cependant, dans l'étude de Wells et collaborateurs parue en 2023, plusieurs sous-familles de FDH sont distinguées et leur phylogénie ne suit pas forcément une dichotomie archées/bactéries. Notamment, les FDH périplasmiques sont presque uniquement retrouvées chez les bactéries. Elles émergent d'un nœud ayant donné naissance à un ancêtre commun aux FDH cytoplasmiques, sous-famille au sein de laquelle une tendance dichotomique archée/ bactérie se dessine. Cela amène à considérer un scénario selon lequel les FDH périplasmiques ont évolué au sein des bactéries, et acquise par les archées via un transfert horizontal de gène. Néanmoins, il est important de garder en tête que la sous-représentation des génomes d'archées apporte un biais dans cette interprétation. En effet dans cet arbre, les séquences d'archées ne représentent qu'1% de la totalité des séquences utilisées. Les informations pouvant être tirées des analyses phylogénétiques sont donc limitées par la disponibilité des métagénomes et la caractérisation des membres qui en découlent. Afin de pouvoir au mieux retracer l'histoire évolutive des FDH, il est donc nécessaire de s'appuyer sur une étude se voulant être la plus exhaustive possible au regard des différentes sous-familles de FDH décrites et annotées à ce jour. Cette analyse de la diversité des FDH non appréhendée dans les études bio-informatiques publiées jusqu'à présent, sera notamment abordée dans le second chapitre des résultats. Par ailleurs, un mécanisme permettant à une nouvelle famille ou sous-famille de se distinguer des autres est l'acquisition, la perte, ou le réarrangement de domaines. La perte du cofacteur à Mo/W, illustrée par un cercle jaune, montre que cet évènement s'est produit à trois reprises de manière indépendante, donnant naissance aux groupes NuoG, FhcB ou ActB (Figure

25B). L'absence de séquences archéennes dans ces sous-familles laisse penser que cet évènement a eu lieu chez l'ancêtre commun aux bactéries, après la divergence avec les archées.

Par ailleurs, d'autres analyses de la littérature vont dans le sens que des voies métaboliques impliquant des FDH aient été présentes chez LUCA. En effet, le fait que les analyses phylogénétiques suggèrent que des enzymes telles que les Fwd, utilisant le CO_2, aient existées chez LUCA implique que leur substrat ait été disponible dans l'environnement à cette période. Dans les cheminées hydrothermales actuelles, la production abiotique de formiate et d'H_2 a été mise en évidence (Lang et al. 2018; Martin et al. 2016). Dans ces environnements réducteurs où de l'H_2 est retrouvé, la réduction du CO_2 est thermodynamiquement favorisée, appuyant le fait que les organismes ayant vécu dans des environnements similaires aux origines de la vie ont certainement utilisé des voies de réduction du carbone comme la voie de WL (Weiss et al. 2016). Par ailleurs, l'analyse d'anciens sédiments permet d'affirmer la disponibilité d'éléments tels que le molybdène, le tungstène, le fer ou encore le soufre dans les océans il y a plusieurs milliards d'années (Anbar 2008). Ce critère est un point essentiel pour soutenir le caractère ancien des FDH, étant donné que leur activité repose sur la présence de cofacteurs métalliques constitués de ces éléments. Au regard de ces observations, croisées avec des analyses phylogénétiques, il est proposé dans la littérature que LUCA ait émergé comme un organisme anaérobie autotrophe utilisant la voie de WL, d'une manière dépendante des FDH, pour produire du carbone et de l'énergie à partir de CO_2 et d'H_2 (Weiss et al. 2016).

OBJECTIFS DE THESE

Comme nous venons de le voir dans la section A du Chapitre 2 de l'introduction, l'étude des FDH suscite un intérêt grandissant depuis les dernières décennies. Néanmoins, la compréhension de ces systèmes se heurte à l'impressionnante diversité existant au sein de cette famille d'enzyme et à la caractérisation d'un nombre restreint de membres. De ce fait, de nombreuses questions restent encore en suspens. Par exemple, le mécanisme catalytique est encore discuté à ce jour, un consensus d'acide aminés dans l'environnement proche du site actif est décrit sans que leur rôle n'ait été clairement défini et les déterminants moléculaires responsables de la tolérance à l'oxygène ne sont pas compris. L'état des lieux de la littérature pousse donc à vouloir décrire de nouvelles FDH et la caractérisation de systèmes non-canoniques apparait être une approche pertinente pour aborder ces questions sous un nouvel angle. Avant mon arrivée en thèse, une étude bio-informatique préliminaire conduite dans l'équipe avait révélé l'existence d'une branche phylogénétique rassemblant des séquences codant pour de possibles FDH et présentant une organisation génomique inédite. Parmi les organismes possédant ces enzymes, *Bacillus subtilis* est apparu comme un modèle d'étude pertinent étant donné qu'une activité formiate déshydrogénase d'origine inconnue y avait été détectée en 1995 (Glaser et al. 1995).

Mon projet de thèse a donc porté sur la caractérisation de cette nouvelle famille de FDH, appelée ForCE, en utilisant *Bacillus subtilis* comme modèle d'étude. Pour mener à bien ce projet, les objectifs suivants ont été définis :

(1) Caractériser ces enzymes au niveau biochimique, enzymatique, spectroscopique et structural.

(2) Réaliser une analyse bio-informatique de cette nouvelle famille et de la sous-unité partenaire qui la compose.

(3) Caractériser le rôle de la sous-unité partenaire atypique au sein de l'enzyme.

(4) Caractériser la fonction physiologique de ces enzymes.

(5) Comprendre le métabolisme du formiate chez *B. subtilis*.

Ces travaux ont fait l'objet de diverses collaborations, ayant aboutis à **deux publications**, **un manuscrit en cours de révision** et **un manuscrit en cours de rédaction**, qui seront présentés dans la partie résultat. La première publication (Arias-Cartín et al. 2022) permet d'adresser le premier objectif de cette thèse. Le manuscrit en cours de révision (Broc et al.) couvre le premier, deuxième, troisième et quatrième objectif. Enfin, le manuscrit en cours de rédaction (Broc et al.) concerne le quatrième et cinquième objectif. Par ailleurs, j'ai placé en annexe la publication (Meneghello et al. 2023) qui est en lien avec le premier objectif, étant donné que ma contribution y a été mineure et que les approches utilisées sont en dehors du champ de mes compétences.

RESULTATS

Partie 1a : Caractérisation des enzymes FDH non-canoniques : ForCE1 et ForCE2

La volonté de caractériser un nouveau système FDH ayant des caractéristiques qui se distinguent des autres enzymes a été à l'initiative de la découverte des ForCE chez *Bacillus subtilis*. Ces dernières ont été révélées à travers des analyses bio-informatiques réalisées par R. Arias-Cartín (co-premier auteur de la publication présentée ci-après). L'analyse du génome de *Bacillus subtilis* a révélé la présence de deux gènes *forC1* et *forC2* codant pour les enzymes ForC1 et ForC2 partageant 60% d'identité. Les annotations de séquences ont indiqué la présence d'un domaine de liaison du Moco et de cinq sites de coordination pour des centres Fe-S, suggérant la présence d'une extension du domaine N-terminal dans ces sous-unités. Également, l'analyse de la séquence montre que l'histidine consensus du site actif est substituée par une glutamine, ne permettant pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agisse véritablement de FDH. Par ailleurs, les gènes *forC1* et *forC2* sont respectivement retrouvés en opérons avec les gènes *forE1* et *forE2*. De manière intéressante, l'annotation des séquences de ForE1 et ForE2 ne prédit pas de segment transmembranaire ni de consensus pour la fixation de cofacteurs. La but de ces premiers travaux a donc été d'isoler les enzymes ForCE1 et ForCE2 et de les caractériser. Pour cela, les deux enzymes ont été surproduites dans leur hôte d'origine, *Bacillus subtilis* et purifiées. Des outils et méthodes de biologie moléculaire, de culture microbienne, et de purification de protéines ont donc été mis en place et adaptés chez cet organisme. Une fois purifiées, les enzymes ont été caractérisées sur le plan enzymologique et leur capacité à oxyder le formiate a été testée. Pour cela, des mesures d'activités ont été mise en place en présence d'un accepteur d'électrons artificiel. A ce stade, nous nous sommes demandés quel était l'accepteur d'électrons physiologique ? Des éléments de réponse ont été apportés grâce à l'analyse de ForCE1 et ForCE2 par spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) réalisée en collaboration. La spectroscopie RPE a permis de caractériser le Moco et les centres [Fe-S] des enzymes ForCEs et d'identifier un signal apparenté à une espèce ména-semiquinone. Cette découverte inattendue nous a amené à rechercher une activité formiate : ménadione oxydoréductase chez ForCE1 et ForCE2 et à doser et identifier les espèces lipidiques co-purifiées avec ces enzymes. Enfin, nous nous sommes demandés si les sous-unités catalytiques ForC se distinguent des autres FDH à extension N-terminale, quelle

est leur répartition au sein des génomes et les gènes *forC* sont-ils toujours en synténie avec les gènes *forE* ? Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une analyse phylogénétique combinée à une analyse de l'environnement génomique.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal JBC (Journal of Biological Chemistry) le 6 novembre 2021 dans lequel je figure en qualité de 6ième auteure. Il s'inscrit dans le cadre d'une ANR collaborative MOLYERE avec l'équipe du Pr. Bruno Guigliarelli au laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) à Marseille. Son équipe est spécialisée dans l'analyse bio-physique des métalloprotéines.

Mes contributions :

Lors de mon arrivée au laboratoire, les complexes ForCE1 et ForCE2 avaient été purifiés chez *Bacillus subtilis*, et leurs activités Formiate : BV oxydoréductase avaient été démontrées. Également, la ménaquinone avait été identifiée comme étant l'accepteur physiologique d'électrons par RPE et HPLC couplée à de la détection électrochimique et spectrométrie de masse. Les analyses spectroscopiques ont fait l'objet du projet de thèse d'A. Uzel, co-premier auteur du papier. A la suite de cela, j'ai été formée à la production et à la purification de l'enzyme ForCE1, et j'ai participé à la caractérisation enzymatique de son activité formiate : ménadione OR en anaérobiose. J'ai construit des souches pour purifier ForC2 sans ForE2. Également, j'ai mis en forme mes résultats lors de la rédaction de l'article.

Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase

Received for publication, July 15, 2021, and in revised form, October 18, 2021 Published, Papers in Press, November 6, 2021,
https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384

Rodrigo Arias-Cartín[1,2,‡,*], Alexandre Uzel[2,‡], Farida Seduk[1], Guillaume Gerbaud[2], Fabien Pierrel[3], Marianne Broc[1], Régine Lebrun[4], Bruno Guigliarelli[2], Axel Magalon[1], Stéphane Grimaldi[2,*], and Anne Walburger[1,*]

From the [1]Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR7283), IMM, IM2B, Marseille, France; [2]Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (UMR7281), IMM, IM2B, Marseille, France; [3]Grenoble Alpes Université, CNRS, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France; [4]Aix Marseille Université, CNRS, Plateforme Protéomique de l'IMM, IM2B Marseille Protéomique (MaP), Marseille, France

Edited by Ruma Banerjee

The molybdenum/tungsten—*bis*-pyranopterin guanine dinucleotide family of formate dehydrogenases (FDHs) plays roles in several metabolic pathways ranging from carbon fixation to energy harvesting because of their reaction with a wide variety of redox partners. Indeed, this metabolic plasticity results from the diverse structures, cofactor content, and substrates used by partner subunits interacting with the catalytic hub. Here, we unveiled two noncanonical FDHs in *Bacillus subtilis*, which are organized into two-subunit complexes with unique features, ForCE1 and ForCE2. We show that the formate oxidoreductase catalytic subunit interacts with an unprecedented partner subunit, formate oxidoreductase essential subunit, and that its amino acid sequence within the active site deviates from the consensus residues typically associated with FDH activity, as a histidine residue is naturally substituted with a glutamine. The formate oxidoreductase essential subunit mediates the utilization of menaquinone as an electron acceptor as shown by the formate:menadione oxidoreductase activity of both enzymes, their copurification with menaquinone, and the distinctive detection of a protein-bound neutral menasemiquinone radical by multifrequency electron paramagnetic resonance (EPR) experiments on the purified enzymes. Moreover, EPR characterization of both FDHs reveals the presence of several [Fe-S] clusters with distinct relaxation properties and a weakly anisotropic Mo(V) EPR signature, consistent with the characteristic molybdenum/bis-pyranopterin guanine dinucleotide cofactor of this enzyme family. Altogether, this work enlarges our knowledge of the FDH family by identifying a noncanonical FDH, which differs in terms of architecture, amino acid conservation around the molybdenum cofactor, and reactivity.

Formate dehydrogenases (FDHs) catalyze the oxidation of formate into CO_2 but have also been shown to catalyze the reverse reaction in methanogenic and/or acetogenic microorganisms, namely the reduction of CO_2 into formate (1). Metal-dependent FDHs (hereafter named FDHs) are exclusively found in prokaryotes, and 3D-structure–based phylogeny demonstrates that such enzymes were already present in the last universal common ancestor (2). In addition, paleogeochemistry suggests that in ancient times, compounds such as CO_2 and CH_4 were very abundant and that iron, molybdenum, and tungsten were available and in soluble forms (3, 4). Indeed, FDHs harbor molybdenum or tungsten at the active site as well as one to five iron–sulfur cluster(s) (1, 5–8). The molybdenum or tungsten atom is coordinated by the dithiolene sulfurs of two organic pyranopterin guanine dinucleotides (Mo/W-*bis*-PGD) (1, 9), a cysteine or a selenocysteine and a sulfido group, all being essential for the activity (10–12). In addition, an histidine and an arginine residue located in proximity to the Mo atom (13) are strictly conserved in all FDHs described so far (Fig. 1*A*) and required for activity (14). These residues have been proposed to be involved in correct orientation or stabilization of the formate in the active site (15–17), but their role in activity is still debated. They could also act as a switch to obstruct alternatively the substrate and the product tunnels during catalysis, as suggested by the 3D structure of the FDHs from *Rhodobacter capsulatus* and *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanothermobacter wolfeii* (18–20). Altogether, there is still a need for clarifying the exact role of these conserved residues surrounding the catalytic site in FDH activity.

From a physiological point of view, FDHs are involved in a wide range of anaerobic metabolic pathways, such as energy harvesting and carbon fixation (6, 9). This is due to the interaction of the catalytic subunit that harbors the Mo/W-*bis*-PGD cofactor with partner subunits with the greatest diversity among the Mo/W-*bis*-PGD enzyme superfamily (9). In methanogenic archaea, FDH is part of a complex that facilitates a two-step reduction of CO_2 to formate and then to

‡ These authors contributed equally to this work.
* For correspondence: Anne Walburger, walburger@imm.cnrs.fr; Rodrigo Arias-Cartín, rodrigo.ariascartin@pasteur.fr; Stéphane Grimaldi, stephane.grimaldi@univ-amu.fr.
Present address for Rodrigo Arias-Cartín: Stress Adaptation and Metabolism Unit, Department of Microbiology, Pasteur Institute, CNRS, Microbiologie Integrative et Moléculaire (UMR 2001), Paris, France.

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier Inc on behalf of American Society for Biochemistry and Molecular Biology. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

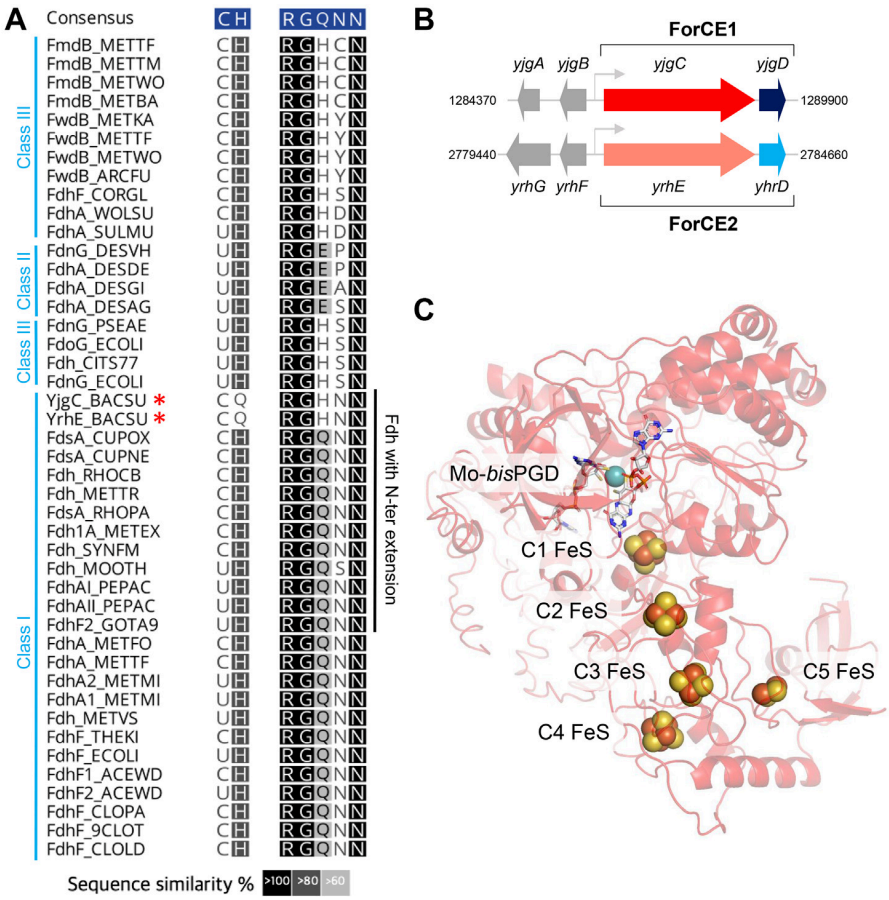


Figure 1. *Bacillus subtilis* genome encodes putative noncanonical FDHs. *A*, alignment of the amino acids involved in the active site of characterized FDH enzymes and the two putative FDH proteins from *B. subtilis* (*red asterisks*). Consensus sequence (*blue box*) shows which amino acids are conserved with a 50% threshold. FDHs have been organized into three classes according to the sequence and organization of their active site (Fig. S7): Class I: C/UH RGQ or C/UQ RGH, class II: C/UH RGE, and class III: C/UH RGH. Overview of the full sequence alignment is shown in Figure S1*B*. *B*, genomic organization of *yjgCD* (ForCE1) and *yrhED* (ForCE2) *in B. subtilis*. *C*, structural model of YjgC generated with I-TASSER (89) using FdsA from *R. capsulatus* (PDB ID: 6TGA). FeS clusters are named according to their proximity to the Mo cofactor in the 3D structural model. FDHs, formate dehydrogenases.

formyl-methanofuran (20). In bacteria, the membrane-bound FDH complex couples formate oxidation to quinols production in anaerobic respiratory chains (21), and the soluble FDH from *Cupriavidus necator* and *R. capsulatus* couples formate oxidation to NADH reduction that feed the reductive pentose phosphate cycle (22, 23). To summarize, FDHs are a group of heterogenous enzymes that display different subunit composition from the single monomeric subunit FdhF from *Escherichia coli* to the six-subunit complex formyl-methanofuran dehydrogenase (13, 20), and partner subunits hold a variety of redox cofactors ([Fe-S] clusters, hemes, F_{420}, FMN) that allow reaction with a wide variety of physiological redox partners, such as cytochromes, ferredoxins, NAD, and quinones (1, 5–8). Altogether, identification and characterization of FDHs with variations in the amino acids surrounding the catalytic site or new subunit composition could improve our understanding of catalysis and expand the metabolic pathway repertory in which FDHs are participating.

In the archetypal gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*, an FDH activity has been detected in cells grown aerobically in the rich medium (24). This is intriguing as FDHs are usually part of anaerobic metabolic pathways, and *B. subtilis* is not able to produce formate (25). These observations prompted us to search for the enzyme(s) involved in this activity. Combining bioinformatics with biochemistry, enzymology, and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, we have identified and characterized two atypical FDH enzymes in *B. subtilis* and members of a new subfamily of FDHs. Notably, formate oxidation activity is measured, whereas the conserved His residue in the active site is naturally substituted by a Gln. Moreover, both FDHs display a new architecture in which their catalytic subunit is associated with an unprecedented partner subunit that allows reactivity with menaquinone.

Results

The YjgC and YrhE sequences from B. subtilis *encode putative metal-dependent FDHs*

Scrutiny of the *B. subtilis* 168 genome indicates that it encodes for *yjgC* and *yrhE* genes, whose ~110-kDa predicted

proteins are paralogous with 61% of identity. Both putative oxidoreductases contain a C-terminal domain typical for Mo/W-*bis*-PGD enzymes and characterized by motifs allowing the coordination of one Mo/W-*bis*-PGD cofactor and one [4Fe-4S] cluster (Fig. S1*A* and Table S1). Furthermore, both sequences contain an N-terminal extension with binding motifs for three [4Fe-4S] clusters and one [2Fe-2S] cluster as determined by similarities (Fig. S1*A*). In particular, this region shares homologies with the N-terminal domain of the NuoG subunit of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (*i.e.*, complex I) and the catalytic subunit of NAD-dependent [NiFe]-hydrogenases (19, 26, 27). Such domain organization is also shared with other FDHs, notably FdsA from *C. necator* and *R. capsulatus* (Figs. S1*B* and S2*A*). A close-up alignment of the active site residues with previously characterized FDH sequences and YjgC and YrhE sequences is shown in Figure 1*A*. Whereas the typical metal Cys ligand and the strictly conserved Arg residue are present, the highly conserved His residue is substituted by a Gln in YjgC and YrhE. Phylogenetic analysis identified a large group of YjgC/YrhE-related sequences with the similar substitution in several bacterial and archaeal phyla, which are distinct from FdsA-related sequences (Fig. S2*A*). The presence of the Gln next to this Cys essential residue in the primary sequence questions the activity of these enzymes as FDHs. However, for the evidence that *B. subtilis* possesses at least one FDH is the existence of a putative *fdhD* gene encoding a sulfurtransferase crucial for FDH activity (12). In the *B. subtilis* genome, the *fdhD* gene is distant from the *yjgC* and *yrhE* loci (53′ *versus* 18′ and 39′, respectively). Interestingly, the *yjgC* gene is predicted to be organized in operon with *yjgD* as *yjgC* and *yjgD* are coexpressed with a positive correlation of 0.98 (28, 29). The same holds true for the gene *yrhE* predicted to be in operon with *yhrD* as both are adjacent and coexpressed with a positive correlation of 0.99 (Fig. 1*B*). The *yjgD* and *yrhD* genes encode 21-kDa and 17-kDa polypeptides, with weak sequence overall identity (20%), and contain a DUF1641 domain of 38 amino acids of unknown function (PFAM PF07849). While YjgC/YrhE are related to FdsA, as illustrated by the YjgC structural model based on the 3D structure of *R. capsulatus* FdsA (Fig. 1*C*) and the phylogenic analysis (Figs. 1*A* and S1), YjgD and YrhD are distinct from FdsD or any of the other partner subunits previously characterized for an FDH, the complex I and [Ni-Fe] hydrogenases (6). In addition, YjgD and YrhD are predicted to be cofactor-less and have a distinct sequence from the FdsC/FdhD sulfurtransferase or any specific chaperone involved in Mo-*bis*-PGD maturation (30, 31). Altogether, these *in silico* analyses suggest that YjgC and YrhE are the enzymes involved in the FDH activity previously detected in *B. subtilis* (24) and question the role of YjgD and YrhD.

The YjgCD and YrhED are protein complexes with formate-oxidizing activity

To test the activity of YjgC and YrhE as FDHs and the importance of YjgD and YrhD, the corresponding proteins were purified. First, the *yjgCD* and *yrhED* operons were expressed in *B. subtilis* under the control of an inducible promoter and a 6-histidine tag was added at the N terminus of the YjgC and YrhE proteins. Affinity purification of these proteins showed that YjgC and YrhE copurified with YjgD and YrhD, respectively, as identified by SDS-PAGE and MS analysis (Fig. 2*A*, Tables S2 and S3). MS data are available via ProteomeXchange with identifier PXD028742. These results suggest that proteins YjgD and YrhD interact physically with YjgC and YrhE, respectively. A full steady-state enzyme kinetic analysis of formate oxidation by YjgCD and YrhED using benzyl viologen (BV) as an artificial electron acceptor is shown in Figure 2*B*. Using the Michaelis–Menten plot, a k_{cat} of 96 s^{-1} was measured for the YjgCD heterodimer (MW = 132 kDa) and a k_{cat} of 56 s^{-1} for the YhrED heterodimer (MW = 125 kDa) (Table 1). Both values are in the same range as the ones determined for FDH of *R. capsulatus* (36 s^{-1}) and *C. necator* (201 s^{-1}) (22, 26). Apparent $K_M^{formate}$ of 5 mM for YjgCD and 1 mM for YrhED are larger than the values of 0.281 mM and 0.31 mM determined for FDH of *R. capsulatus* and *C. necator*, respectively. As observed for other FDHs (22, 32, 33), both enzyme preparations exhibit a basic pH optimum, pH 10 for the YjgCD complex and pH 8.5 for YrhED (Fig. 2*C*). In conclusion, the YjgCD and YrhED are protein complexes with formate-oxidizing activity with kinetic parameters comparable with other FDHs despite the fact that the amino acid sequence within the active site deviates from the consensus residues typically associated with FDH activity. Henceforth, the YjgC subunit was renamed ForC for formate oxidoreductase catalytic subunit and the YjgD subunit ForE for formate oxidoreductase essential subunit for reasons that will be presented at the end of the Results section. As *B. subtilis* encodes two FDHs, YjgCD was renamed ForCE1 and YrhED was renamed ForCE2.

EPR analysis of ForCE1 and ForCE2

To characterize the cofactor content of the two enzymes, we next examined the EPR properties of purified ForCE1 and ForCE2 enzymes, either in their air-oxidized state or after incubation with a large excess of sodium formate or sodium dithionite. When measured in the 50- to 70-K temperature range, the air-oxidized enzymes mainly display two essentially isotropic and partially overlapping EPR signals originating from two slow-relaxing S = ½ species with g-values centered at 2.004 and 1.993. Their relative intensities are different in the two enzymes (Fig. 3*A*, traces 1 and 2). In a first step, the g = 1.993 signal that exhibits a partially resolved structure in both enzymes was investigated in detail. Optimally detected in the air-oxidized ForCE2 sample, this signal was further characterized by performing echo-detected field-swept experiments at W-band (∼94 GHz) or continuous wave EPR measurements at Q-band (∼34 GHz) (Fig. 3*B*, inset and trace 2). At both frequencies, the g = 1.993 signal is well isolated and displays a rhombic shape well reproduced by considering a single species with g-values $g_{1,2,3}$ = 1.9971, 1.9933, and 1.9890. Whereas this model is unable to account for the resolved structure on the X-band EPR spectrum, the addition of a strongly coupled

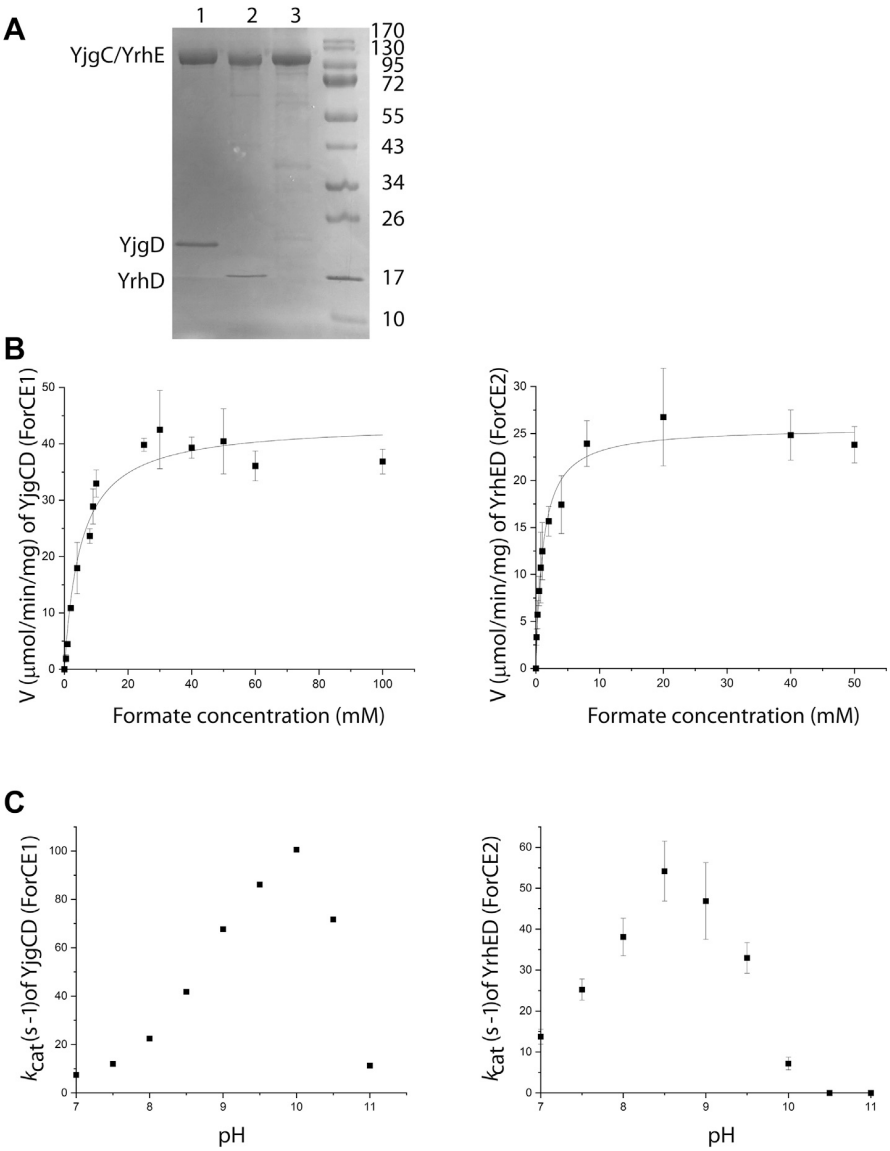


Figure 2. YjgCD (ForCE1) and YrhED (ForCE2) are formate-oxidizing enzymes. *A*, purified proteins are analyzed on Coomassie Brilliant Blue–stained 15% SDS-polyacrylamide gel. Molecular standards are indicated in kilodalton. *Lane 1*: YjgC N-terminus 6his-tagged copurifies with YjgD; *lane 2*: YrhE N-terminus 6his-tagged copurifies with YrhD; *lane 3*: YjgC C-terminus 8his-tagged was purified without YjgD. *B*, Michaelis–Menten plot for the formate:benzyl viologen oxidoreductase reaction of YjgCD (ForCE1) at pH 10 and YrhED (ForCE2) at pH 8.6. *C*, pH dependence of k_{cat} (s^{-1}) for YjgCD (ForCE1) and YrhED (ForCE2).

proton with nearly isotropic ^1H hyperfine coupling tensor having principal values $A_{1,2,3}$ = 13, 13, and 11 MHz allows reproducing the observed splittings (Fig. 3*B*, trace 1). Eventually, the multifrequency EPR spectra are well simulated using the same set of g- and A-tensors as given above (Fig. 3*B*). The signal-giving species displays g-values fully consistent with those of a 4 d^1 Mo(V) ion with *bis*-pterin coordination (34). Notably, the corresponding g-tensor anisotropy ($g_1 - g_3 \sim$

Table 1
Enzymatic catalytic constants for formate oxidation by YjgCD, YjgC, and YrhED using either benzyl viologen (top) or menadione (bottom) as electron acceptors

FDH	$K_M^{formate}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} (U)	pH
YjgCD/ForCE1	5.1 ± 0.9	96.1 ± 4	43.7 ± 1.9	10
YrhED/ForCE2	1.1 ± 0.1	55.8 ± 1.6	26.6 ± 0.8	8.6
YjgC/ForC1	ND	2.13 ± 0.05	1.16 ± 0.03	10
	$K_M^{menadione}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} (U)	pH
YjgCD/ForCE1	0.025 ± 0.003	16.5 ± 0.6	7.5 ± 0.3	9
YrhED/ForCE2	0.023 ± 0.005	26.4 ± 1.8	12.6 ± 0.9	9
YjgC/ForC1	ND	0	0	9

Abbreviation: ND, not determined.

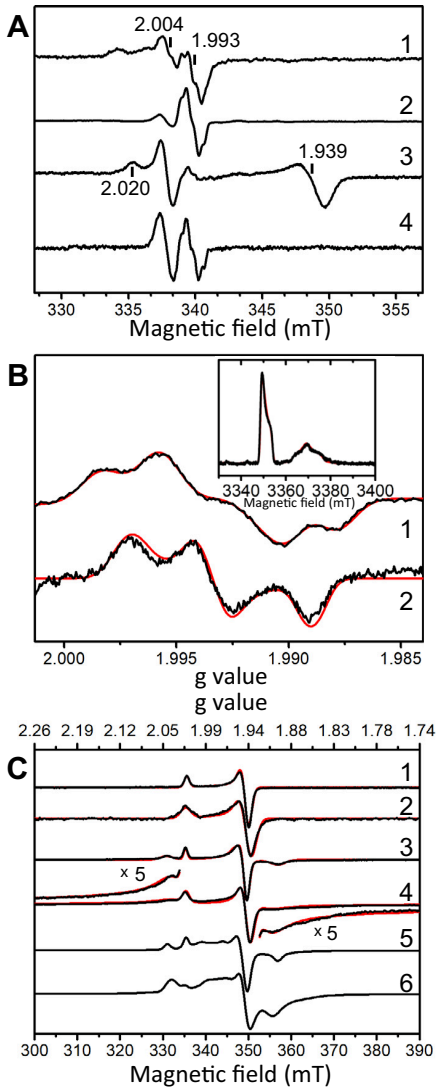


Figure 3. EPR characterization of the cofactors in ForCE1 and ForCE2. *A*, air-oxidized (1 and 2) and formate-reduced (3 and 4) ForCE1 (1 and 3) and ForCE2 (2 and 4) collected at 50 K (1) or 70 K (2–4). Other experimental conditions were as follows: microwave power, 4 mW, field modulation amplitude, 0.4 mT (1 and 2) or 0.2 mT (3 and 4) at 100 kHz, and microwave frequency, ~9.48 GHz. *Vertical lines* indicate remarkable g values given in the figure and discussed in the main text. *B*, continuous wave Mo(V) EPR spectra in air-oxidized ForCE2 samples measured at X band (9.47864 GHz) (1) and Q band (34.1187 GHz) (2) frequencies. Other experimental conditions were as follows: temperature, 70 K (1) and 50 K (2), microwave power, 1 mW (1) and 0.1 mW (2), and field modulation amplitude, 0.1 mT (1) and 0.5 mT (2) at 100 kHz. The inset shows the echo-detected field-swept EPR spectrum measured at 50 K at W-band (94.0014 GHz) frequency. Other experimental conditions are as follows: microwave pulse lengths, 20 ns and 40 ns for π/2 and π pulses, respectively. *C*, EPR spectra of dithionite-reduced ForCE1 (1, 3, and 5) and ForCE2 (2, 4, and 6) measured at 100 K (1 and 2), 50 K (3 and 4), or 15 K (5 and 6). Other experimental conditions were as follows: microwave power, 1 mW (1) or 10 mW (2–6), modulation amplitude 1 mT (1, 2, 4–6) or 0.4 mT (3) at 100 kHz, microwave frequency, ~ 9.48 GHz. Spectral simulations are displayed as *red traces* superimposed to the experimental spectra and have been performed using the parameters given in the main text and supporting information (Table S8).

0.008) is unusually low and most closely resembles that of the slow-type Mo(V) signal *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 FDH ($g_1 - g_3 \sim 0.012$) (35). Moreover, the Mo(V) g-values in ForCE2 belong clearly to the correlation found for the variations of the g-tensor of Mo(V) species with a six-sulfur coordination (9, 34, 36) (Fig. S3). Finally, the magnitude of the proton hyperfine coupling tensor is comparable with that resolved on the Mo(V) EPR signal detected in *C. necator* FDH and assigned to a molybdenum-SH group (26). Therefore, the g = 1.993 signal similarly detected in ForCE1 and ForCE2 is unambiguously assigned to a Mo(V) species generated at their active site.

Interestingly, incubation of the enzymes with a large excess of sodium formate leads to an increase of the g = 2.004 signal relative to that of the Mo(V) species (Fig. 3*A*, traces 3 and 4). In addition, an axial signal with g-values 2.020 and 1.939 is detected in the ForCE1 spectrum measured at 50 K (Fig. 3*A*, trace 3). These observations are explained by partial reduction of the enzymes by sodium formate and are consistent with the fact that the latter is the physiological substrate. The same axial signal is observed on the EPR spectrum of the dithionite-reduced samples of ForCE1 and ForCE2 measured at 100 K, whereas the Mo(V) signal and the g = 2.004 species are no longer detected, consistent with further reduction of the latter and of the Mo(V) into the EPR-silent Mo(IV) state in these samples (Fig. 3*C*, traces 1 and 2). The slow relaxation properties of this axial signal and its g-values are typical for S = ½ $[2Fe\text{-}2S]^{1+}$ clusters (37) and very similar to those detected in related FDHs from *Clostridium thermoaceticum*, *Methylosinus trichosporium*, or *C. necator* (26, 38–40). Upon lowering the temperature to 50 K, new signals are detected peaking at g = 2.047 and 1.897 in ForCE1 (Fig. 3*C*, trace 3), and g = 2.030 and 1.912 in ForCE2 (Fig. 3*C*, trace 4). These are tentatively assigned to the g_1 and g_3 values of an additional slow relaxing S = ½ $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ cluster. The corresponding intermediate g_2 value is estimated by numerical simulations (shown as red solid lines in Fig. 3*C*, traces 3 and 4), yielding to $g_{1,2,3}$ = 2.047, 1.948, 1.897 and 2.030, 1.940, 1.912 for this cluster in ForCE1 and ForCE2, respectively. Further lowering the temperature to 15 K leads to the appearance of additional overlapping signals peaking at 1.99 and 1.96, which most likely arise from an additional fast-relaxing $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ center (Fig. 3*C*, traces 5 and 6). Being the sole EPR active center detected at 100 K, the [2Fe-2S] cluster was used as an internal reference for spin quantitation measurements. Double integration of the EPR spectrum of a dithionite-reduced ForCE1 sample buffered at pH 7.5 and measured at 15 K in nonsaturating conditions (*i.e.*, 0.1 mW) indicated that the detected signals contribute to about 4.7 ±0.4 spins/ForCE1, assuming one [2Fe-2S] center per enzyme.

Overall, the present EPR analysis allows identifying the signature of several metal centers in ForCE1 and ForCE2, including that of their Mo-*bis*-PGD cofactor, a [2Fe-2S] cluster and at least two other [4Fe-4S] centers with distinct relaxation properties. Importantly, the detected species have quite similar EPR signatures in both enzymes in agreement with the high identity percentage between ForC1 and ForC2 subunits.

A menasemiquinone radical stabilized within ForCE1 and ForCE2

An unexpected outcome of the EPR analysis presented above is the detection of an intense isotropic radical signal at

g = 2.004 in ForCE1 and ForCE2 after incubation with sodium formate (Fig. 3*A*, traces 3 and 4). The radical peak-to-peak linewidth (∼0.88 mT) is similar to that typically observed for protein-bound isoprenoid quinones (41, 42). To further identify its origin, its redox properties were investigated using EPR-monitored redox titration experiments performed on purified ForCE1 buffered at pH 6.0 and 7.5. The EPR amplitude of the radical measured against ambient redox potential changes according to a bell-shaped curve as expected for quinone species undergoing two successive one-electron reduction steps between the fully oxidized quinone and the fully reduced quinol state with an EPR-active semiquinone intermediate (Fig. 4*A*) (42–46). When the data were fitted using theoretical curves based on Equation 1, midpoint potential values (E_1, E_2) = (−42 mV, −90 mV) and (−136, −175 mV) were obtained at pH 6 and 7.5, yielding two-electron midpoint potential values E_m of −66 mV and −156 mV, respectively. Such values are consistent with those of low-potential menaquinones ($E_{m,\ pH\ 7.5}$ MK/MKH_2 = −100 ± 10 mV) (47) such as MK-7, the major quinone present in *B. subtilis* membranes (48). The −60 mV/pH unit dependence of E_m in the investigated pH range indicates a $2H^+/2e^-$ reaction as measured for semiquinone radicals stabilized in exchangeable Q sites (43–45). In addition, the similar −60 mV/pH unit dependence of both E_1 and E_2 indicates that the neutral menasemiquinone (MSK) form (*i.e.*, $MSKH^{\bullet}$) is stabilized in this pH range. The maximum concentration of the radical was estimated to be 0.5 MSK/ForCE1 from double integration of its EPR spectrum measured under nonsaturating conditions and using the [2Fe-2S] cluster as internal standard, assuming one [2Fe-2S]/enzyme.

The chemical nature of the radical was further confirmed by performing EPR experiments at higher microwave frequencies, as large unresolved hyperfine couplings typically obscure the g anisotropy of radicals measured at standard X-band frequencies (9–10 GHz) (49). Whereas the g tensor anisotropy of the radical in ForCE1 is only partially resolved at the Q band (∼34 GHz), its g_3 component is clearly resolved at the W band (∼94 GHz), the overall line shape remaining predominantly axial (Fig. 4*B*). Such features are again expected for protein-bound isoprenoid semiquinones (42, 50). In addition, EPR spectra recorded at X, Q, and W bands are well simulated using the same rhombic g-tensor with principal values $g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, 2.0023. These are very close to those measured for other protein-bound MSK such as in the Q_D site of *E. coli* nitrate reductase (42, 46) (Fig. S4) or in the Q_A site of Zn-substituted reaction center from *Blastochloris viridis* (41). Therefore, the EPR signal of the radical detected in ForCE1 can be assigned to a neutral MSK radical bound to the enzyme based on its EPR properties evaluated at several microwave frequencies as well as on its redox characteristics. This assignment also holds for the radical species detected in ForCE2, which exhibits similar g-values, as concluded from the comparative analysis of the W band EPR spectra of the radical measured in ForCE1 and in ForCE2 (Fig. S4).

In addition, our data reveal that the detected MSK is highly stabilized in ForCE1 in the pH range from 6.0 to 7.5. The magnitude of the MSK stability constant is virtually independent of pH ($K_{S,\ pH\ =\ 6.0} \sim 7$, $K_{S,\ pH\ =\ 7.5} \sim 5$) and much larger than that expected for the unbound species, that is, $K_{S,\ free} \sim 10^{-15}$. Hence, the calculated occupancy level R_{occ} of the ForCE1 Q-site that corresponds to the fraction of the site occupied by MK, MSK, or MKH_2 (irrespective of their protonation state) is close to unity at both pH values ($R_{occ} \sim 0.8$ at pH = 6.0 and ∼ 0.9 at pH 7.5).

We confirmed the nature of the MK bound in purified ForCE1 and ForCE2 by analyzing lipid extracts with HPLC coupled to electrochemical detection and MS (HPLC-ECD-MS) (Fig. 4*C*). Lipid extracts from ForCE1 and ForCE2 show a predominant peak at 9.8 min, which coincides with the MK-7 standard. MS confirmed the identity of MK-7 (Fig. S6*A*). A minor peak of MK-8 was also detected (Fig. 4*C*), as supported by MS analysis (Fig. S6*B*). While the ForCE1-MK-7 ratio inferred by HPLC-ECD analysis shows a stoichiometric value of 1:0.87, the ForCE2-MK-7 ratio is above 1:1 stoichiometry (1:1.63) (Table S5). Nevertheless, the ForCE1-MK-7 ratio is in agreement with the amount of one MK-7 per complex quantified by EPR analysis.

ForCE1 and ForCE2 reduce MK-7 analogs

Having demonstrated that ForCE1 and ForCE2 enzymes are able to stabilize an MSK radical, we hypothesized that MK-7 is the electron acceptor during formate oxidation in *B. subtilis*. The enzymatic activity of purified ForCE1 and ForCE2 was analyzed in the presence of formate and menadione, a structural analog of MK-7. Full steady-state enzyme kinetic analyses are shown in Figure 4, *D* and *E*. To model experimental data, we used a Michaelis–Menten plot and found similar apparent low $K_M^{menadione}$ values for both enzymes (25 μM for ForCE1 and 23 μM for ForCE2) and a k_{cat} of 16.5 and 26.4 s^{-1} for ForCE1 and ForCE2, respectively (Table 1). The pH dependence of the formate:menadione oxidoreductase activity was determined and showed a pH optimum at ≈ 9 for both enzymes (Figs. 4*F* and S5). Altogether, our *in vitro* kinetic analyses show that ForCE1 and ForCE2 are able to couple formate oxidation to menadione reduction, and we propose that MK-7 is the physiological electron acceptor during formate oxidation.

ForE1 is an essential subunit for formate oxidoreductase activity of ForC1

To assess the importance of ForE1 or ForE2 in FDH activity, the *yjgC* (*forC1*) and *yrhE* (*forC2*) genes were expressed under the control of an inducible promoter in absence of *yjgD* (*forE1*) and *yrhD* (*forE2*), respectively. Despite many attempts, we were unable to purify the ForC2 subunit His-tagged in C-terminal when produced without ForE2. On the contrary, we were able to purify ForC1 His-tagged in C-terminal (Fig. 2*A*, Table S4). This protein was able to oxidize formate with BV as an artificial electron acceptor but at a residual k_{cat} = 2 s^{-1} compared with 96 s^{-1} for the ForCE1 complex (Table 1). HPLC-ECD analysis of ForC1 showed that very low quantities of MK-7 are associated with ForC1, as compared with ForCE1

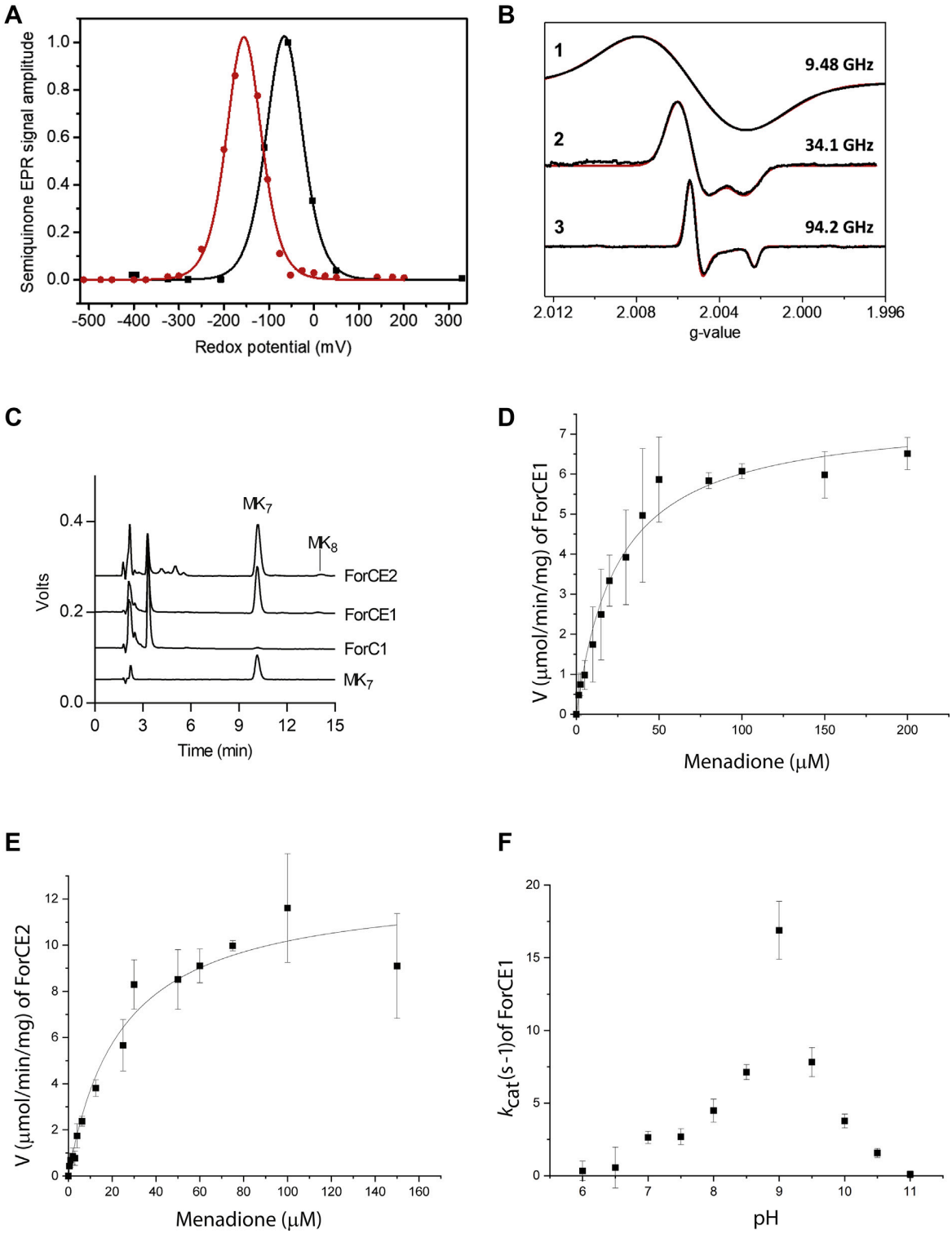


Figure 4. ForCE1 and ForCE2 bind MK-7 as an electron sink. *A*, normalized redox titration curves of the MSK radical in ForCE1 buffered at pH = 6 (*black*) or 7.5 (*red*). Experimental points (*filled squares* or *filled circles*) have been fitted to the theoretical curve as described in the Experimental procedures section. Experimental conditions were as follows: temperature, 50 K, microwave power, 10 mW, and modulation amplitude, 0.5 mT (pH 7.5) or 1 mT (pH 6) at 100 kHz. *B*, g-scale representation of the cw EPR spectra (*black traces*) and their simulation (*red traces*) of the MSK· radical in ForCE1 buffered at pH = 6 and measured at X band (9.4812 GHz) (1), Q band (34.094 GHz) (2), and W band (94.244 GHz) (3). Spectra were simulated using the same rhombic g-tensor with principal values $g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, and 2.0023 and the linewidths given in supporting information (Table S8). Experimental conditions were as follows: temperature, 50 K, microwave power, 4 mW (1), 0.1 mW (2), or 0.05 mW (3), and field modulation amplitude at 100 kHz, 0.4 mT (1 and 3) or 0.5 mT (2). *C*, ForCE1 and ForCE2, but not ForC1, bind large quantities of MK-7. HPLC-ECD analysis of the MK-7 standard (15 pmol) and of lipid extracts corresponding to ∼40 pmol of purified proteins. *D*, Michaelis–Menten plot for the formate:menadione oxidoreduction reaction of ForCE1 at pH 9. *E*, Michaelis–Menten plot for the formate:menadione oxidoreduction reaction of ForCE2 at pH 9. *F*, pH dependence of k_{cat} (s^{-1}) for ForCE1.

(Fig. 4*C*, Table S5), and ForC1 is devoid of formate:menadione oxidoreductase activity (Table 1). Thus, the ForE1 subunit is required for formate:menadione oxidoreductase activity of ForC1 and most likely for MK-7 binding. Altogether, these results demonstrate the essential role of ForE1 in ForCE1 activity.

Discussion

FDHs have been widely studied as they reversibly catalyze formate oxidation into CO_2, CO_2 reduction being of high biotechnological interest. In contrast to other members of the Mo/W-*bis*-PGD enzyme superfamily, FDHs exhibit a plethora of quaternary structure, subunit, and redox center composition and cellular localization allowing their integration in several anaerobic metabolic pathways as reviewed (5, 7, 9, 51). Here, we report on the identification, isolation, and characterization of two atypical FDHs, ForCE1 and ForCE2, in the aerobic soil bacterium, *B. subtilis*. In contrast with other characterized FDHs, ForCEs (i) have a unique subunit composition, (ii) display modification of the hitherto conserved amino acid residues surrounding the metal active site, and (iii) bind MK-7 while being cytosolic enzymes as shown by the homologous expression system reported here. Notably, ForCE1 and ForCE2 have each a Mo-*bis*-PGD cofactor and bear up to 5 [Fe-S] clusters as determined by EPR spectroscopy. In addition, both enzymes are able to perform formate:menadione oxidoreduction and have the ability to strongly bind MK-7 as indicated by HPLC-ECD-MS analysis, which leads to the detection of an isotropic radical signal by EPR spectroscopy, assigned to an MSK signal.

Multimeric FDHs work in concert with other subunits to oxidize formate or receive electrons from a donor to reduce CO_2. In other terms, partner subunits allow FDH integration into a specific metabolic pathway. Gene(s) encoding partner subunit(s) are organized into operons with the gene encoding the catalytic subunit. In FDHs from *B. subtilis*, genes encoding catalytic and partner subunits are organized into *forCE1* and *forCE2* operons. Our results have shown that purified ForC1 produced in absence of ForE1 binds weakly to MK-7 and that it has lost formate:menadione oxidoreductase activity. Accordingly, we suggest that ForE is the partner subunit that allows coupling formate oxidation to quinone reduction. Such reaction has been demonstrated for the respiratory FDH complex exemplified in *E. coli* (21). However, the partner subunits FdnHI are very distinct from ForE at the sequence level. The Mo-*bis*-PGD containing the FdnG subunit is the formate oxidation site connected through a 5 [Fe-S] cluster electron wire (in FdnGH) to the quinone reduction site in the transmembrane cytochrome FdnI. In contrast, the ForC subunit harbors the Mo-*bis*-PGD cofactor formate oxidation site as well as 5 [Fe-S] clusters in the same polypeptide and the menaquinone reduction site hypothetically located at the ForCE interface. It must be noted that ForCE sequences are not predicted to contain any transmembrane segment, neither hemes, as confirmed by EPR analysis of ForCE1 and ForCE2. Therefore, we conclude that the way the formate:menaquinone oxidoreduction occurs into ForCEs is unprecedented.

The ForC catalytic subunit presents high sequence similarity with FdsA from *R. capsulatus* and *C. necator* (Fig. S1) and a ForC1 structural model using the former has been built (Fig. 1*C*). In this model, electrons are logically shuttled from the Mo-*bis*-PGD catalytic site along the [Fe-S] clusters (C1 to C4/C5) to the physiological electron acceptor. We hypothesize that MK-7 binds to the N-terminal region of ForC1 in such a way that the distance between the MK-7 and one of the two most N-terminus [Fe-S] clusters, namely the [4Fe-4S] (C4) or the [2Fe-2S] (C5) cluster (Fig. 1*C*), is compatible with physiological electron transfer (52). It is interesting to note that EPR-monitored redox titration experiments performed on purified ForCE1 buffered at pH 6.0 and 7.5 have provided values of E_m (MK/MKH_2) about 55 mV lower than that of the menaquinone pool. Such a shift can be explained by an ~ 80-fold tighter binding of oxidized MK than MKH_2 to the ForCE1 Q-site, which would be expected for a quinone reduction site in which binding of the substrate (menaquinone) is favored over that of the product (menaquinol). This situation is very similar to that described for the plastosemiquinone bound to the quinone reduction site QB in photosystem II (Δ = −50 mV) (53). In addition, similar values have been measured for the demethylmenasemiquinone stabilized at the quinol oxidation site of the membrane-bound nitrate reductase from *E. coli* (Δ = −30 or −80 mV) (54), and tighter binding of ubiquinol than ubiquinone has been discussed in the quinone reduction site of the bc_1 complex from yeast (Δ ~ +24 to +54 mV) (55) or from *Rhodobacter sphaeroides* (Δ ~ +60 mV) (56).

Within the enzymatic complex, the ForE1 subunit could help stabilize menaquinone binding by providing a structural interface with ForC1 as in its absence, the amount of copurified MK-7 drops dramatically to 1.6%. Moreover, ForE1 may participate to the structural integrity of ForC1 as its formate:BV oxidoreductase activity dropped by 50-fold when produced and purified in the absence of ForE1. Using several techniques, we have shown that MK-7 copurified with ForCE1 in a molar ratio (1:0.87). As discussed above, ForCE enzymes are not predicted to contain any transmembrane helices and are purified without detergents. Nevertheless, they bind menadione with an apparent affinity ($K_M^{menadione}$ = 20 μM) in the same range as the membrane integral nitrate reductase A from *E. coli* and the peripheral type-II NADH:quinone oxidoreductase from *Caldalkalibacillus thermarum* (57, 58). Finally, ForCE1 is also able to bind MK-8 at a low but significant ratio, consistent with low MK-8 abundance in *B. subtilis* membrane (48). To recruit menaquinone, it is reasonable to assume that ForCE contacts the membrane. Even if ForCE1 and ForCE2 have been purified without detergents, they could loosely bind the cytoplasmic side of the membrane through amphipathic helices similarly to the peripheral NdhII from *C. thermarum* that couples NADH oxidation to menaquinone reduction (59). Evaluation of this hypothesis is the object of undergoing studies in our laboratory.

ForC1 and ForC2 from *B. subtilis* are distinct from other members of the FDH family notably because of the residues at vicinity of the Mo atom such as the natural substitution of the strictly conserved His residue adjacent to Cys or Secys (C/UH) by a Gln (C/UQ) (Figs. 1*A* and S2*A*). This change from a positively charged and polar amino acid (His) by a polar one (Gln) is intriguing and prompted us to examine the active site region by sequence alignment and examination of the 3D structures of FDHs (Fig. S7). This scrutinous analysis allowed us to pinpoint an His residue located beside the strictly conserved Arg active residue and whose function may be to preserve at least one positive charge in close proximity to the active site (Fig. S7*A*). Furthermore, this analysis sheds light into the systematic occurrence of at least one His residue close to the active site with the occurrence of a Gln residue (Class I: C/UH RGQ or C/UQ RGH as in ForC, Fig. S7, *A*–*C*), a Glu residue (Class II: C/UH RGE, Fig. S7, *D* and *E*), or an His residue (class III: C/UH RGH, Fig. S7, *F* and *G*). As mentioned before, the importance of these residues and their mechanistic role at the active site are still unknown, and this will be investigated in detail in forthcoming studies.

Phylogenetic analysis indicates that the ForC proteins of *B. subtilis* are the first characterized representatives of a new subfamily of FDHs with a CQ RGH motif. Indeed, using the ForC1 sequence as bait, 377 sequences with an N-terminal extension allowing the coordination of 4 [Fe-S] clusters were identified. These sequences belong to the previously mentioned classes I and III. Strikingly, the 176 sequences with the CQ RGH catalytic motif (Fig. S2*A* sequences shown in blue) cluster distinctly from the 201 sequences with the CH RGQ/H catalytic motif (Fig. S2*A* sequences shown in gray). The 176 sequences are mainly found in Firmicutes, but some representatives are found in other bacterial phyla (Proteobacteria, Actinobacteria, Deinococcus, Acidobacteria, and Planctomycetes) or in Archaea (Fig. S2*B*). Furthermore, the vast majority of sequences with the CQ RGH motif are synteny encoded with a gene encoding a protein with a DUF1641 domain, presumably a homolog of ForE.

While the *forC1* and *forC2* genes are paralogous and proteins have 61 % of identity, ForE1 and ForE2 share weak sequence identity (20%). However, both enzymatic complexes achieve the same reaction with comparable kinetic behavior and most likely interact loosely with the membrane to recruit menaquinone. A notable difference between both complexes resides in the way the corresponding operons are regulated. While genes encoding FDHs are typically regulated by anaerobiosis, fermentation, and formate induction (60, 61), *forCE1* and *forCE2* do not seem expressed under these metabolic conditions (24, 28) and are upregulated by different environmental and cellular cues. Notably, the *forCE1* operon is part of the SigB-dependent general stress regulon and is upregulated in swarming conditions, in the presence of high salt or ethanol concentrations (28, 62, 63). On the other hand, the *forCE2* transcription is upregulated after germination and in exponential growth and downregulated by the ResED two-component system that activates genes in oxygen-limited conditions (28, 64).

Altogether, our results highlight the originality of these noncanonical FDHs, expand our knowledge on the FDHs' building blocks, and pave the way for developing new biocatalysts for CO_2 reduction.

Experimental procedures

Bacterial strains, media, and culture conditions

B. subtilis 168 (*trpC2*) strain and derivatives are described in Table S6. Genomic integration of reporter sequences was achieved using the pSPH1/pSPH2 plasmids (obtained by Dr Henrik Strahl von Schulten) by transformation at the *amyE* locus (65). Target integration was confirmed by amylase sensitivity. Chromosomic inactivation of target genes was obtained by transformation of gDNA from KO strains (source BGSC). Clones were verified by PCR. For routine growth, cells were propagated in LB medium (tryptone, 10 g/l, yeast extract, 5 g/l, NaCl, 5 g/l). When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: spectinomycin (100 μg ml^{-1}), kanamycin (10 μg ml^{-1}), and erythromycin (1.25 μg ml^{-1}).

For overproduction of recombinant proteins, *B. subtilis* 168 derivatives (4088 *amyE*::pSHP1-6his*yjg*CD, 4233 *amyE*::pSHP2-*yjgC*8his, 4230 *amyE*::pSHP-6his*yrhED*, 4192 *amyE*::pSHP-*yrhE*8his) were grown in 4.8 L of the LB medium with 2 μM sodium molybdate at 37 °C until A_{600} = 0.3; cells were then submitted to a salt shock (0.4 M NaCl) for 30 min, followed by induction with 0.8% xylose for 3 h (4088 and 4233 strains) and expression overnight (4230 and 4192 strains) at 37 °C. Harvested cells were washed once in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 50 mM Na_2SO_4, and cells were kept at −80 °C until use.

Plasmid construction

Genes were cloned into pSPH1 and pSPH2 to allow induction with the xylose promoter at the *amyE* locus. Plasmids were constructed as follows: the pET28HT-YjgCD: *yjgCD* fragment was amplified with primers 898-899 using *B. subtilis* gDNA as the template and inserted by ligation into a previously excised pET28dHT-*gapR* at *Nde*I-*Kpn*I sites to add a 6-his tag sequence followed by a TEV cleavage site at the 5′ end of *yjgC*.; pSPH1-6his*yjg*CD: 6his-*yjgCD* was amplified with primers 941 to 952 using pET28HT-YjgCD as the template and introduced by ligation into pSHP1 at *Avr*II-*Xho*I sites; pSPH1-6his*yrhED*: *yrhED* was amplified with primers 967 to 968 using *B. subtilis* 168 gDNA as the template and introduced into pSPH1 at *Avr*II-*Eco*RI sites using Gibson Assembly Cloning kit NEB with the linker primer 966. Cloning of *yrhE* at this site adds a sequence encoding a 6-his tag followed by a TEV cleavage site at the 5′ end. pSPH2-*yjgC*8his: *yjgC* was amplified with primers 944 to 950 and introduced into pSPH2 at *Xho*I-*Spe*I sites. Cloning of *yjgC* at this site adds a sequence encoding an 8-his tag at the 3′ end; pSPH1-*yrhE*8his: pSPH2-*yjgC*8his was digested at *Xho*I-*Sfi*I sites to release *yjgC* fragment. Then, a *yrhE* fragment was amplified with primers 988 to 1042 using *B. subtilis* gDNA as the template and introduced by ligation.

All plasmids were verified by sequencing, and primers are listed in Table S7.

Protein purification

All steps were performed at 4 °C with an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare). Frozen cells, typically 10 to 15 g of wet weight, were thawed and suspended in 90 ml of 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 50 mM Na_2SO_4 (buffer A). Cell suspension was treated with protease inhibitor cocktail (Roche), lysozyme (1 mg/ml during 30 min at 37 °C), DNase I, and 0.5 mM EDTA and disrupted by 1 to 2 passages through a French pressure cell at 1 bar. Cells debris were removed by centrifugation for 40 min at 100,000*g*. The supernatant was applied onto 15 ml Ni-NTA affinity column (GE Healthcare). The column was washed with buffer A supplemented with 50 mM imidazole, and the enzyme eluted in buffer A supplemented with 500 mM imidazole and 10 mM KNO_3. The enzyme was washed in 50 mM MES, pH 6, 50 mM Na_2SO_4, 5% glycerol, and 10 mM KNO_3 using a PD-10 desalting column (Pharmacia), concentrated with Amicon 100 kDa (Millipore) and frozen in liquid nitrogen.

Activity assays and kinetic analysis

FDH activity was determined using an AvaSpec-2048L spectrophotometer, inside an anaerobic chamber, with an atmosphere of 100% N_2, at room temperature (RT), with stirring. For formate-BV oxidoreduction measurements, the reduction of BV was monitored at 600 nm ($\varepsilon_{600\ nm}$ (BV^+) = 7.0945 $mM^{-1}\ cm^{-1}$) with 1.75 mM BV in 25 mM CHES, pH 8.6 (6his-YrhED), or 17.5 mM BV in 25 mM CHES, pH 10 (YjgC-8his/6his-YjgCD), supplemented with 50 mM sodium formate at RT. One unit of activity is defined as the amount of FDH capable of oxidizing 1 μmol of formate per minute per milligram of the enzyme. Kinetic analysis was measured at substrate concentrations ranging from 0.5 μM to 150 mM sodium formate. For formate:menadione oxidoreduction measurements, the reduction of 60 μM menadione was monitored at 260 nm ($\varepsilon_{260\ nm}$ (menadione) = 17.2 $mM^{-1}\ cm^{-1}$) in 25 mM CHES, pH 9, and 50 mM sodium formate at RT. One unit of activity is defined as the amount of FDH capable of reducing 1 μmol of menadione per minute per milligram of the enzyme. Kinetic analysis was measured at substrate concentrations ranging from 0.5 μM to 200 μM menadione. Kinetic parameters were calculated by direct fitting of the Michaelis–Menten equation: $y = V_{max} \times S/(K_M + S)$ using OriginPro. The influence of pH on FDH activity was assessed using a buffer mix containing 20 mM MES, CHAPS, CHES, and Hepes at RT. The pH was adjusted from 6.5 to 11 with HCl and NaOH.

Quinone extraction and analysis

Quinones were extracted from solutions of purified ForCE1, ForCE2, or ForC1 essentially as described (66). Briefly, 20 to 50 μl of purified proteins (corresponding to 0.1–0.25 mg protein) was transferred into glass tubes and completed up to 200 μl with water. 50 μl KCl 3 M and 3 ml methanol were added, and the tubes were vortexed for 1 min. 2 ml petroleum ether (40–60° boiling range) was added, and vortex was repeated for 1 min. The tubes were centrifuged at 700 rpm for 1 min at RT, the upper phase was collected, and the methanol phase was extracted again with 2 ml petroleum ether. Both petroleum ether phases were combined in 5 ml Eppendorf tubes and dried under a nitrogen flow. Dried lipid extracts were resuspended in 100 μl ethanol, and fractions corresponding to 5 and 20 μg protein were analyzed by HPLC coupled to ECD and MS as previously described (67). The probe temperature was 400 °C, the cone voltage was 80 V, and MS spectra were recorded between *m/z* 500 and 900 with a scan time of 0.5 s.

Commercial MK-7 (Sigma) was used to generate standard curves ranging from 2 to 100 pmoles. The concentration of the MK-7 solution was determined using an extinction coefficient $\varepsilon_{248\ nm}$ = 18,900 $M^{-1}\ cm^{-1}$ (68). The standard curve for the ECD signal was used to quantify the peaks (MK-7 and MK-8) obtained for the protein samples. Technical duplicates (extraction and analysis) were performed for each protein preparation, and the quantifications of MKs represent the average of the four values obtained from two measurements (5 and 20 μg protein) for each duplicate.

Redox titrations

Preparation of EPR samples

Formate-reduced samples of ForCE1 were prepared in 50 mM MES buffer, pH 6.0, with 80 μM of protein as followed. The air-oxidized sample was incubated with 100 mM sodium formate in a glove box and frozen immediately. Subsequently, the sample was thawed in the glove box and further reduced with 13 mM sodium dithionite before freezing. Formate-reduced samples of ForCE2 were prepared in 20 mM Tris/propane, pH 6.5, and 5% glycerol containing 50 μM of protein as followed. The air-oxidized sample was incubated with 30 mM sodium formate in a glove box before freezing or incubated with 5 mM sodium dithionite in a glove box before freezing.

Redox titrations of the MSK radical in ForCE1 were carried out anaerobically at RT (about 25 °C) either in a glove box or in an airtight vessel flushed with oxygen-free argon. Redox potentials were measured with a combined Pt-Ag/AgCl/KCl (3M) microelectrode and are given in the text with respect to the standard hydrogen electrode. The following redox mediators were used at 10 μM final concentrations: phenazine methosulfate, phenazine ethosulfate, methylene blue, resorufin, indigo carmine, anthraquinone 2,6 disulfate, flavin mononucleotide, phenosafranine, neutral red, and methyl viologen. Reductive titrations were carried out by stepwise addition of an anaerobic sodium dithionite solution (100 mM or 1 mM). Samples were anaerobically transferred into calibrated EPR tubes that were rapidly frozen.

The normalized variation of the peak-to-peak amplitude of the MSK EPR signal was fitted to a theoretical curve corresponding to two successive one-electron redox processes:

$$A_{ptp} = \frac{1}{1+e^{\alpha(E-E_1)}+e^{\alpha(E_2-E)}} \quad (1)$$

Where E_1 and E_2 are the midpoint potentials of the MK/MSK and MSK/MKH_2 couples, respectively. α = F/RT where R and

ASBMB

F are the molar gas and Faraday constants, respectively, and T is the absolute temperature. The two-electron midpoint potential of the MK/MKH_2 couple, which corresponds to the redox potential for which the amount of MSK is maximum, is $E_m = (E_1 + E_2)/2$. The stability constant K_S of MSK defined with respect to the comproportionation reaction is as follows:

$$K_S = \frac{[MSK]^2}{[MK][MKH_2]} = e^{\alpha(E_1 - E_2)} \quad (2)$$

The occupancy level R_{occ} was calculated as the ratio between the normalized MSK concentration per enzyme inferred from spin quantitation experiments (assuming one [2Fe-2S] cluster taken as internal reference per enzyme) and the normalized maximal MSK concentration (MSK_{max}) given by the following equation.

$$MSK_{max} = \frac{1}{1+2e^{\alpha/2 \times (E_2 - E_1)}} \quad (3)$$

Differences in the binding constants of MK (K_{MK}) and MKH_2 (K_{MKH2}) manifest as a shift in the E_m from that of free MK/MKH_2 given by the following equation:

$$E_m(\text{bound}) - E_m(\text{free}) = \frac{1}{2}\alpha \times \ln\left(\frac{K_{MKH_2}}{K_{MK}}\right) \quad (4)$$

The affinity of the site for MSK is a determinant of E_1 and E_2 but not of E_m.

Multifrequency EPR spectroscopy

X and Q band EPR spectra were measured on a Bruker Elexsys E500 spectrometer. For X band measurements, the spectrometer was equipped with an ER4012ST rectangular cavity fitted to an ESR900 helium flow cryostat (Oxford Instruments). For Q band measurements, a standard resonator equipped with an CF 935 cryostat (Oxford Instruments) was used. W band experiments were performed on a Bruker Elexsys E680 spectrometer equipped with a 6 T superconducting magnet and a 2-kG high-resolution sweep coil. Spectra were recorded with the standard W-band resonator fitted with a Bruker cryogen-free system (Stinger). For the echo-detected field-swept experiment, the two-pulse echo intensity was measured as a function of magnetic field at fixed time interval τ = 200 ns between the two microwave pulses, using a shot repetition time of 500 µs.

A field correction was applied to the magnetic field by simulating the overlapping spectral contribution of Mn^{2+}, assuming $g(Mn^{2+}) = 2.00101 \pm 0.00005$ and an isotropic hyperfine coupling constant $a(Mn^{2+}) = -(8.710 \pm 0.003)$ mT (69).

Spectral simulations

Numerical simulations of EPR spectra were performed with the EasySpin package (release 5.0.12) using MATLAB (The MathWorks, Inc) (70). A field-independent (unresolved hyperfine couplings, H-strain) linewidth model was used to simulate the EPR signal of the MSK and the Mo(V) species, whereas those of the FeS centers were simulated using a field-dependent (g-strain) linewidth model. For H-strain, the full width at half maximum of Gaussian lines along the g-tensor principal axes was adjusted, whereas the corresponding g-strain distributions were considered uncorrelated. Parameters used for the simulations shown in this work are provided in Table S8.

MS analysis

Purified proteins were subjected to an SDS-PAGE, and the stacking gel band corresponding to total proteins was excised and submitted to in-gel trypsin digestion for proteomic analysis as described previously (71) and with the following adapted modifications. Spectra were processed by Proteome Discoverer software (ThermoFisher, version 2.4.1.15) using the Sequest HT algorithm with the *Bacillus subtilis* database (Taxonomy ID: 224308, version 2016-08-20, downloaded from the NCBI by Protein Center including 5573 entries). In this study, proteins were also filtered by a minimum number of Peptide Spectral Match of 10. The list of identified proteins is available in Tables S2–S4.

Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (http://proteomecentral.proteomexchange.org) via the PRIDE partner repository (72) with the dataset identifier PXD028742 and 10.6019/PXD028742.

Supporting information—This article contains supporting information (73–87).

Acknowledgments—We thank Romain Mercier for providing plasmids pSPH1/pSPH2, originally constructed by H. Strahl von Schulten. We also thank Matt Cabeen, Elodie Foulquier-Khadaroo, and Anne Galinier for providing protocols and advice for *B. subtilis* genetics and culture. We thank Anne Galinier and Frédéric Biaso for scientific discussions. We also thank Genevieve Shirley Dobihal and David Rudner for providing genomic DNA *Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*yjgD*::ery, strain was originally constructed by Koo *et al.* (88). Marseille Protéomique (MaP) has been supported by IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) and Aix Marseille Université. We are grateful to the EPR facilities available at the French EPR network (RENARD, IR CNRS 3443) and the Aix-Marseille EPR center. This work was supported by the French National Research Agency (ANR MOLYERE project, Grant No. 16-CE29-0010-01), the CNRS, and the CNRS Energy unit (Cellule Energie) through the project MICROBIOCO2.

Author contributions—A. W., R. A.-C., and S. G. methodology; A. U., F. P., M. B., F. S., G. G., R. L., A. W., R. A.-C., and S. G. investigation; A. M., B. G., A. W., R. A.-C., and S. G. writing–review and editing; A. M., B. G., and S. G. resources; A. M., B. G., and S. G. funding acquisition.

Funding and additional information—A. U. and M. B. were supported by a French MESR fellowship and R. A.-C. by an ANR MOLYERE project post-doctoral fellowship.

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

Abbreviations—The abbreviations used are: BV, benzyl viologen; ECD, electrochemical detection; EPR, electron paramagnetic resonance; FDHs, formate dehydrogenases; ForC, formate oxidoreductase catalytic; ForE, formate oxidoreductase essential; Mo/W-*bis*-PGD, molybdenum/tungsten–*bis*-pyranopterin guanine dinucleotide; MSK, menasemiquinone.

References

1. Niks, D., and Hille, R. (2019) Molybdenum- and tungsten-containing formate dehydrogenases and formylmethanofuran dehydrogenases: Structure, mechanism, and cofactor insertion. *Protein Sci.* **28**, 111–122
2. Schoepp-Cothenet, B., van Lis, R., Philippot, P., Magalon, A., Russell, M. J., and Nitschke, W. (2012) The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life. *Sci. Rep.* **2**, 263
3. Anbar, A. D. (2008) Elements and evolution. *Science* **322**, 1481–1483
4. Catling, D. C., and Zahnle, K. J. (2020) The Archean atmosphere. *Sci. Adv.* **6**, 9
5. Maia, L. B., Moura, I., and Moura, J. J. G. (2017) Molybdenum and tungsten-containing formate dehydrogenases: Aiming to inspire a catalyst for carbon dioxide utilization. *Inorg. Chim. Acta* **455**, 350–363
6. Nielsen, C. F., Lange, L., and Meyer, A. S. (2019) Classification and enzyme kinetics of formate dehydrogenases for biomanufacturing via CO2 utilization. *Biotechnol. Adv.* **37**, 107408
7. Magalon, A., Ceccaldi, P., and Schoepp-Cothenet, B. (2016) *The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family, Molybdenum and Tungsten Enzymes* (pp. 143–191)
8. Hartmann, T., Schwanhold, N., and Leimkühler, S. (2015) Assembly and catalysis of molybdenum or tungsten-containing formate dehydrogenases from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 1090–1100
9. Grimaldi, S., Schoepp-Cothenet, B., Ceccaldi, P., Guigliarelli, B., and Magalon, A. (2013) The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: A catalytic workhorse in bioenergetic. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1048–1085
10. Arnoux, P., Ruppelt, C., Oudouhou, F., Lavergne, J., Siponen, M. I., Toci, R., Mendel, R. R., Bittner, F., Pignol, D., Magalon, A., and Walburger, A. (2015) Sulphur shuttling across a chaperone during molybdenum cofactor maturation. *Nat. Commun.* **6**, 6148
11. Schrapers, P., Hartmann, T., Kositzki, R., Dau, H., Reschke, S., Schulzke, C., Leimkühler, S., and Haumann, M. (2015) Sulfido and cysteine ligation changes at the molybdenum cofactor during substrate conversion by formate dehydrogenase (FDH) from Rhodobacter capsulatus. *Inorg. Chem.* **54**, 3260–3271
12. Thomé, R., Gust, A., Toci, R., Mendel, R., Bittner, F., Magalon, A., and Walburger, A. (2012) A sulfurtransferase is essential for activity of formate dehydrogenases in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **287**, 4671–4678
13. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe4S4 cluster. *Science* **275**, 1305–1308
14. Maia, L. B., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2015) Molybdenum and tungsten-dependent formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 287–309
15. Hartmann, T., Schrapers, P., Utesch, T., Nimtz, M., Rippers, Y., Dau, H., Mroginski, M. A., Haumann, M., and Leimkühler, S. (2016) The molybdenum active site of formate dehydrogenase is capable of catalyzing C–H bond cleavage and oxygen atom transfer reactions. *Biochemistry* **55**, 2381–2389
16. Popov, V. O., and Lamzin, V. S. (1994) NAD+-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* **301**, 625–643
17. Yilmazer, B., Isupov, M. N., De Rose, S. A., Bulut, H., Benninghoff, J. C., Binay, B., and Littlechild, J. A. (2020) Structural insights into the NAD+-dependent formate dehydrogenase mechanism revealed from the NADH complex and the formate NAD+ ternary complex of the Chaetomium thermophilum enzyme. *J. Struct. Biol.* **212**, 107657
18. Oliveira, A. R., Mota, C., Mourato, C., Domingos, R. M., Santos, M. F. A., Gesto, D., Guigliarelli, B., Santos-Silva, T., Romão, M. J., and Cardoso Pereira, I. A. (2020) Toward the mechanistic understanding of enzymatic CO2 reduction. *ACS Catal.* **10**, 3844–3856
19. Radon, C., Mittelstädt, G., Duffus, B. R., Bürger, J., Hartmann, T., Mielke, T., Teutloff, C., Leimkühler, S., and Wendler, P. (2020) Cryo-EM structures reveal intricate Fe-S cluster arrangement and charging in Rhodobacter capsulatus formate dehydrogenase. *Nat. Commun.* **11**, 1912
20. Wagner, T., Ermler, U., and Shima, S. (2016) The methanogenic CO2 reducing-and-fixing enzyme is bifunctional and contains 46 [4Fe-4S] clusters. *Science* **354**, 114–117
21. Jormakka, M., Törnroth, S., Byrne, B., and Iwata, S. (2002) Molecular basis of proton motive force generation: Structure of formate dehydrogenase-N. *Science* **295**, 1863–1868
22. Hartmann, T., and Leimkühler, S. (2013) The oxygen-tolerant and NAD+-dependent formate dehydrogenase from Rhodobacter capsulatus is able to catalyze the reduction of CO2 to formate. *FEBS J.* **280**, 6083–6096
23. Oh, J. I., and Bowien, B. (1998) Structural analysis of the fds operon encoding the NAD+-linked formate dehydrogenase of Ralstonia eutropha. *J. Biol. Chem.* **273**, 26349–26360
24. Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P., and Nakano, M. M. (1995) Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **177**, 1112–1115
25. Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P., and Clark, D. P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of Bacillus subtilis: Identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**, 6749–6755
26. Niks, D., Duvvuru, J., Escalona, M., and Hille, R. (2016) Spectroscopic and kinetic properties of the molybdenum-containing, NAD+-dependent formate dehydrogenase from Ralstonia eutropha. *J. Biol. Chem.* **291**, 1162–1174
27. Zuchan, K., Baymann, F., Baffert, C., Brugna, M., and Nitschke, W. (2021) The dyad of the Y-junction- and a flavin module unites diverse redox enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1862**, 148401
28. Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., *et al.* (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in Bacillus subtilis. *Science* **335**, 1103–1106
29. Zhu, B., and Stülke, J. (2018) SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Res.* **46**, D743–D748
30. Böhmer, N., Hartmann, T., and Leimkühler, S. (2014) The chaperone FdsC for Rhodobacter capsulatus formate dehydrogenase binds the bis-molybdopterin guanine dinucleotide cofactor. *FEBS Lett.* **588**, 531–537
31. Magalon, A., and Mendel, R. R. (2015) Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor. *EcoSal Plus* **6**, 2
32. Axley, M. J., Grahame, D. A., and Stadtman, T. C. (1990) Escherichia coli formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* **265**, 18213–18218
33. Schuchmann, K., and Müller, V. (2013) Direct and reversible hydrogenation of CO2 to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* **342**, 1382–1385
34. Grimaldi, S., Biaso, F., Burlat, B., and Guigliarelli, B. (2016) *Electron paramagnetic resonance studies of molybdenum enzymes, Molybdenum and Tungsten Enzymes: Spectroscopic and Theoretical Investigations* (pp. 68–120)

35. Brondino, C. D., Passeggi, M. C. G., Caldeira, J., Almendra, M. J., Feio, M. J., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2004) Incorporation of either molybdenum or tungsten into formate dehydrogenase from Desulfovibrio alaskensis NCIMB 13491; EPR assignment of the proximal iron-sulfur cluster to the pterin cofactor in formate dehydrogenases from sulfate-reducing bacteria. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 145–151
36. Biaso, F., Burlat, B., and Guigliarelli, B. (2012) DFT investigation of the molybdenum cofactor in periplasmic nitrate reductases: Structure of the Mo(V) EPR-active species. *Inorg. Chem.* **51**, 3409–3419
37. Dermoun, Z., De Luca, G., Asso, M., Bertrand, P., Guerlesquin, F., and Guigliarelli, B. (2002) The NADP-reducing hydrogenase from Desulfovibrio fructosovorans: Functional interaction between the C-terminal region of HndA and the N-terminal region of HndD subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1556**, 217–225
38. Deaton, J. C., Solomon, E. I., Watt, G. D., Wetherbee, P. J., and Durfor, C. N. (1987) Electron paramagnetic resonance studies of the tungsten-containing formate dehydrogenase from Clostridium thermoaceticum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 424–430
39. Jollie, D. R., and Lipscomb, J. D. (1991) Formate dehydrogenase from Methylosinus trichosporium OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors. *J. Biol. Chem.* **266**, 21853–21863
40. Young, T., Niks, D., Hakopian, S., Tam, T. K., Yu, X., Hille, R., and Blaha, G. M. (2020) Crystallographic and kinetic analyses of the FdsBG subcomplex of the cytosolic formate dehydrogenase FdsABG from Cupriavidus necator. *J. Biol. Chem.* **295**, 6570–6585
41. Gardiner, A. T., Zech, S. G., MacMillan, F., Käss, H., Bittl, R., Schlodder, E., Lendzian, F., and Lubitz, W. (1999) Electron paramagnetic resonance studies of zinc-substituted reaction centers from Rhodopseudomonas viridis. *Biochemistry* **38**, 11773–11787
42. Grimaldi, S., Lanciano, P., Bertrand, P., Blasco, F., and Guigliarelli, B. (2005) Evidence for an EPR-detectable semiquinone intermediate stabilized in the membrane-bound subunit NarI of nitrate reductase A (NarGHI) from Escherichia coli. *Biochemistry* **44**, 1300–1308
43. Hastings, S. F., Kaysser, T. M., Jiang, F., Salerno, J. C., Gennis, R. B., and Ingledew, W. J. (1998) Identification of a stable semiquinone intermediate in the purified and membrane bound ubiquinol oxidase-cytochrome bd from Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* **255**, 317–323
44. Ingledew, W. J., Ohnishi, T., and Salerno, J. C. (1995) Studies on a stabilisation of ubisemiquinone by Escherichia coli quinol oxidase, cytochrome bo. *Eur. J. Biochem.* **227**, 903–908
45. Sato-Watanabe, M., Itoh, S., Mogi, T., Matsuura, K., Miyoshi, H., and Anraku, Y. (1995) Stabilization of a semiquinone radical at the high-affinity quinone-binding site (QH) of the Escherichia coli bo-type ubiquinol oxidase. *FEBS Lett.* **374**, 265–269
46. Lanciano, P., Magalon, A., Bertrand, P., Guigliarelli, B., and Grimaldi, S. (2007) High-stability semiquinone intermediate in nitrate reductase A (NarGHI) from Escherichia coli is located in a quinol oxidation site close to heme bD. *Biochemistry* **46**, 5323–5329
47. Liebl, U., Pezennec, S., Riedel, A., Kellner, E., and Nitschke, W. (1992) The Rieske FeS center from the gram-positive bacterium PS3 and its interaction with the menaquinone pool studied by EPR. *J. Biol. Chem.* **267**, 14068–14072
48. Sato, T., Yamada, Y., Ohtani, Y., Mitsui, N., Murasawa, H., and Araki, S. (2001) Production of menaquinone (vitamin K2)-7 by Bacillus subtilis. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 16–20
49. Un, S., Dorlet, P., and Rutherford, A. W. (2001) A high-field EPR tour of radicals in photosystems I and II. *Appl. Magn. Reson.* **21**, 341–361
50. Grimaldi, S., Ostermann, T., Weiden, N., Mogi, T., Miyoshi, H., Ludwig, B., Michel, H., Prisner, T. F., and MacMillan, F. (2003) Asymmetric binding of the high-affinity Q(H)(*)(-) ubisemiquinone in quinol oxidase (bo3) from Escherichia coli studied by multifrequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **42**, 5632–5639
51. Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 3963–4038
52. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nature* **402**, 47–52
53. De Causmaecker, S., Douglass, J. S., Fantuzzi, A., Nitschke, W., and Rutherford, A. W. (2019) Energetics of the exchangeable quinone, QB, in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 19458–19463
54. Rendon, J., Pilet, E., Fahs, Z., Seduk, F., Sylvi, L., Hajj Chehade, M., Pierrel, F., Guigliarelli, B., Magalon, A., and Grimaldi, S. (2015) Demethylmenaquinol is a substrate of Escherichia coli nitrate reductase A (NarGHI) and forms a stable semiquinone intermediate at the NarGHI quinol oxidation site. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 739–747
55. Covian, R., Zwicker, K., Rotsaert, F. A., and Trumpower, B. L. (2007) Asymmetric and redox-specific binding of quinone and quinol at center N of the dimeric yeast cytochrome bc1 complex. Consequences for semiquinone stabilization. *J. Biol. Chem.* **282**, 24198–24208
56. Robertson, D. E., Prince, R. C., Bowyer, J. R., Matsuura, K., Dutton, P. L., and Ohnishi, T. (1984) Thermodynamic properties of the semiquinone and its binding site in the ubiquinol-cytochrome c (c2) oxidoreductase of respiratory and photosynthetic systems. *J. Biol. Chem.* **259**, 1758–1763
57. Giordani, R., Buc, J., Cornish-Bowden, A., and Cárdenas, M. L. (1997) Kinetics of membrane-bound nitrate reductase A from Escherichia coli with analogues of physiological electron donors. *Eur. J. Biochem.* **250**, 567–577
58. Blaza, J. N., Bridges, H. R., Aragão, D., Dunn, E. A., Heikal, A., Cook, G. M., Nakatani, Y., and Hirst, J. (2017) The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases. *Sci. Rep.* **7**, 40165
59. Heikal, A., Nakatani, Y., Dunn, E., Weimar, M. R., Day, C. L., Baker, E. N., Lott, J. S., Sazanov, L. A., and Cook, G. M. (2014) Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: A monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. *Mol. Microbiol.* **91**, 950–964
60. Oh, J. I., and Bowien, B. (1999) Dual control by regulatory gene fdsR of the fds operon encoding the NAD+-linked formate dehydrogenase of Ralstonia eutropha. *Mol. Microbiol.* **34**, 365–376
61. Pinske, C., and Sawers, R. G. (2016) Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSal Plus* **7**, 1
62. Höper, D., Völker, U., and Hecker, M. (2005) Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **187**, 2810–2826
63. Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **183**, 5617–5631
64. Ye, R. W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. (2000) Global gene expression profiles of Bacillus subtilis grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 4458–4465
65. Dubnau, D., and Davidoff-Abelson, R. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**, 209–221
66. Szyttenholm, J., Chaspoul, F., Bauzan, M., Ducluzeau, A.-L., Chehade, M. H., Pierrel, F., Denis, Y., Nitschke, W., and Schoepp-Cothenet, B. (2020) The controversy on the ancestral arsenite oxidizing enzyme; deducing evolutionary histories with phylogeny and thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 148252
67. Pelosi, L., Vo, C.-D.-T., Abby, S. S., Loiseau, L., Rascalou, B., Hajj Chehade, M., Faivre, B., Goussé, M., Chenal, C., Touati, N., Binet, L., Cornu, D., Fyfe, C. D., Fontecave, M., Barras, F., *et al.* (2019) Ubiquinone biosynthesis over the entire O2 range: Characterization of a conserved O2-independent pathway. *mBio* **10**, e01319-19
68. McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N., and Jeuken, L. J. C. (2012) Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J. Biol. Chem.* **287**, 14215–14225
69. Burghaus, O., Plato, M., Rohrer, M., Moebius, K., MacMillan, F., and Lubitz, W. (1993) 3-mm High-field EPR on semiquinone radical anions Q.cntdot.- related to photosynthesis and on the primary donor P.cntdot.+ and acceptor QA.cntdot.- in reaction centers of Rhodobacter sphaeroides R-26. *J. Phys. Chem.* **97**, 7639–7647
70. Stoll, S., and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178**, 42–55
71. Santin, Y. G., Doan, T., Lebrun, R., Espinosa, L., Journet, L., and Cascales, E. (2018) *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion

biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nat. Microbiol.* **3**, 1304–1313
72. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., *et al.* (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450
73. Gumerov, V. M., and Zhulin, I. B. (2020) TREND: A platform for exploring protein function in prokaryotes based on phylogenetic, domain architecture and gene neighborhood analyses. *Nucleic Acids Res.* **48**, W72–W76
74. Letunic, I., and Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **49**, W293–W296
75. George, G. N., Hilton, J., Temple, C., Prince, R. C., and Rajagopalan, K. V. (1999) Structure of the molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1256–1266
76. Jepson, B. J. N., Anderson, L. J., Rubio, L. M., Taylor, C. J., Butler, C. S., Flores, E., Herrero, A., Butt, J. N., and Richardson, D. J. (2004) Tuning a nitrate reductase for function. *J. Biol. Chem.* **279**, 32212–32218
77. Barber, M. J., May, H. D., and Ferry, J. G. (1986) Inactivation of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum* by cyanide. *Biochemistry* **25**, 8150–8155
78. Jepson, B. J. N., Mohan, S., Clarke, T. A., Gates, A. J., Cole, J. A., Butler, C. S., Butt, J. N., Hemmings, A. M., and Richardson, D. J. (2007) Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 6425–6437
79. Najmudin, S., González, P. J., Trincão, J., Coelho, C., Mukhopadhyay, A., Cerqueira, N. M. F. S. A., Romão, C. C., Moura, I., Moura, J. J. G., Brondino, C. D., and Romão, M. J. (2008) Periplasmic nitrate reductase revisited: A sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 737–753
80. Gangeswaran, R., Lowe, D. J., and Eady, R. R. (1993) Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **289**, 335–342
81. Butler, C. S., Charnock, J. M., Bennett, B., Sears, H. J., Reilly, A. J., Ferguson, S. J., Garner, C. D., Lowe, D. J., Thomson, A. J., Berks, B. C., and Richardson, D. J. (1999) Models for molybdenum coordination during the catalytic cycle of periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* derived from EPR and EXAFS spectroscopy. *Biochemistry* **38**, 9000–9012
82. Dementin, S., Arnoux, P., Frangioni, B., Grosse, S., Léger, C., Burlat, B., Guigliarelli, B., Sabaty, M., and Pignol, D. (2007) Access to the active site of periplasmic nitrate reductase: Insights from site-directed mutagenesis and zinc inhibition studies. *Biochemistry* **46**, 9713–9721
83. Arnoux, P., Sabaty, M., Alric, J., Frangioni, B., Guigliarelli, B., Adriano, J.-M., and Pignol, D. (2003) Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 928–934
84. Simpson, P. J. L., McKinzie, A. A., and Codd, R. (2010) Resolution of two native monomeric 90kDa nitrate reductase active proteins from *Shewanella gelidimarina* and the sequence of two *napA* genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 13–18
85. Butler, C. S., Charnock, J. M., Garner, C. D., Thomson, A. J., Ferguson, S. J., Berks, B. C., and Richardson, D. J. (2000) Thiocyanate binding to the molybdenum centre of the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus*. *Biochem. J.* **352**, 859–864
86. Rivas, M. G., González, P. J., Brondino, C. D., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2007) EPR characterization of the molybdenum(V) forms of formate dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 upon formate reduction. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 1617–1622
87. Prisner, T., Lyubenova, S., Atabay, Y., MacMillan, F., Kröger, A., and Klimmek, O. (2003) Multifrequency cw-EPR investigation of the catalytic molybdenum cofactor of polysulfide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 419–426
88. Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A.-B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., and Gross, C. A. (2017) Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for Bacillus subtilis. *Cell Syst.* **4**, 291–305
89. Yang, J., and Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43**, W174–W181

Supporting information

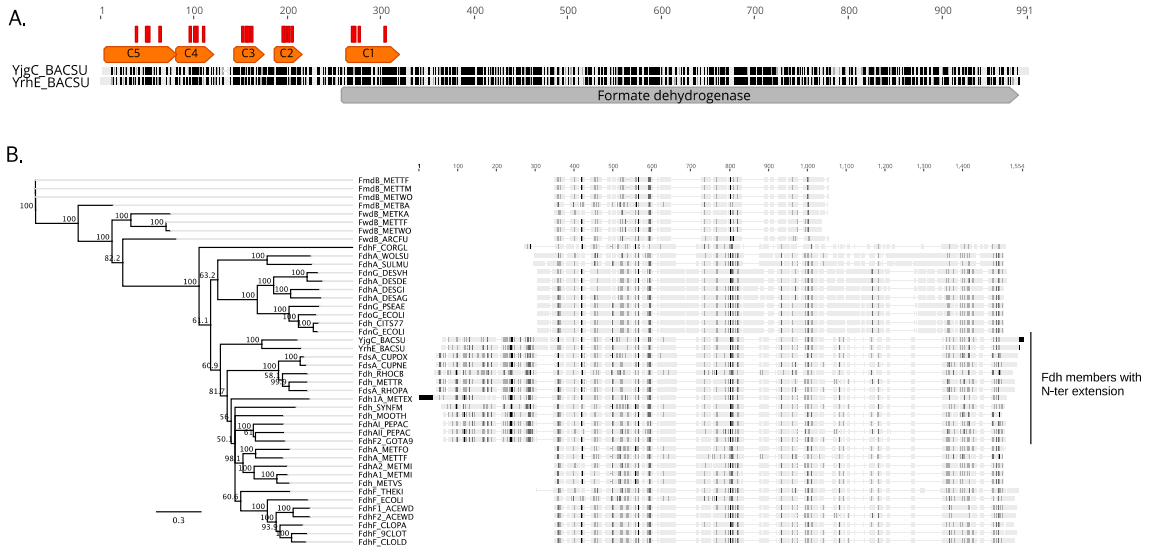


Figure S1. Phylogenetic tree and alignment of catalytic subunits of characterized Mo/W-*bis*PGD-containing FDH enzymes.

A. Pairwise sequence alignment of YjgC and YrhE from *B. subtilis* with predicted regions for [Fe-S] clusters C1 to C5 (orange) and Mo/W-*bis*PGD cofactor binding motif (grey). Position of amino acids involved in iron coordination are highlighted in red. Conserved amino acids between sequences are black-colored.

B. Full sequence alignment of 42 characterized FDH enzymes and of the two putative FDH proteins from *B. subtilis*. Alignments generated with Geneious Prime® 2020.1.1 (Global alignment: blosum62 matrix, Gap open penalty 12, Gap ext penalty 3 and 1000 refinement iterations, Tree building: Jukes-Cantor genetic distance model, neighbor joining method, no outgroup with resampling bootstrap and 1000 replicates). Protein sequences description is detailed in Table S1.

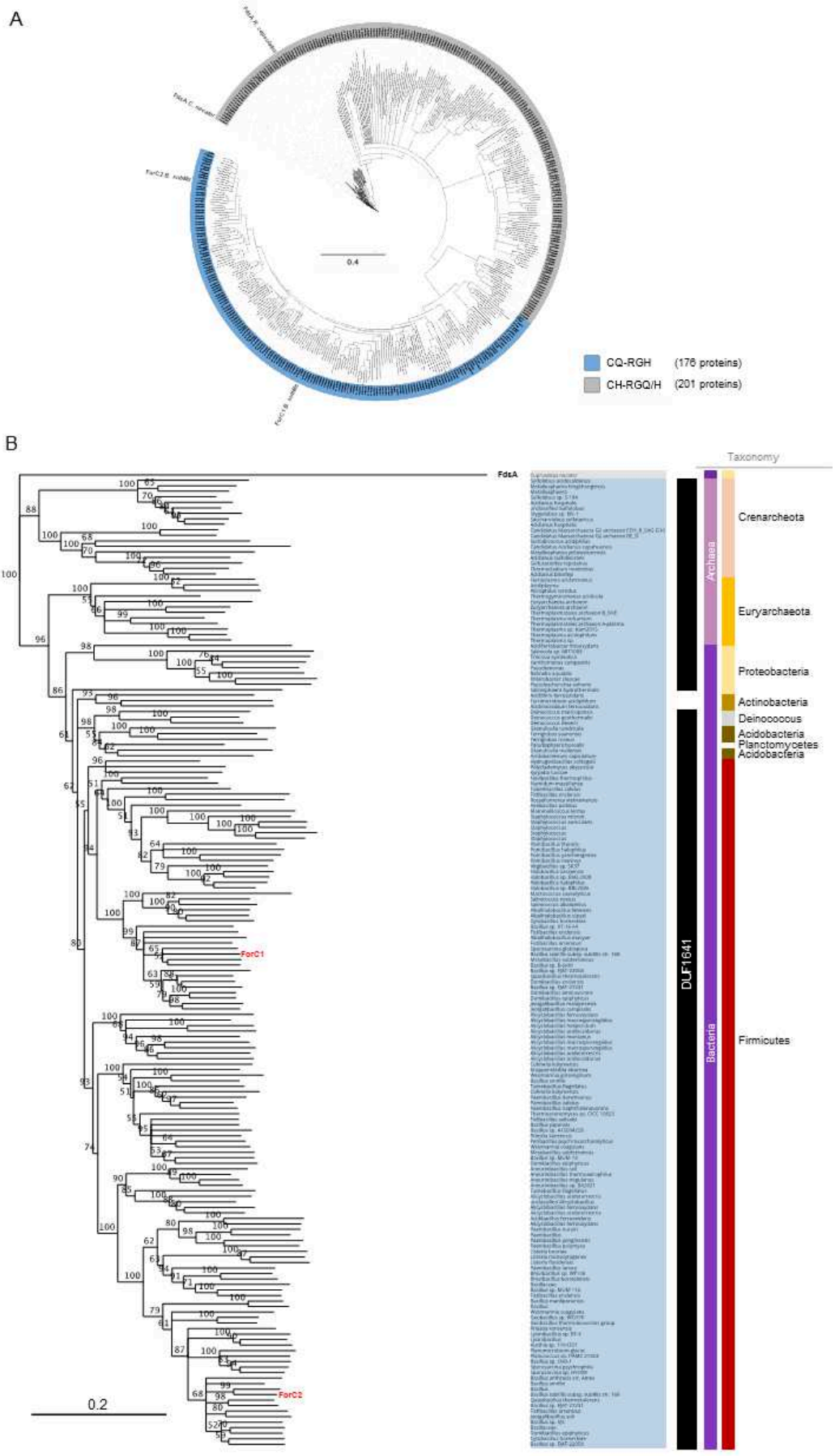

A
0.4
CQ-RGH (176 proteins)
CH-RGQ/H (201 proteins)
B
FdsA
Taxonomy
Crenarcheota
Euryarchaeota
Proteobacteria
Actinobacteria
Deinococcus
Acidobacteria
Planctomycetes
Acidobacteria
Firmicutes
Archaea
Bacteria
DUF1641
ForC1
ForC2
0.2

Figure S2. Distribution of ForC and related proteins with the CQ RGH and CH RGQ/H motif.

A. Phylogenetic tree of 377 sequences related to ForC and FdsA proteins and distribution of the CQ RGH and CH RGQ/H motif. The sequence dataset was obtained by merging the results of 3 independent BLAST searches, using the ForC1 sequence from *B. subtilis* as bait for the first search and the sequence with the lowest similarity score but displaying the CQ-RGH motif as a query for the other two consecutive searches. The results of each BLAST search were analysed with TREND (73) to remove sequence redundancy (CD-HIT: 0.9) and sequences lacking an N-terminal extension allowing coordination of 4 [Fe-S] clusters were removed. The final batch of sequences (377) was aligned and FdsA from *C. necator* was used as the root for phylogenetic tree construction. Sequences with a CQ RGH motif are colored in blue while the other are colored in grey.

B. Phylogenetic and taxonomy distribution of 176 sequences with the CQ RGH motif and the FsdA sequence from *C. necator*. The presence of a ForE (DUF1641) homolog in synteny with the ForC related protein was determined with TREND or by manual search. ForC1 and ForC2 from *B. subtilis* are highlighted in red, FsdA from *C. necator* is highlighted in black.

Alignments and phylogenetic trees were generated with Geneious Prime® 2020.1.1 (Global alignment: blosum62 matrix, Gap open penalty 12, Gap ext penalty 3 and 1000 refinement iterations, Tree building: Jukes-Cantor genetic distance model, neighbor joining method, outgroup FsdA from *C. necator* (WP_011614623) with resampling bootstrap and 1000 replicates). Phylogenetic tree in Fig S2A was edited using iTOL (74). The 377 sequence identifiers used for the phylogenetic tree are found in the Supplementary Information Table S9.

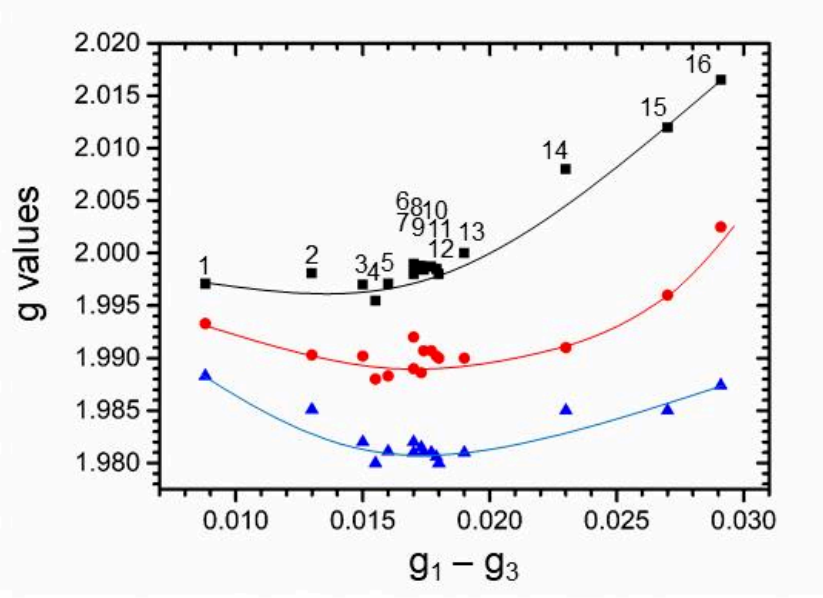


Figure S3: Plot of the g values of Mo(V) species against g-tensor anisotropy for selected bacterial and eukaryotic Mo/W-*bis*PGD enzymes with Cys or SeCys ligand. g_1, g_2 and g_3 values are indicated by black squares, red circles and blue triangles, respectively. Nonlinear correlations can be extrapolated and are schematically indicated by solid lines. Data sets correspond to 1: *Bacillus subtilis* ForCE2 (this work), 2: *R. sphaeroides* dimethylsulfoxide reductase (S147C variant) (75), 3: *Synechococcus sp.* PCC 7942 assimilatory nitrate reductase NarB (76), 4: *Methanobacterium formicicum* FDH incubated with potassium cyanide (77), 5: *E. coli* periplasmic nitrate reductase NapA (78), 6: *Desulfovibrio desulfuricans* NapA (high g turnover Mo(V) species) (79), 7: *Azotobacter vinelandii* assimilatory nitrate reductase NAS (80), 8: *Paracoccus denitrificans* NapAB (81), 9: *R. sphaeroides* NapA (82), 10: *R. sphaeroides* NapAB (83), 11: *Shewanella gelidimarina* NapA (84), 12: *Paracoccus pantotrophus* NapAB (81), 13: *D. desulfuricans* NapA (high g nitrate Mo(V) species) (79), 14: *Paracoccus pantotrophus* NapAB incubated with thiocyanate (85), 15: *Desulfovibrio desulfuricans* FDH (86), 16: *Wolinella succinogenes* polysulfite reductase (87).

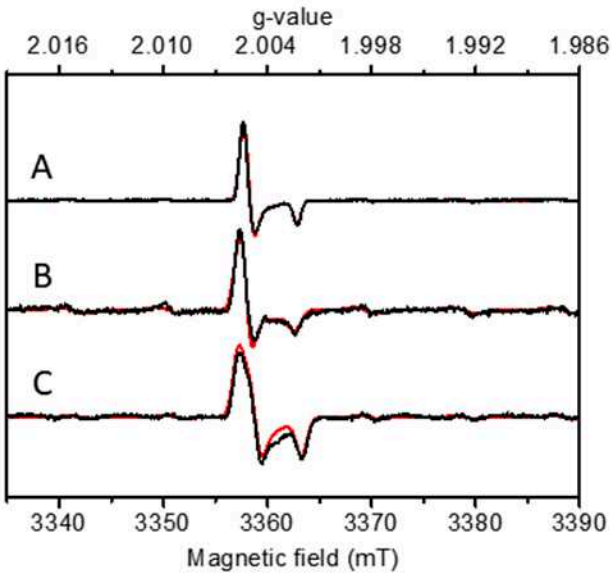


Figure S4: W-band cw EPR spectra of MSK stabilized in ForCE1 (A), ForCE2 (B) and *Ec*NarGHI (C). Simulations are shown in red and are superimposed to the experimental spectra shown in black. Simulation parameters are: g-tensor principal values $g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, 2.0023 (A), 2.0056, 2.0051, 2.0023 (B), 2.0058, 2.0048, 2.0022 (C). H-strain parameters (25.8, 25.8, 24.2) MHz (A), (33.6, 27.2, 38.1) MHz (B) and (34.4, 36.5, 34.2) MHz. (C). Experimental conditions: temperature, 50 K, microwave power, 0.05 mW (A, B) and 0.005 mW (C), modulation amplitude, 0.4 mT at 100 kHz (A, B) or at 10 kHz (C), microwave frequency, 94.2441 GHz (A), 94.0012 GHz (B) and 94.2493 GHz (C).

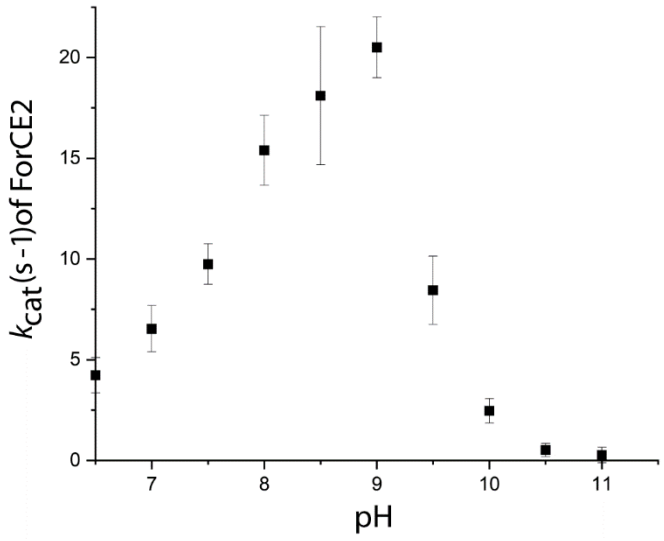
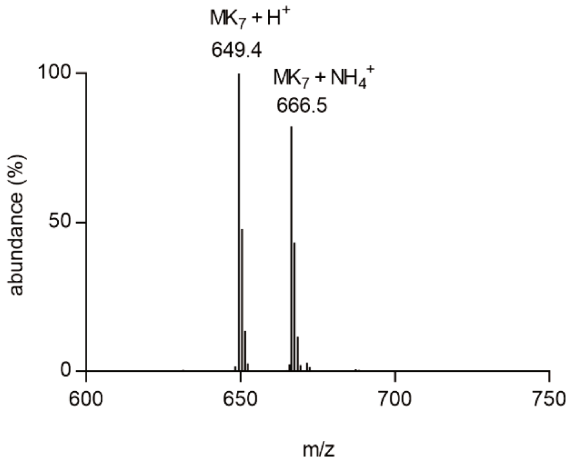


Figure S5: pH dependence of k_{cat} (s^{-1}) for formate:menadione oxidoreduction by ForCE2.

A



B

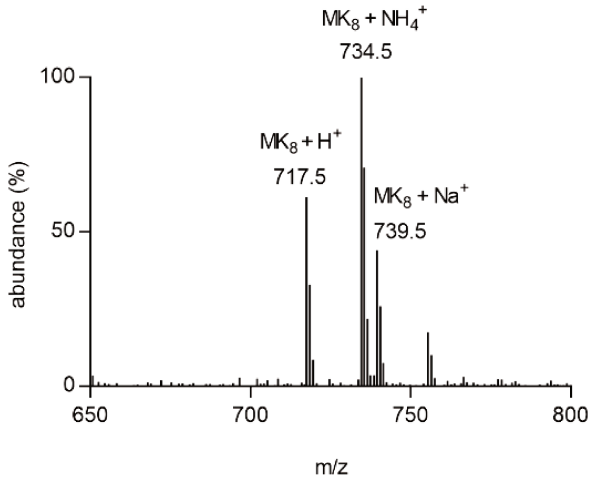


Figure S6: Mass spectra of MK-7 and MK-8 by HPLC-MS

A: Mass spectrum of MK-7 (eluting at 11.5 min) obtained by HPLC-MS analysis of lipid extracted from purified ForCE1.

B: Mass spectrum of MK-8 (eluting at 13.95 min) obtained by HPLC-MS analysis of lipid extracted from purified ForCE1.

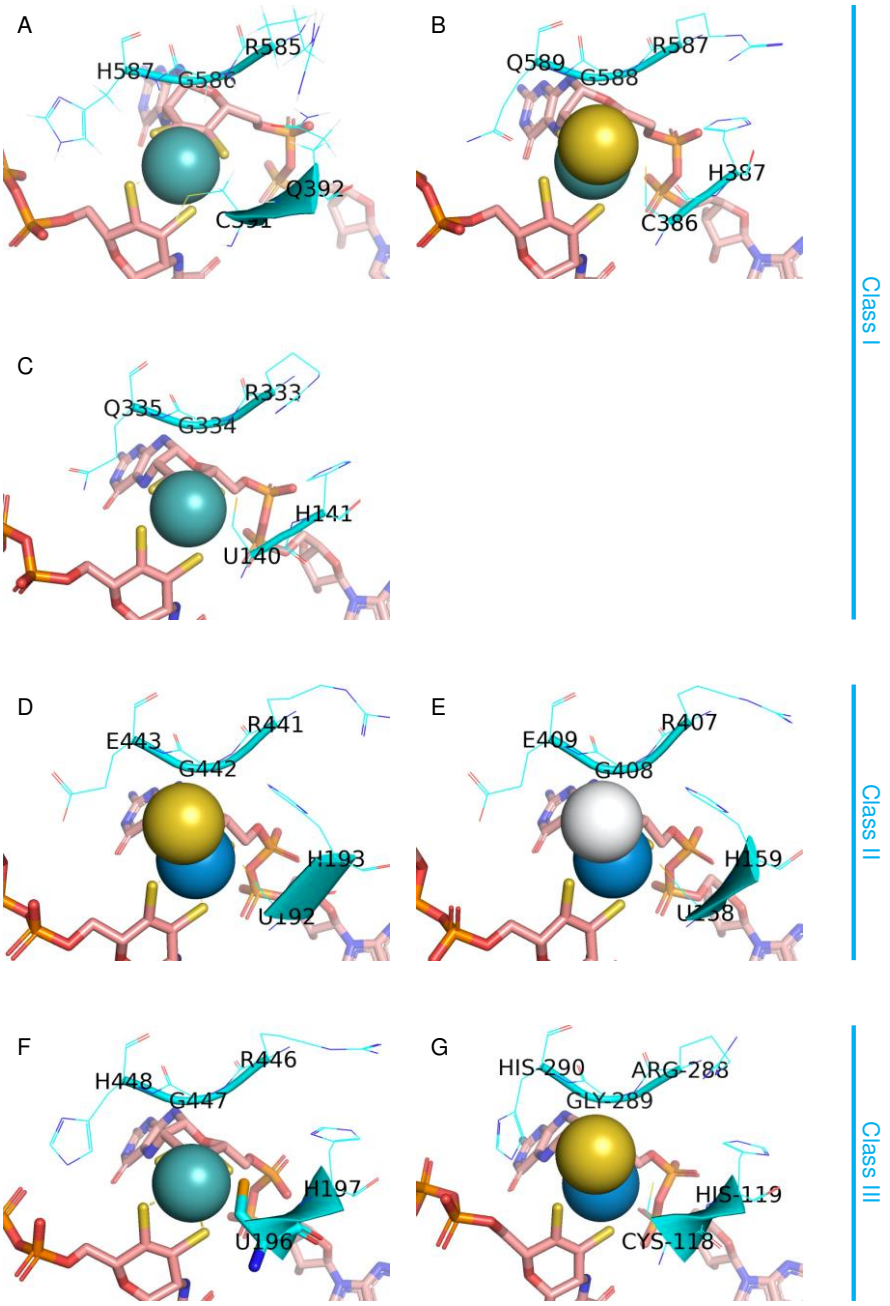


Figure S7. Amino acids surrounding the Mo/W atom in FDH active site and their classification. Mo/W (blue), ligands (yellow and white), *bis*-PGD (pink) and amino acids (cyan)

Class I type C/UH-RGQ: A. ForC1 model with CQ-RGH (based on 6TGA structure), B. FdsA from *R. capsulatus* (pdb: 6TGA) and C. FdhF from *E. coli* (pdb:1FDO)

Class II type UH-RGE: D. FdhA from *D. gigas* (pdb:1H0H) and E. FdhA from *D. vulgaris* (pdb: 6SDR)

Class III type UH-RGH: F. FwdBD from *M. wolfeii* (pdb: 5T5i) and G. FdnG from *E. coli* (pdb:1KQF).

Table S1: FDH sequences used for alignments in figures 1A and S1B.

Protein Name	Organism	Identifier
FmdB_METTF	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	P95295
FmdB_METTM	*Methanothermobacter marburgensis*	D9PXE7
FmdB_METWO	*Methanothermobacter wolfeii*	O74033
FmdB_METBA	*Methanosarcina barkeri*	Q48945
FwdB_METKA	*Methanopyrus kandleri*	Q8TYN5
FwdB_METTF	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	Q59580
FwdB_METWO	*Methanothermobacter wolfeii*	O74032
FwdB_ARCFU	*Archaeoglobus fulgidus*	O28350
FdhF_CORGL	*Corynebacterium glutamicum*	Q8NSY6
FdhA_WOLSU	*Wolinella succinogenes*	Q7M971
FdhA_ SULMU	*Sulfurospirillum multivorans*	Q6W8A3
FdnG_DESVH	*Desulfovibrio vulgaris*	Q727P3
FdhA_DESDE	*Desulfovibrio desulfuricans*	Q1KRL6
FdhA_DESGI	*Desulfovibrio gigas*	Q934F5
FdhA_DESAG	*Desulfovibrio alaskensis*	Q314X8
FdhG_ PSEAE	*Pseudomonas aeruginosa*	Q14T72
FdoG_ECOLI	*Escherichia coli (strain K12)*	P32176
Fdh_CITS77	*Citrobacter sp. S77*	WP_136345514
FdnG_ECOLI	*Escherichia coli (strain K12)*	P24183
YjgC_BACSU	*Bacillus subtilis (strain 168)*	O34720
YrhE_ BACSU	*Bacillus subtilis (strain 168)*	Q795Y4
FdsA_CUPOX	*Cupriavidus oxalaticus*	A0A4P7LDP8
FdsA_CUPNE	*Cupriavidus necator*	O87815
Fdh_RHOCB	*Rhodobacter capsulatus*	D5AQH0
Fdh_METTR	*Methylosinus trichosporium OB3b*	A0A2D2D2X1
FdsA_RHOPA	*Rhodopseudomonas palustris*	Q6NBU4
Fdh1A_METEX	*Methylorubrum extorquens*	Q8KTI7
Fdh_SYNFM	*Syntrophobacter fumaroxidans*	A0LP28
Fdh_MOOTH	*FdhA Moorella thermoacetica*	P77908
FdhAII_PEPAC	*Peptoclostridium acidaminophilum*	Q93V05

FdhAI_PEPAC	*Peptoclostridium acidaminophilum*	Q93V06
FdhF2_GOTA9	*Gottschalkia acidurici*	K0B3A3
FdhA_METFO	*Methanobacterium formicicum*	P06131
FdhA_METTF	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	Q50569
FdhA2_METMI	*Methanococcus maripaludis*	Q877E3
FdhA1_METMI	*Methanococcus maripaludis*	Q877E4
Fdh_METVS	*Methanococcus vannielii*	A6UPU2
FdhF_THEKI	*Thermoanaerobacter kivui*	A0A097ATK5
FdhF_ECOLI	*Escherichia coli*	P07658
FdhF1_ACEWD	*Acetobacterium woodii*	H6LB59
FdhF2_ACEWD	*Acetobacterium woodii*	H6LB61
FdhF_CLOPA	*Clostridium pasteurianum*	A0A0H3IZZ5
FdhF_9CLOT	*Clostridium carboxidivorans P7*	C6PQ41
FdhF_CLOLD	*Clostridium ljungdahlii*	D8GPQ2

Table heading for Tables S2-4: NCBI accession number; Protein name, name in NCBI; % of Coverage, percent protein sequence coverage by the matching peptides; Peptide Spectral Match, number of peptide spectral matches given by the Sequest algorithm corresponding to the total number of identified peptide sequences for the protein, including those redundantly identified; Unique peptides, number of distinct peptides matching to protein sequence and unique to this protein; MW (kDa), theoretical molecular mass of the identified protein (given by Sequest algorithm).

Table S2: Mass spectrometry analysis of His-YjgCD/ForCE1 purification

Table S2:	**Mass spectrometry analysis of His-YjgCD/ForCE1 purification**				
NCBI accession number	Protein Name	Coverage (%)	Peptide Spectral Match	Unique peptides	MW [kDa]
2633571	conserved hypothetical protein / YjgD/ForE1	73	89	17	21,3
2633570	putative formate dehydrogenase/YjgC/ForC1	31	48	26	109,7
124494288	tryptophan operon RNA-binding attenuation protein	75	41	6	8,3
16079676	hypothetical protein BSU26230	61	40	14	34,8
255767498	transcriptional regulatory protein resD	42	16	9	27,5
16079617	hypothetical protein BSU25630	59	17	9	21,3
143378	pyruvate decarboxylase (E-1) beta subunit	35	12	9	35,5
2634761	fused GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	29	10	8	44,1
81815554	SPBc2 prophage-derived glycosyltransferase SunS	25	10	8	49,7

Table S3: Mass spectrometry analysis of YjgC-His/ForC1 purification

Table S3:	Mass spectrometry analysis of His-YrhED/ForCE2 purification				
NCBI accession number	Protein Name	Coverage (%)	Peptide Spectral Match	Unique peptides	MW (kDa)
1934609	formate dehydrogenase chain A/YrhE/ForC2	77	601	78	109
1708969	malate dehydrogenase	81	152	37	33,6
16079777	hypothetical protein BSU27230/YrhD/ForE2	89	98	19	17,5
16078294	NADH dehydrogenase-like protein yjlD	69	33	23	41,9
118672	Dihydrolipoyl dehydrogenase	57	28	19	49,7
2636062	Flagellin protein	69	20	14	32,6
2635469	putative enzyme with sugar binding fold	66	23	12	16,8
124494288	tryptophan operon RNA-binding attenuation protein	75	18	9	8,3
143378	pyruvate decarboxylase (E-1) beta subunit	73	19	15	35,5
16078524	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase co	31	19	14	47,5
414000	ipa-76d	42	18	14	56,3
16078226	inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase 1	45	19	13	30
81341008	Putative aminopeptidase YhfE	36	17	12	38,7
16078208	oligopeptide ABC transporter binding lipoprotein	45	18	17	61,5
50812222	acyl-CoA thioester hydrolase ykhA	58	15	7	19,3
2226138	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	31	16	15	62,5
16078522	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	41	12	11	41,5
251757310	Probable phosphate butyryltransferase	35	10	9	31,7

Table S4: Mass spectrometry analysis of His-YrhED/ForCE2 purification

Table S4:	Mass spectrometry analysis of YjgC-His/ForC1 purification				
NCBI accession number	Protein Name	Coverage (%)	Peptide Spectral Match	Unique peptides	MW (kDa)
2633570	putative formate dehydrogenase YjgC/ForC1	67	470	78	109,7
124494288	tryptophan operon RNA-binding attenuation protein	75	23	8	8,3
251757310	Probable phosphate butyryltransferase	44	10	10	31,7

Table S5: HPLC-ECD quantification of MK in lipid extracts of purified ForCE1, ForCE2 and ForC1 (n=2 independent purifications)

FDH	MK-7 (pmol/pmol of protein)	MK-8 (pmol/pmol of protein)
ForCE1	0.87 ± 0.092	0.025 ± 0.009
ForC1	0.016 ± 0.001	ND
ForCE2	1.63 ± 0.82	0.035± 0.009

Table S6: Strains used in this work

Strains	Description	Reference
4161	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2*	BGSC
4088	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2 amyE*::pSHP1-6his*yjg*CD	This work
4089	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2 amyE*::pSHP2-*yjgC*8his	This work
4040	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*yjgD*::ery	This work
4233	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*yjgD*::*ery amyE*::pSHP2-*yjgC*8his	This work
4156	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*yjgC*::*kan*	BGSC
4167	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*resE::ery*	BGSC
4191	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*resE::ery amyE:*:pSHP1-6his*yrhED*	This work
4192	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*resE*::*ery amyE*::pSHP2-*yrhE*8his	This work
4230	*Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*resE*::*ery* Δ*yjgC*::*kan amyE*::pSHP1-6his*yrhED*	This work

Table S7: Primers used in this work

Primer	Sequence (5' to 3')
898	atttgtatttccaaggtcatatggctggcaagaaaacaatcacaa
899	tcgagtgcggccgcaagcttcaatctcgcttattcattcctctt
941	atgcatctagaaaggagattcctaggatggctcaccaccaccaccaccac
944	gatgggtaccgggccccccctcgagatggctggcaagaaaacaatcac
952	caagcttatcgataccgtcgacctcgagtcaatctcgcttattcattcc
966	atgacataaaatgcatctagaaaggagattcctaggatggctcaccaccaccaccaccacgaaaat ttgtatttccaaggtcatatgatg
967	cgaaaatttgtatttccaaggtcatatgatggacgttaagtcgatcagtg
968	cgcggccgctctagaactagaattcttattgttctcgaagttcttttccc
988	gatgggtaccgggccccccctcgagatgatggacgttaagtcgatcagtg
1042	ggtggtggtggtggtggccattatggccatcagtcagatgtacatagccag

Table S8. Parameters used to simulate the EPR spectra shown in this work.

EPR-active species	Enzyme	Magnetic parameters	Linewidth parameters	Microwave frequency band
Mo(V)	ForCE2	$g_{1,2,3}$ = 1.9971, 1.9934, 1.9890 [1]$A_{1,2,3}$ = 12.5, 12.4 & 11.0 MHz	9.7, 12.0 & 8.9 MHz	X
			25.8, 20.7 & 19.4 MHz	Q
			82.7, 68.5 & 76.7 MHz	W
MSK	ForCE1	$g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, 2.0023	28.5, 25.5 & 26.9 MHz	X
			25.8, 25.8 & 24.2 MHz	Q
			22.2, 28.4 & 21.1 MHz	W
$[2Fe\text{-}2S]^{1+}$	ForCE1	g_{12}, g_3 = 2.0180, 1.9373	0.0085, 0.0116	X
$[2Fe\text{-}2S]^{1+}$	ForCE2	g_{12}, g_3 = 2.0203, 1.9357	0.0164, 0.0176	X
$[4Fe\text{-}4S]^{1+}$	ForCE1	$g_{1,2,3}$ = 2.0474, 1.9484, 1.8966	0.0227, 0.0117, 0.0194	X
$[4Fe\text{-}4S]^{1+}$	ForCE2	$g_{1,2,3}$ = 2.0295, 1.9401, 1.9119	0.0328, 0.6009, 0.0170	X

[1] with colinear g- and proton hyperfine tensors

Table S9: FDH identifiers used for the phylogenetic tree in Figure S2

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8808070/

Partie 1b

Cette première étude a permis d'établir que les enzymes ForCEs sont des FDH non-canoniques. Cependant, de nombreuses questions ont découlé de ce premier article. Où se fixe la ménaquinone ? Quel est le trajet des électrons ? Bien que la structure de ForC ait été modélisée avec les structures de FdsA de *R. capsulatus* et Fodh1A de *M. extorquens*, le [2Fe-2S] est-il le dernier relais électronique pour toutes ces enzymes ? Quel est le rôle du [4Fe-S] non conservé dans Fodh1A de *M. extorquens* ? Quel est le rôle de la protéine ForE dans la fixation de la ménaquinone ? Comment s'organise le complexe ForC/ForE ? En effet, la structure AF prédite de ForE, sous forme d'un enchaînement d'hélices alpha et de boucles, ne nous amène aucun éclairage. Pour répondre à cet ensemble de questions, la structure du complexe a été résolue en collaboration avec une équipe de structuralistes et la caractérisation rédox des centres [Fe-S] a été réalisée par RPE. Également, les enzymes ForCEs ayant une activité formiate:menaquinone oxydoréductase, nous avons sommes demandés si ces enzymes participaient à une chaîne de transfert d'électrons chez *B. subtilis*? Pour répondre à cette question, nous avons analysé par oxygraphie l'activité de la chaîne respiratoire aérobie de *B. subtilis* en présence de formiate et en utilisant un ensemble souches mutantes. Enfin, la présence de quinones co-purifiées avec l'enzyme implique que cette dernière soit connectée à la membrane. Le module ForE permet-il de médier une interaction directe entre le complexe et la membrane ? Cette interaction est-elle portée par le domaine conservé de fonction inconnue DUF1641 constitué de deux hélices amphipatiques ? Pourquoi le DUF1641 est-il conservé ? Des variants protéiques mutés au niveau du domaine DUF1641 ont été créés, purifiés, et leur capacité à connecter l'enzyme à la membrane a été évaluée par oxygraphie. De plus, les 4000 séquences protéiques qui contiennent DUF1641 ont été analysée par SSN-GNN (réseau de similarité de séquences et réseau des voisins génomiques). Par ailleurs, nos travaux ont été validés par les résultats de (Grinter et al. 2023), qui montrent que l'hydrogénase Huc de *Mycobacterium smegmatis* présente une organisation similaire à ForCE1 avec un module partenaire, HucM, qui joue le rôle de ForE.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans laquelle je figure en qualité de co-première auteure, et qui est en cours de révision dans le journal NSMB (Nature Structural & Molecular Biology) depuis le 22 mars 2024. Au regard de la pluridisciplinarité des approches et des techniques utilisées, ce projet a nécessité plusieurs collaborations ayant principalement

impliquées notre équipe, celle d'Yvain Nicolet de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble, celle de Bruno Guigliarelli du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) à Marseille, et celle de Pascal Arnoux de l'Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM) à Cadarache dans le cadre d'une ANR collaborative FORCE.

Mes contributions :

Dans la continuité de l'étude précédente, j'ai optimisé la purification de ForCE1 en atmosphère anaérobie contrôlée pour améliorer la résolution de la structure de ForCE1. En parallèle, j'ai réalisé l'ensemble des expériences de biologie moléculaire et d'enzymologie ayant aboutie à la génération et à la caractérisation des variants du domaine HMP (mutagénèse, clonage, purification et caractérisation enzymatique). Également, j'ai construit l'ensemble des souches nécessaires aux expériences d'oxygraphie, et réalisé ces dernières. Enfin, j'ai participé à la rédaction de l'article pour la mise en forme et l'analyse des données

A Conserved Helical Membrane Plug-in for Quinone reductases

Broc M.[#1], Cherrier M.V.[#2], Uzel A.[3], Arias-Cartin R.[1, 4], Arnoux P.[5], Brasseur G.[1], Seduk F.[1], Guigliarelli B.[3], Legrand P.[6], Pierrel F.[7], Schoehn G.[8], Maté MJ.[9], Martin L.[2], Grimaldi S.[3], Nicolet Y.[2*], Magalon A.[1*], Walburger A.[1*]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, LCB, IMM, IM2B, Marseille, France.

[2] Univ Grenoble-Alpes, CNRS, CEA, Metalloproteins Unit, Grenoble, France.

[3] Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, IMM, IM2B, Marseille, France.

[4] Present address: Stress Adaptation and Metabolism Unit, Department of Microbiology, Pasteur Institute, CNRS, Microbiologie Intégrative et Moléculaire, Paris, France.

[5] Aix Marseille Univ, CNRS, CEA, BIAM, IM2B, Saint Paul-Lez-Durance, France.

[6] Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Gif-sur-Yvette, France.

[7] Univ Grenoble-Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France.

[8] Univ Grenoble-Alpes, CNRS, CEA, Electron Microscopy and Methods Unit, Grenoble, France.

[9] Aix Marseille Univ, CNRS, AFMB, IM2B, Marseille, France.

[#]These authors contributed equally to this work.
[*]Corresponding authors. E-mail:annewalburger@univ-amu.fr; magalon@imm.cnrs.fr; yvain.nicolet@ibs.fr

Abstract

Redox processes are essential for life on Earth and involve efficient electron transfer between metabolic pathways that are often located in distinct cellular compartments. To achieve this, prokaryotes have developed a structural module that enables channeling of quinones, from the membrane to various water-soluble redox catalytic units. Using X-ray crystallography and cryo-electron microscopy, we determined the structure of the unusual bacterial formate dehydrogenase ForCE that contains four ForC catalytic subunits docked around a membrane-associated tetrameric ForE central scaffold. In the latter, a conserved domain that we propose to name Helical Membrane Plug-in (HMP) was identified as essential to link formate oxidation to the aerobic respiratory chain. Our bioinformatic analysis indicates that this HMP is associated with different quinone-reducing oxidoreductases, highlighting its broad significance as a functional unit to wire electrons between a given catalytic redox center and the quinone pool.

Biological redox processes are fundamental to Life as they afford various bioenergetic pathways such as respiration, carbon, and nitrogen fixation. These reactions play a crucial role in major geochemical cycles by connecting cells to key atmospheric gasses such as N_2, CO_2, or H_2. The enzymes catalyzing these redox reactions primarily utilize cofactors containing transition metals and are often considered as ancient enzymes participating in the early reactions that contributed to the origin of life[1–4]. Interestingly, these enzymes exhibit a set of conserved structural motifs that bind various cofactors, creating an intricate wiring system for an efficient electron transport. A significant challenge arises when electrons need to be transported between a hydrosoluble environment and a plasma membrane.

Molybdenum/Tungsten *bis*pyranopterin guanine dinucleotide (Mo/W-*bis*PGD) formate dehydrogenases (FDHs) family is found in various prokaryotes involved in the carbon cycle[5,6]. The catalytic domain, conserved through the Mo/W-*bis*PGD enzymes superfamily, is sometimes fused to an additional electron connecting module also found in hydrogenases and complex I[5]. This is the case for the non-canonical FDHs from *Bacillus subtilis,* in which the catalytic subunit, ForC, binds six metal cofactors[7]. Electrons are wired from formate to quinone, but the mechanism by which the hydrosoluble enzyme interacts with the membrane, where the quinone pool is located, remains unclear. Remarkably, ForC forms a phylogenetic clade, which is distinct from other FDHs[7]. Moreover, it is always found associated with ForE, with whom it forms a complex. ForE is the only partner subunit among FDHs that lacks the signatures for a cofactor binding motif (Extended Data Fig. 1a) but instead contains a conserved Domain of Unknown Function (DUF1641)[7]. Therefore, we hypothesized that ForE allows connection between the hydrosoluble catalytic subunits and the membrane quinone pool. Here, we report the structural and cellular bases of formate:menaquinone oxidoreduction in *Bacillus subtilis.* We demonstrate that the DUF1641 found in ForE is indeed responsible for linking the FDH to the membrane. We also discovered that the genes encoding the DUF1641 domain always match with a hydrosoluble redox enzyme. Collectively, our findings reveal that this domain corresponds to a conserved structural unit for constructing oxidoreductases in prokaryotes, enabling quinone channeling from the membrane to various redox catalytic subunits. Therefore, we propose to name this DUF1641 as Helical Membrane Plug-in (HMP).

Results

The formate dehydrogenase contains four catalytic subunits docked around a tetrameric central scaffold.

We purified the ForCE complex from *B. subtilis* (*Bs*ForCE1) and determined its structure using X-ray crystallography (XRC) at a resolution of 2.65 Å and single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) at 3.35 Å (Fig.1, Supplemental Tables 1, 2 and 3). Both methods led to almost identical structures, but also unique and highly complementary features. The overall ForCE structure corresponds to a $ForC_4E_4$ hetero-octamer, in agreement with Size-Exclusion Chromatography combined with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS) analysis (Extended Data Fig. 2a). The quaternary structure recalls a four-flower bunch with dimensions of about 175 x 175 x 135 Å (Fig. 1a). The four ForE subunits are exclusively constituted of α-helical segments and are intertwined into a left-handed super-helical quaternary structure, onto which the four ForC subunits are bound. Local disruption of the ForE tetramer creates a wider vestibule with four openings on the sides (Fig. 1c, d and e), sealed by a V-shape motif formed by two consecutive α-helices of each ForC subunit (Fig. 1b, d and Extended Data Fig. 3). The cryo-EM map also revealed small openings at

the ForC-ForE interfaces. In these regions, additional features were observed, some of which also present in the XRC electron density map, yet to a lesser extent. (Fig. 1d and Extended Data Fig. 3). They were best modeled as glycerophospholipids that would act as seals to prevent solvent access to the vestibule.

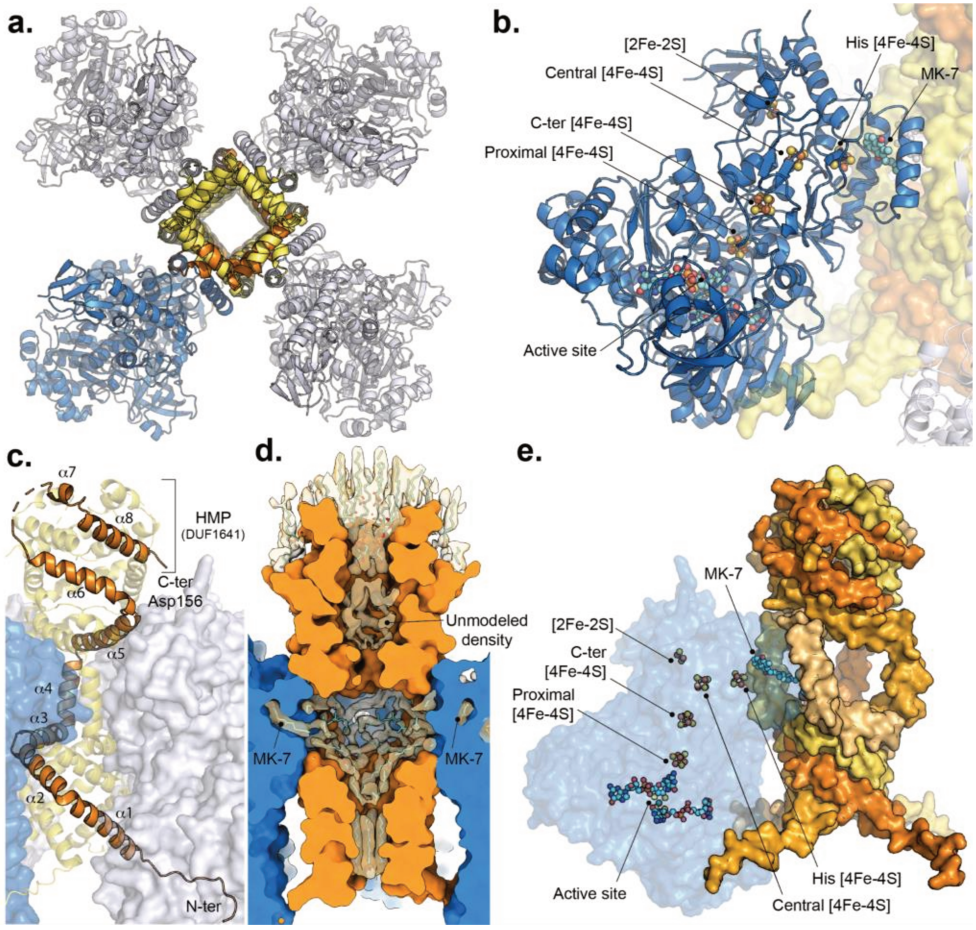


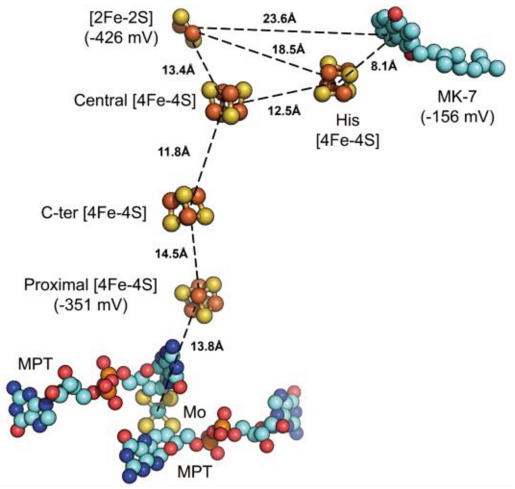
Fig. 1 *Bs*ForCE1 structure. a. Cartoon representation of the full ForC$_4$-ForE$_4$ complex obtained by XRC. One monomer of ForC and one of ForE are highlighted in dark blue and orange, respectively. The other ForC and ForE subunits of the complex are colored in light blue and yellow, respectively. **b.** Crystallographic structure of one monomer of ForC in cartoon representation with the V-shape motif binding the ForE tetramer. Menaquinone (MK-7), iron-sulfur clusters and the active site *bis*-pyranopterin guanosine dinucleotides coordinating the molybdenum ion are represented in ball and sticks with carbon, oxygen, nitrogen, sulfur, iron and molybdenum atoms colored in light blue, red, blue, yellow, brown and turquoise, respectively. **c.** Crystallographic structure of one ForE subunit in cartoon representation. Visible part of the HMP is indicated. **d.** Sagittal section of ForCE showing the presence of lipids inside the cavity created by ForE tetramerization. Cryo-EM models of ForC and ForE are represented in surface and colored in dark blue and orange, respectively. The remaining cryo-EM coulomb potential densities that are not explained by protein atoms, are displayed in semitransparent beige surfaces contoured at 3 σ. Lipids modeled in these densities are displayed in sticks with carbon, oxygen and nitrogen atoms colored in light blue, red and blue, respectively. **e,** Surface representation of the ForE tetramer colored in different shades of orange and of one ForC in blue semi-transparent surface.

The ForC catalytic subunit and the electron transfer chain

The overall structure of ForC is highly similar to the corresponding catalytic subunit of FDH from *Rhodobacter capsulatus*[8] or *Methylorubrum extorquens* AM1[9], with root mean square deviations of 1.13 and 1.42 Å, respectively. The N-terminal domain defines a peculiar electron connecting module[10], which hosts three [4Fe-4S] and one [2Fe-2S] clusters (Fig. 1b) and shows remarkable structural similarities (RMSD ranging between 1.2 and 1.79 Å) to the *Clostridium pasteurianum* FeFe-hydrogenase[11], *Thermus thermophilus* NADH quinone oxidoreductase, complex I Nqo3 subunit[12], *Hydrogenophilus thermoluteolus* NAD^+-reducing NiFe-hydrogenase HoxU subunit[13], and *Acetomicrobium mobile* electron bifurcating NiFe-hydrogenase HydA subunit[14]. The C-terminal domain harbors a fifth [4Fe-4S] cluster (Proximal in Fig 1b, e) and the Mo-*bis*PGD cofactor which serves as the site of formate oxidation. Strikingly, despite an overall similar fold with other FDHs, phylogenetic analyses indicate that various substitutions in this domain make ForC unique when compared to other FDHs (Extended Data Fig. 1b). One of them, the Q392 residue, whose equivalent position corresponds to an histidine residue in all other FDHs[7], is located at a maximal distance of 4.6 Å from the Mo atom, and R585 at 9.5 Å (Extended Data Fig. 4). While these two residues are markers of FDH activity, their exact roles are unknown. Molybdenum is coordinated by the two dithiolene groups of PGD, the conserved C391 residue and a sulfur ligand (Extended Data Fig. 4). The ForC His-coordinated [4Fe-4S] cluster faces the vestibule window behind the V-shape motif (Fig. 1b and e). Additional density observed near this cluster in each ForC subunit has been best modeled as a menaquinone-7 (MK-7) molecule. Remarkably, it has a full occupancy in both the crystal and cryo-EM structures (Fig 1d and e, Extended Data Fig. 3 and 5) which is consistent with previous work[7]. Although the hydrophobic tail of MK-7 cannot be entirely modeled due to partial disorder in XRC, the EM density indicates that all four MK-7 molecules point towards the vestibule and interact with other lipids inside (Fig. 1d and e). The MK-7 ring is inserted between two α-helices (residues 223–236 and 240–257) of ForC with a V-shape motif, which defines an opening connecting the menaquinone ring to the His-coordinated [4Fe-4S] cluster at 8.1 Å distance (Fig.1b). Both α-helices are amphipathic, orienting conserved polar residues towards the head of MK-7. For instance, the oxygen atom O1 establishes hydrogen bonds with the carboxyl group of ForC D237 residue and a water molecule, while atom O4 forms hydrogen bonds with the main chain amide and the Oγ1 atoms of the ForC T100 residue (Extended Data Fig. 5). The remaining surface of these helices display hydrophobic residues that interact with the ForE subunit.

The average distance between redox centers in the *Bs*ForCE1 structures falls within the range of 8.1-18.5 Å, which is compatible with rapid electron transfer from formate to MK-7 (Fig. 2a). EPR-monitored redox titration experiments enabled to determine the signature and redox potential of four of the five [Fe-S] centers and to assign the [4Fe-4S] cluster located near the Mo active site (i.e. the proximal [4Fe-4S]) and the [2Fe-2S] (Fig. 2, Supplementary Note 1 and Extended Data Table 1 and Fig. 6). The proximal [4Fe-4S], the [2Fe-2S] and the unassigned [4Fe-4S] Fe/S_2 are nearly isopotential, with values ranging between -350 and -426 mV (Fig. 2, Extended Data Fig. 6). The midpoint potential of the [2Fe-2S] cluster in *Bs*ForCE1 (-426 mV; Fig 2) is significantly lower from the one measured in the *Cupriavidus necator* FDH (-305 mV)[15] or in the *R. capsulatus* FDH (-264 mV at pH 9.0)[16]. Interestingly, this cluster is not the final electronic relay in *Bs*ForCE1 as it is too far from the quinone binding site (23.6 Å, Fig. 2a) in contrast to other FDHs[8,9]. However, this cluster is strictly conserved in all ForC sequences but its exact role remains to be determined (Extended Data Fig. 1a).

a.



b.

	***g* tensor characteristics**[a]	**Midpoint Redox potential (mV)**[b]
Fe/S_1 [4Fe-4S]	$g_{1,2,3}$ = 2.065, 1.889, 1.820 g_{av} = 1.925, Δg = 0.245	-235 (pH 6.0) -290 (pH 7.5)
proximal [4Fe-4S]	$g_{1,2,3}$ = 2.044, 1.944, 1.893 g_{av} = 1.960, Δg = 0.151	-288 (pH 6.0) -351 (pH 7.5)
Fe/S_2 [4Fe-4S]	$g_{1,2,3}$ = 1.996, 1.965, 1.88-1.90 g_{av} = 1.95,Δg = 0.11	-379 (pH 7.5)
[2Fe-2S]	$g_{\|\|,\perp}$ = 2.018, 1.937 g_{av} = 1.964, Δg = 0.081	-426 (pH 7.5)
S = 3/2 proximal [4Fe-4S]	$g_{eff\,1}$ = 5.45 ± 0.01, $g_{eff\,2}$ = 5.19 ± 0.01	-275 ± 20 (pH 6.0)

Fig. 2. ForC electron transfer chain. a. Distances between MK-7, [Fe-S] clusters and the Mo/W-*bis*PGD in one ForC subunit. MK-7, [Fe-S] clusters and the active site are represented in balls and sticks with carbon, oxygen, nitrogen, sulfur, iron and molybdenum atoms colored in light blue, red, blue, yellow, brown and turquoise, respectively. Midpoint potential of MK-7 has been determined in[7] and others as follows. **b.** EPR *g* values and redox potentials (mV vs SHE) for [Fe-S] clusters of *Bs*ForCE1. EPR-monitored redox titration experiments were carried out at two different pHs, i.e. 6.0 and 7.5 (Supplementary Note 1 and Extended Data Fig. 6). The proximal [4Fe-4S] most probably presents a mixture of S = ½ and S = 3/2 spin states (Supplementary Note 2). [a] average *g* value g_{av} = ⅓ (g_1+g_2+g_3) or g_{av} = ⅓ ($g_{\|}$ +2$g_{\perp}$), *g* tensor anisotropy Δg =g_1-g_3, uncertainty on *g* values is typically ± 0.0005, unless otherwise specified, g_{eff} is an effective *g* value. [b] uncertainty is typically ± 10 mV, unless otherwise specified.

The ForE hydrophobic tube is ended by a Helical Membrane Plug-in

The structure of the ForE tetramer defines a 95 Å long square-tube with side and diagonal dimensions of about 20 and 30 Å, respectively. The N-terminal end of the ForE tetramer can be best described as a frayed braided rope (Fig. 1e). Residues 2-14 correspond to the four frayed strands, each intertwining with one ForC subunit, probably preventing unintended motions and adding rigidity to the whole $ForC_4E_4$ structure (Fig. 1c, e). Helices 1–3 of the four ForE subunits delineate the N-terminal end of the tube. Helices 4 from each ForE monomer introduce a break in this super-helical structure and define a broader vestibule with four windows where the four ForC subunits are plugged (Fig. 1c, e). Helices 5–8 correspond to the second intertwined super-helical region that defines the second part of the tube. At the C-terminus, residues 120–155 correspond to the Domain of Unknown Function 1641 (DUF1641). The first seven residues of this domain are missing in both the XRC and cryo-EM models, most likely due to disorder. Yet, the other residues are clearly visible in both structures, where they define α-helices 7 and 8. Interestingly, to end the tube, helices 8 do not follow the same super-helical structure but instead loop back into the tube mesh below helices 7, resembling a knit stitch. This likely contributes to locking and stabilizing the tube structure. After this module, the last non-conserved residues (158 to 186), predicted to be intrinsically disordered, are not observed in both structures. This ForE structure is highly reminiscent of the one of the HucM subunit of the [Ni-Fe] hydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*[17]. In the latter, four HucM subunits also define a large super-helical tubular structure, onto which eight catalytic subunits (four dimers of HucSL protomer) are bound *via* an amphipathic helix (Fig. 4b). This HucM structure was predicted to interact with the membrane[18]. Yet, out of the 188 amino acids of HucM, only residues 20–79 could be modeled into the cryo-EM maps.

The ForE tetramer constitutes the structural core that holds the whole *Bs*ForCE1 structure, while the four ForC subunits do not interact with each other (Fig. 1a). Strikingly, whereas the external surface of the tube is hydrophilic, as can be seen in Extended Data Fig. 3e, the inside of the tube is entirely lined up with hydrophobic residues, resulting in a lipophilic surface throughout its entire length. In both the XRC and cryo-EM experimental maps, the N-terminal end of the tube is not empty; instead, it is filled with long features that were best modeled as four aligned fatty acids (Fig. 1d, Extended data Fig. 5). Strikingly, the lipophilic tails point inward the tube, while the carboxyl groups are located at the entrance, pointing toward the surface. This configuration, reminiscent of lipid monolayers, likely acts as a barrier to prevent solvent access inside the tube. Remarkably, in the cryo-EM map, the C-terminal end of the tube is capped by elongated features that were also modeled as additional fatty acids, (Fig. 1d and Extended Data Fig. 3). The lack of such lipid cap in the XRC structure most likely results from crystal packing contacts in this region that induced release of the lipids (Extended Data Fig. 5). The outward-facing α7 helices at the tube terminus consist of hydrophobic and basic residues, hence facilitating interaction between these lipids and the protein (Extended Data Fig. 5). Therefore, this unique structural arrangement combined with the presence of a lipid layer suggests that the DUF1641 function is to connect the FDH to the membrane and to provide access to the membrane menaquinone pool. Therefore, we propose to rename it as Helical Membrane Plug-in domain (HMP).

The Helical Membrane Plug-in is essential for linking formate oxidation to the respiratory chain

We next probed whether ForCE is connected to the membrane quinone pool in a respiratory electron transfer chain in *Bacillus subtilis*. Noteworthy, *B. subtilis* contains two copies of the *forCE* gene tandem, named *forCE1* and *forCE2*[7]. The ForC sequences share 61% of identity and both ForE1 and 2 contain a highly similar HMP domain. Oxygen consumption of a *B. subtilis* cells suspension was monitored using an oxygen electrode following sequential injection of formate into an O_2-saturated buffer (Fig. 3a). Formate addition led to a significant increase in the O_2-consumption rate in the wild-type strain, demonstrating that electrons derived from formate oxidation indeed contribute to the reduction of O_2. Furthermore, this behavior was almost abolished upon addition of KCN or HQNO, common inhibitors of oxygen reductases and quinone-reacting enzymes, respectively (Extended Data Fig. 2b, c). Moreover, there was no increase in the rate of O_2 consumption in the *ΔforC2* and the *ΔforC1ΔforC2* strains demonstrating that, under these conditions, formate oxidation and O_2 consumption are mainly coupled by ForCE2. Next, *forCE1* was overexpressed using an inducible promoter. As expected, in the absence of *forC2* and the inducer (pForCE1-), there was no increase in O_2 consumption. However, in the presence of the inducer (pForCE1+), the addition of formate led to a two-fold increase in the rate of O_2 consumption highlighting that ForCE1 can supplement the lack of ForCE2 in coupling formate oxidation to O_2 reduction (Fig. 3a). We further assessed the role of the HMP, either completely removing it (ΔHMP) or altering helix 7 amphipathic character (F128D and R132D double mutation). In both cases, the addition of formate did not result in any change in the rate of oxygen consumption, despite the production of a stable and active complex (Fig. 3b, Extended Data Fig. 2, Supplemental Table 4). This demonstrates the key role of the HMP in coupling formate oxidation catalyzed by the ForC subunit to the oxygen consumption taking place in the membrane. This observation, combined with our structural data, strongly supports that HMP, due to its amphipathic character, is responsible for the interaction of the ForCE complex with the membrane.

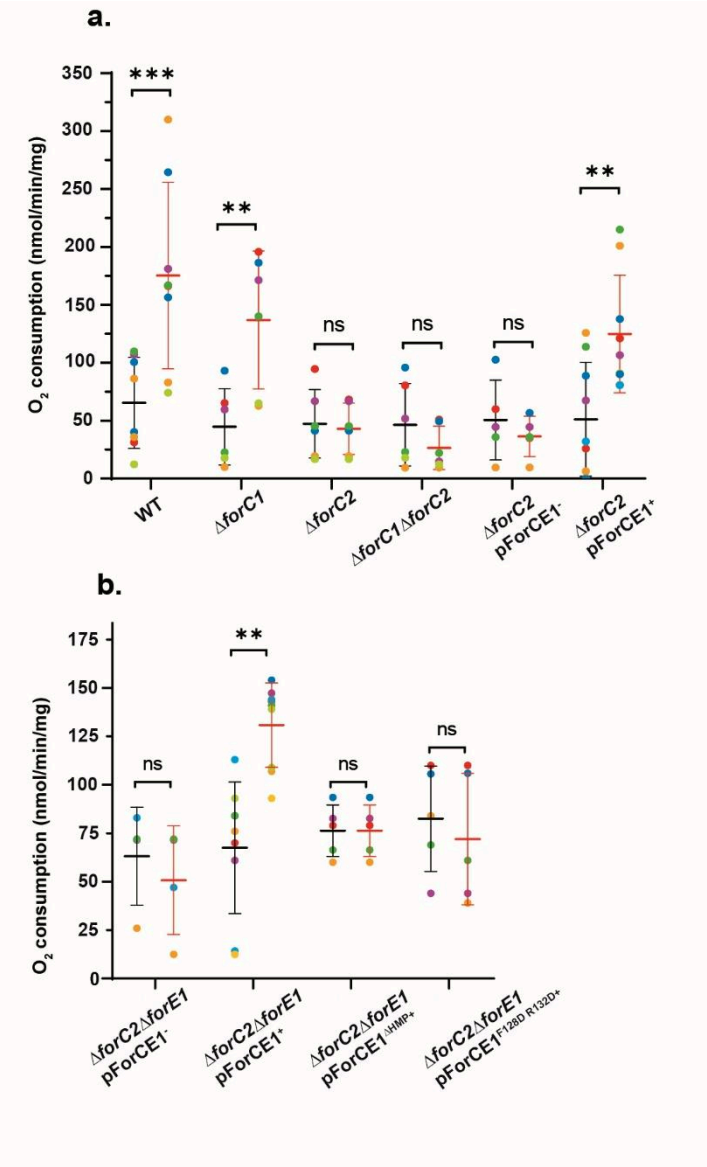


Fig. 3: ForCE is connected to the membrane quinone pool through HMP. a. ForCE1 and ForCE2 are part of the aerobic respiratory chain. WT, *ΔforC1, ΔforC2, ΔforC1ΔforC2* were cultured with formate and *ΔforC2* transformed with pForCE1 with (+) or without (-) 0.8% xylose as an inducer. **b.** HMP connects ForCE to the respiratory chain. *ΔforC2ΔforE1* strain transformed with pForCE1, pForCE1$^{\Delta HMP}$ and pForCE1$^{F128D\text{-}R132D}$ were grown with (+) or without (-) 0.8% xylose. For each strain, O_2 consumption was measured using an oxygen electrode before (black bars) and after (red bars) the addition of formate in the O_2-saturated buffer. Each dot is color-coded according to technical and biological replicates it came from. For each condition, average values (horizontal bar), standard error of the mean (errors bars), and P value (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant) were calculated. Statistical analysis was performed using a Sidak's multiple comparison test considering pairwise of each color-coded replicates.

A functional unit to wire electrons between multiple oxidoreductases and the quinone pool.

We next explored the diversity of HMP- (DUF1641-) containing protein family which represents 4092 sequences from bacterial and archeal phyla. Sequence Similarity Network (SSN) and Genome Neighborhood Network (GNN) analyses allow to pinpoint possible relationships among evolutionarily related proteins, considering their genomic context (Fig. 4a). Our analysis revealed four distinct genomic arrangements, labeled types I to IV. In all of them, the oxidoreductase encoding gene is found in synteny with another gene that contains a sequence encoding for the HMP. These oxidoreductases are predicted to catalyze low redox-potential reactions and all share quinone as electron acceptor. Type I is the most common arrangement, which features a gene encoding for a molybdoenzyme upstream of the HMP encoding gene and is best illustrated by the ForCE enzymes from *B. subtilis*. Type II arrangement corresponds to the gene encoding the NADH:quinone oxidoreductase (NDH-2)[19] located downstream the HMP gene. Type III cluster gathers a sequence encoding a sulfide:quinone oxidoreductase (SQR)[20] upstream the HMP gene. Type IV arrangement is exemplified by the *hucMSL* genetic organization and features genes encoding a [Ni-Fe] hydrogenase[17]. In each arrangement, different patterns of clustering suggest divergent evolution which is further supported by a separate clustering of archaeal and bacterial systems in arrangement I, III and IV (Extended Data Fig. 7). Finally, we observed that the sequence length of the HMP subunit is also an important factor in the clustering, as sequences in a given cluster tend to have a homogeneous size (Extended Data Fig. 7).

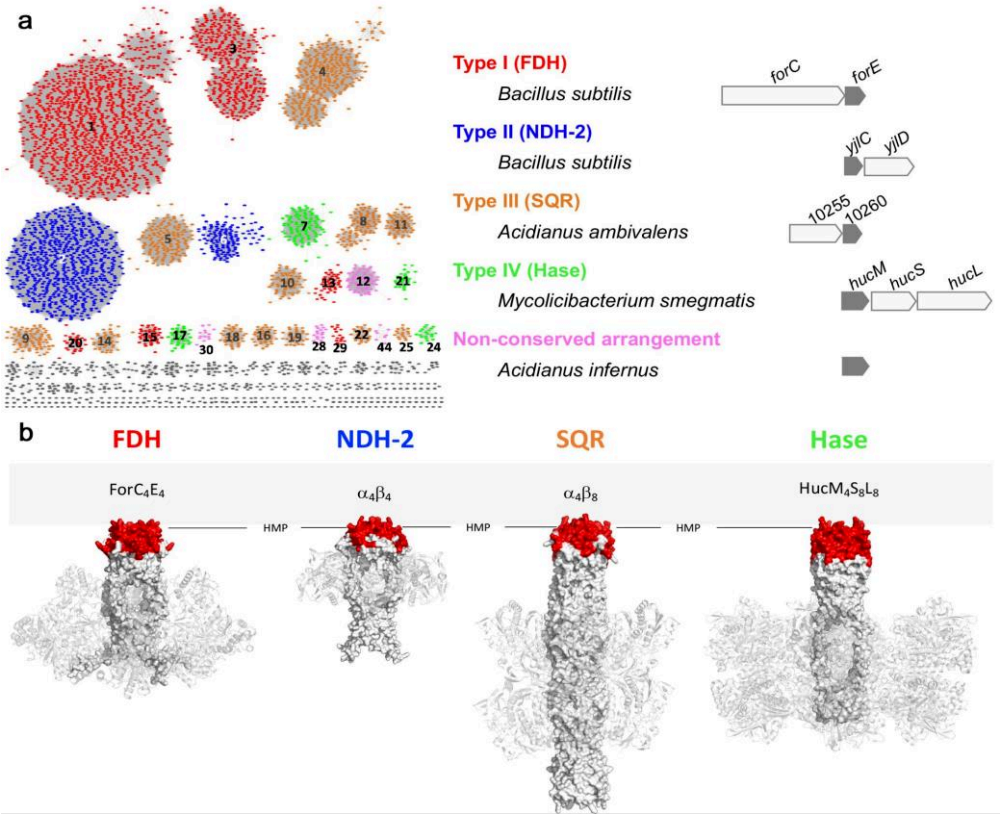


Fig. 4: SSN and GNN analyses of the HMP/DUF1641 family identify four types of functional arrangements. a. SSN of the Interpro IPR012440 (DUF1641) family of sequences using a threshold of 30. The main clusters are numbered based on the number of nodes/sequences they

group and are color-coded according to the gene synteny. Cluster 6, with a synteny indicating that it belongs to the type II organization but a MSA consistent with a SQR family (ie type III). GNN along with MSA predicted four types of functional arrangements (labeled Type I to IV) with synteny with a molybdoenzyme (I), an NDH-2 (II), a SQR (III) or a two-subunit hydrogenase (IV). **b.** A conserved structural unit to build four quinone oxidoreductases: The Formate dehydrogenase ForCE (this work), the NADH dehydrogenase NDH-2 (alpha-fold modeling), the Sulfide Quinone Oxidoreductase SQR (alpha-fold modeling) and the Hydrogenase Huc[17]. These diverse bioenergetic systems use a tube-like structure to connect the membrane through the HMP domain (colored in red) with the catalytic subunits (represented as transparent cartoons). Overall, these arrangements allow the long-distance connection of quinones with different redox centers.

Discussion

To overcome the challenge of transporting electrons between a hydrosoluble compartment and the membrane quinone pool, Life has evolved the Helical Membrane Plug-in. Interestingly, this module allows several quinone reductases to interact with the membrane and to access the quinone substrate. In this work, this mechanism has been thoroughly studied using the non-canonical FDH, the ForCE enzyme. Remarkably, among the wide family of Mo/W-*bis*PGD enzymes, ForCE is the first monotopic membrane protein to be characterized. The structure of *Bs*ForCE1 reveals its unique nature for its ability to interact with the membrane amongst a scant (~0.06%) of non-redundant monotopic structures[21]. In the cell, ForCE is a respiratory complex which couples formate oxidation with oxygen consumption, indirectly participating in the generation of the proton-motive force. Thus, ForCE emerges as a full-fledged player in the respiratory chain of *Bacillus subtilis*. The small ForE subunit possesses a distinctive quaternary structure characterized by the entanglement of the four chains, forming a 95 Å long helical hydrophobic tube. This tube likely serves as a conduit to transport the lipophilic menaquinone to the electron transfer chain of the catalytic ForC subunit located in the cytoplasm. At the top of the tube is a HMP structural module responsible for the interaction between ForCE and the membrane. The HMP is, in fact, a small structural motif with a distinctive fold, widely found in bacteria and archaea. It exhibits an amphipathic profile, enabling it to interact with both hydrophobic and aqueous environments. This feature enables it to serve as a junction, thereby facilitating the connection between the two cellular compartments. The sequence encoding for the HMP is exclusively observed in genes associated with oxidoreductases such as FDH, [NiFe]-hydrogenase, NDH-2, or SQR. Evolution has repeatedly used the HMP to build several enzymes that share the same function. This plug-in enables these enzymes to utilize the reducing power generated at their catalytic subunits to reduce quinones and thus converts them into quinone reductases. The mechanism by which the quinone is extracted from the membrane to diffuse into the channel following the HMP motif remains to be determined. However, the identification of such a motif increases the repertoire of the potential interconnections between redox processes in bioenergetic pathways. The existence of the HMP suggests that other, yet unidentified, structural domains may soon be added to the list of interaction modules between proteins or between cellular compartments. Such domains allow for greater integration of different metabolic pathways contributing to the functioning and adaptation of organisms to their environment. We can envision harnessing the unique qualities of the HMP domain for biotechnological innovations, taking advantage of the plug and play character of the HMP to connect function to different compartments

Methods

Bioinformatic analysis

To compute a sequence similarity network (SSN), we have used the InterPro family IPR012440 as an entry to the EFI-EST interface, with a threshold of 30, which corresponds to the recommended value observed at 35 to 40% pairwise identity within the family. The resulting network was visualized using Cytoscape and the organic layout. We then employed the Genome Neighbourhood Network (EFI-GNN) analysis tool in conjunction with multiple sequence alignments (MSA) to evaluate the thirty most important clusters (comprising over 85% of the nodes).

MSA analysis for Type II and III arrangements

In Type II and III arrangements, the gene located downstream and upstream of the HMP gene, respectively, encodes a pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (Pyr_redox_2 family). Members of this family catalyze various types of reactions and are characterized by two Rossmann fold domains, which bind FAD and a pyridine nucleotide or hydrogen sulfide in the case of the sulfide dehydrogenase family[22]. To understand the differences between Type II and Type III arrangements, we collected representative sequences from each cluster (167 sequences (Supplemental Table 5) with distinct genus in clusters 2, 4-6, 8-11, 14, 16, 18-19, 22 and 25) and performed sequence alignments using ClustalΩ from (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/clustalo) with default parameters. Type II corresponds to sequences that contain FAD, NADH, and quinone binding consensus motifs defining NADH:quinone oxidoreductases (NDH-2)[19]. In contrast, Type III gathers sequences that lack the NADH binding motif but harbors a two-cysteine motif usually found in sulfide:quinone oxidoreductases (SQR)[20].

Crystallization, data collection and structure determination

Crystallization of *Bs*ForCE1 was performed under anaerobic conditions inside a glovebox following the procedure described previously[23]. Sitting drops were prepared by mixing 1 µL of a 30 mg. mL^{-1} protein solution with 1 µL of 1.5 M sodium malonate pH 7 reservoir solution and equilibrated in the vapor phase against 1 mL of the latter. Reproducible crystals appeared after a few days. The crystals were cryo-protected using 2 M sodium malonate pH 7 and 30 % glycerol and were subsequently flash-cooled in liquid propane inside the chamber[23]. X-ray diffraction data were collected at beamline ID23-2 of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). Data indexation was carried out using XDS[24] and because of the high anisotropy (Extended Data Fig. 8) subsequently with STARANISO (Supplemental Table 1)[25]. The crystal structure was determined by molecular replacement using a previously built inhouse model and Phaser software[26]. The atomic coordinates of the final model and diffraction data have been deposited to the Protein Data Bank (code: PDB-8RQZ).

CryoEM grid preparation under anaerobic conditions

CryoEM grids (QUANTIFOIL® grids Cu/Rh300 mesh, R 2/1) were glow-discharged for 45 s at 30 mA under low vacuum before being introduced in a custom-made glovebox (JACOMEX) housing a Vitrobot Mark IV freezing system (FEI). In order to prepare the *Bs*ForCE1 cryoEM grids under anaerobic conditions, we used the same protocol as was previously described[27]. Four µL of protein solution at 0.3 mg/ml were applied to the grid, which was then blotted and flash-cooled in liquid propane. The Vitrobot was set to operate at 22 °C and 100% humidity (blotting time 2 s; blot force

1). The same protein sample batch as that used for the crystallization experiments was used to prepare the grids, without any further processing.

CryoEM data acquisition and image processing

*Bs*ForCE1 data were collected on a Glacios cryo electron microscope (Thermo Fisher Scientific) operating at 200 KV, at a nominal magnification of 36,000 × ([MC1] corresponding to 1.1 Å/pixel at the specimen level), with a defocus range of -0.5 to -3.5 µm. Movies were recorded using a K2 summit (Gatan) direct electron detector operating in counting mode with the SerialEM software[28]. A series of 4 977, 40 frame-movies were collected with a total dose of 40 electrons Å−2 (Supplemental Table 2).

*Bs*ForCE1 reconstruction was performed using cryoSPARC 3.3.2.[29]. Each Phemovie was first drift-corrected (frame 2 to 40) for full-frame motion and sample deformation, then CTF was estimated. ForCE crystal structure has been used to generate 2D projections subsequently used as templates to perform an automated picking of the particles on the micrographs. 2 825 725 particles were extracted and 2D sorted. The best classes, obtained from 153 476 particles, were selected and used to calculate three *ab-initio* 3D models subsequently used for a last step of particles curation using an hetero refinement job. 112 095 particles were then used to calculate a first 3D reconstruction. Sharpening of the corresponding coulomb potential density map, using a B-factor value of -124.5 $Å^2$, led to a map at 3.40 Å resolution. Subsequently, refinement of the global CTF was performed and the final map was sharpened, using a B-factor value of -119.5 $Å^2$, leading to a 3.35 Å resolution map using the FSC 0.143 cutoff criteria. C4 symmetry was applied in all the 3D-refinement steps. Finally, the local resolution of the reconstruction was estimated using cryoSPARC procedure.

Model building in the CryoEM maps

The *Bs*ForCE1 crystal structure was used as a starting model and was fitted into the cryoEM density map as a rigid body using one ForC and one ForE monomers. The tetramer was then generated using the C4 symmetry observed in the complex. Several iterative cycles of manual modification using COOT[30] and refinement with PHENIX[26] were necessary to model the complete structure into the reconstructed cryoEM density map. For the first cycle only one monomer of ForC and one monomer of ForE were reconstructed. Then, using the C4 symmetry, the full protein was refined. Residues that did not match the reconstructed cryoEM density map were removed from the model. The water molecules that were visible in the cryoEM map and present in the reference crystal structure were added to the model (Extended Data Table 3). Density corresponding to the naphthoquinone part and the beginning of the isoprenoid chain of MK-7 was clearly visible and modeled. The rest of the isoprenoid chain was less clear, perhaps because it can adopt multiple positions, but one possible conformation was modeled. Most of the remaining unexplained densities could be interpreted as lipids. Nevertheless, a few densities remained uninterpretable. The atomic coordinates and the corresponding cryoEM map have been deposited to the PDB and EMDB, respectively (codes: PDB-8RR0 and EMD-19452).

Figures of structures were generated using ChimeraX[31] and PyMol(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC)

Bioinformatic analysis

Protein representatives of the FDH family whose enzyme function has been previously elucidated by biochemical or structural methods[7,32–35], were used as bait for BLAST queries to construct a comprehensive library of sequences, filtered to include an amino-terminal electron connecting

module. When sequences are more than 90% identical, only one sequence is retained. As such, a total of 442 sequences were obtained (Supplemental Table 6) and further analyzed as detailed below. The sequences were aligned using the ClustalW module from Geneious 10.2.6 (https://www.geneious.com/) with default parameters. To account for the highly variable N-terminal electron connecting module (containing multiple cofactor binding motifs), structure-informed alignment was necessary. Essentially, available structural data from the FDHs from *R. capsulatus* (PDB-ID 6TGA) and *M. extorquens* AM1 (PDB-ID 7vw6) was enriched with AlphaFold2 model predictions[36] of distinct representatives of the dataset and structurally aligned by PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). The multiple sequence alignment of the N-terminal region was manually adjusted based on the structural alignments described above. The resulting alignment was further processed to extract the alignment corresponding to the conserved C-terminal domain (trimmed 2 amino acids before the first coordinating cysteine residue of the iron-sulfur cluster binding motif and containing the Mo/W-*bis*PGD cofactor binding motif) and that corresponding to the highly variable N-terminal domain. Each of the three alignments was then used to construct a maximum likelihood phylogenetic tree using IQ-TREE web server (http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/)[37] with automatic best-fit substitution model selection[38] and the model tree was refined using ultrafast bootstrap and 1000 replicates[39]. Tree representation were prepared using iTOL v6 (https://itol.embl.de/)[40] and manually annotated.

Growth conditions and purification procedures

B. subtilis 3610, *B. subtilis* 3610 *comI*^{Q12L}, 168 (*trpC2*) and its derivatives were grown at 37°C, under rotary shaking at 180 rpm, in LB[7], M9[41] or CE[42] minimal medium. 12.5 mM sodium formate or 0.8% xylose (at OD_{600} ~ 0.3) were added when specified. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: spectinomycin (100µg. mL^{-1}), kanamycin (10µg. mL^{-1}), and erythromycin (1.25µg. mL^{-1}). For O_2 consumption experiments, after isolation on LB agar plates, cells were grown in LB medium until stationary phase. When necessary, cells were adapted to M9 medium by being diluted 500-fold in fresh medium and grown overnight. Cultures in M9 or CE minimal medium were then inoculated at OD_{600} = 0.05 with the previous M9 or LB pre-culture respectively and cultivated until mid-exponential phase (OD_{600} ~ 1). For overproduction of recombinant proteins, cells were cultivated according to[7]. Purification procedures were as in[7] with the only difference being that we have worked inside an anaerobic chamber, with an atmosphere of 95.5 % N_2 and 4.5 % H_2, at room temperature.

O_2 consumption measurements

O_2 consumption measurements were performed by polarography with a Clark type electrode at 37°C. Cells collected at OD_{600} ~ 1 were washed out 3 times in M9 buffer (medium devoid of glucose and formate), concentrated, and added to the oxygraph chamber containing 1.8 mL of air-saturated M9 buffer. Variations of O_2 concentration were recorded before (*i.e.* with endogenous substrates) and after addition of 16 mM formate. When specified, 0.16 to 7.6 mM KCN and 1.29 to 7.73 µM HQNO (*N*-oxo-2-heptyl-4-hydroxyquinoline) were added. One hundred percent air saturation corresponded to 211.3 µM O_2 dissolved at 37°C. For data treatment, O_2 consumption is first normalized with the total protein concentration (nmol O_2.min^{-1}.mg^{-1}) (carried out by the Bradford assay supplemented with 0.1 N NaOH and using BSA as standard), and secondly normalized to 100% using the "before formate spiking" as reference. For the WT strain, 100% corresponds to 65 nmol O_2/min/mg. For the *ΔforC2ΔforE1* pForCE1$^+$ strain xylose-induced, 100%

corresponds to 85 nmol O_2/min/mg. Statistical analysis with three biological replicates was performed with GraphPad Prism software using the two-way ANOVA analysis and the Sidak test.

Strain construction

To generate *B. subtilis* (*BS*) 3610 *ΔforC1*, *ΔforC2* and *ΔforC1ΔforC2*, *BS* 3610 WT or *ΔforC1:kan* were transduced with phage SPP1 isolated from lysates of *BS* 168 *trpC2 ΔforC1:ery* (BKE12160), *ΔforC2:kan* (BKK27220), *ΔforC1:kan* (BKK12160) *and ΔforC2:ery* (BKE27220) respectively. To generate *BS* 168 *trpC2 ΔforE1ΔforE2* and *BS* 3610 *comI*^{Q12L}*ΔforC2ΔforE1*, *BS* 168 *trpC2* or 3610 *comI*^{Q12L} were respectively transformed with genomic DNA *ΔforE1:ery* (BKE12170), *ΔforE2:kan* (BKK27230), *ΔforC2:ery* (BKE27230), *ΔforE1:kan* (BKK12170), according to[43]. When specified, strains were then transformed with the corresponding plasmids (*pForCE1*, *pForCE1*$^{F128D-R132D}$ or *pForCE1*$^{\Delta HMP}$) or transduced with phage SPP1 isolated from lysate of *BS* 168 *trpC2 pForCE1,* at *amyE* locus. Strains used in this study are in supplemental Table 6.

Plasmid construction

Plasmids pForCE1$^{\Delta HMP}$ and pForCE1$^{F128D-R132D}$ were constructed by site directed mutagenesis using PCR. Respectively, pForCE1[7] was amplified with primers 2079 (5'AGAAATGATGAAACAGTGAAGAAAAGACAGGTT3') and 2080 (5'TGTTTCATCATTTCTGCTCTACAGCGCTTGC3') to introduce a stop codon before the gene region encoding the HMP/DUF1641 domain or with primers 2192 (5'CAGTGAAGAAAAGACAGGTTATGATGATATTATCGATTCGCTAAAAGACCCGGAA ATC3') and 2193 (5'GATTTCCGGGTCTTTTAGCGAATCGATAATATCATCATAACCTGTCTTTTCTTCACT G3') to substitute F^{128} and R^{132} codons by D codons. Primers used in this study are in supplemental Table 6.

SEC-MALS analysis

Analytical size-exclusion chromatography (SEC)-coupled to multi angle light scattering (MALS) profiles were recorded at 8 angles using a DAWN® laser photometer (Wyatt Technology) and differential refractometer (Optilab®, Wyatt Technology). 45 µL at 5mg/ml of *Bs*ForCE1 WT, *Bs*ForCE1$^{F128D-R132D}$ and *Bs*ForCE1$^{\Delta HMP}$ were applied to a Superdex 200 10/300 Increase column (Cytiva) equilibrated with 50 mM MES pH6.5 and 150 mM NaCl at a flow rate of 0.6 mL.min^{-1}. The data were analyzed using ASTRA 7.3.2.

EPR-monitored redox titrations

Redox titrations were carried out anaerobically at room temperature (about 25 °C) either in a glovebox or in an airtight vessel flushed with oxygen-free argon. Redox potentials were measured with a combined Pt-Ag/AgCl/KCl (3M) microelectrode and are given in the text with respect to the standard hydrogen electrode (SHE). Redox mediators were used at 10 µM final concentrations[7]. Reductive titrations were carried out by stepwise addition of an anaerobic sodium dithionite solution. Samples were anaerobically transferred into calibrated EPR tubes that were rapidly frozen.

X-band EPR spectra were measured on a Bruker Elexsys E500 spectrometer equipped with an ER4012ST rectangular cavity fitted to an Oxford Instruments helium flow cryostat. Numerical simulations of [Fe-S] EPR spectra were performed with the EasySpin package (release 5.0.12) using Matlab (The MathWorks, Inc., US)[55]. The individual contributions of magnetically isolated $S = ½$ $[4Fe\text{-}4S]^+$ clusters were calculated using a *g*-strain anisotropic linewidth model. The FWHM

widths of the uncorrelated Gaussian distributions of the *g* principal values are given in the Extended Data Table 2.
Potentiometric titration data of proximal [4Fe-4S], [2Fe-2S] and Fe/S_2 were analyzed using a n = 1 Nernst curve while that of Fe/S_1 [4Fe-4S] was fitted using a simplified model of two interacting centers as described in the Supplementary Note 3.

Acknowledgements

The authors are grateful to Elodie Foulquier-Khadaroo and Anne Galinier from LCB for providing protocols and advice for *B. subtilis* genetics and culture, Corinne Aubert and Béatrice Py from LCB for lending us the anaerobic chamber, Emilie Launay from CEA Grenoble for her contribution to the cryo-EM analysis, Géraldine Brandelet from BIAM for her contribution to the XRC analysis, Bertrand Legeret from BIAM, Hugo Le Guenno and Artémis Kosta from from the IMM microscopy facilities, AMU-CNRS, Marseille, France, the EPR facilities available at the Aix-Marseille EPR center, the Financial support from the IR INFRANALYTICS FR2054 for conducting the research, the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) for provision of synchrotron radiation facilities under proposal number mx2398, the local contact A. Gautam for assistance and support in using beamline ID23-eh2 (doi: 10.15151/ESRF-ES-925342287). This work was supported by the French National Research Agency in the framework of the Investissements d'Avenir program (ANR-15-IDEX-02) through the funding of the "Origin of Life" project of the Université Grenoble Alpes. This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), which is supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL and financed within the Université Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). The electron microscope facility is supported by the Auvergne-Rhône-Alpes Region, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA). IBS acknowledges integration into the Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG, CEA). This work was also supported by the French National Research Agency (ANR-22-CE44-0035-01), the CNRS and the CNRS Energy unit (Cellule Energie) through the project MICROBIOCO2. A. U. and M. B. were supported by a MESR fellowship and R.A-C by an ANR MOLYERE (ANR 16-CE29-0010-01) project post-doctoral fellowship.

Authors contribution

W. A., A-C. R., A. P., M. A., C. M. V., B. M and G. S. designed experiments. U.A., W. A., P. F., S. F., G. B., B. M., A-C. R., M. M. J., P. A., M. L., S. G., C. M. V., and G. S. performed

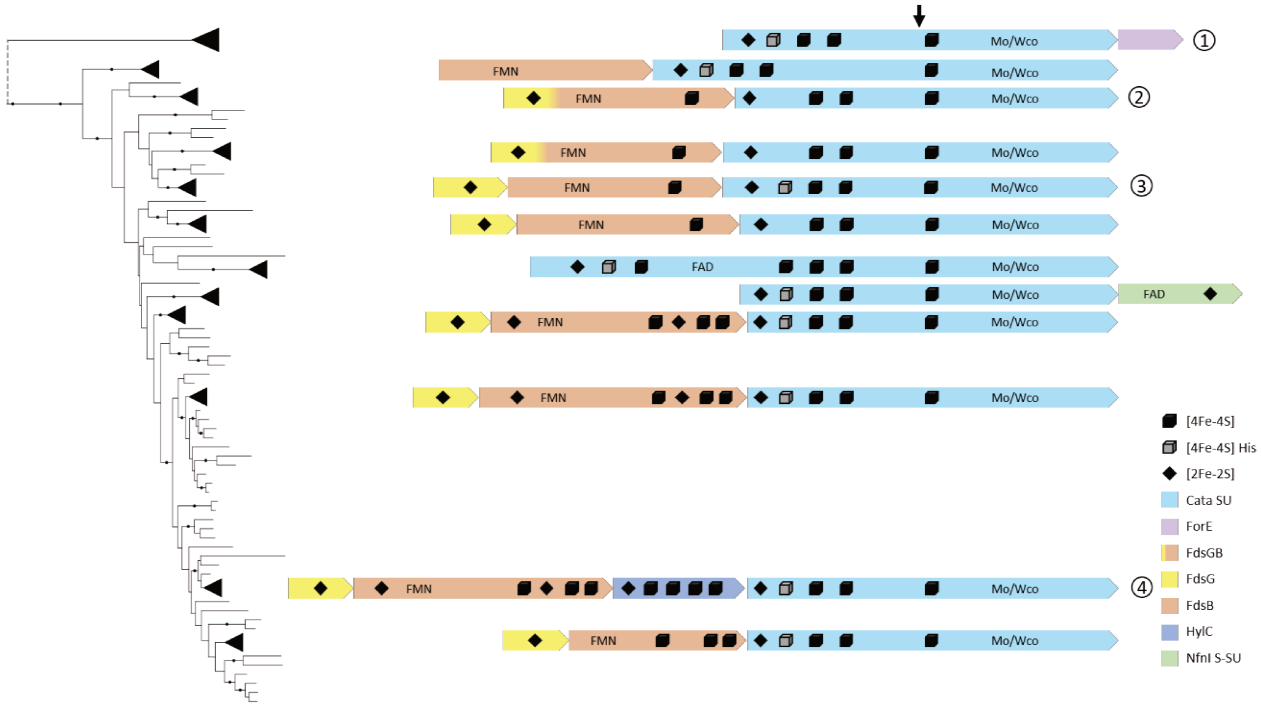
experiments. M. A., W. A., G. B., A-C. R., C. M. V., N. Y., B. M. and G. S., wrote, reviewed & edited manuscript. M. A., W. A., G. B., G. S. and N.Y. provided resources and obtained funding.

The authors declare that they have no competing financial and/or non-financial interests in relation to the work described.

Supplementary Information is available for this paper.

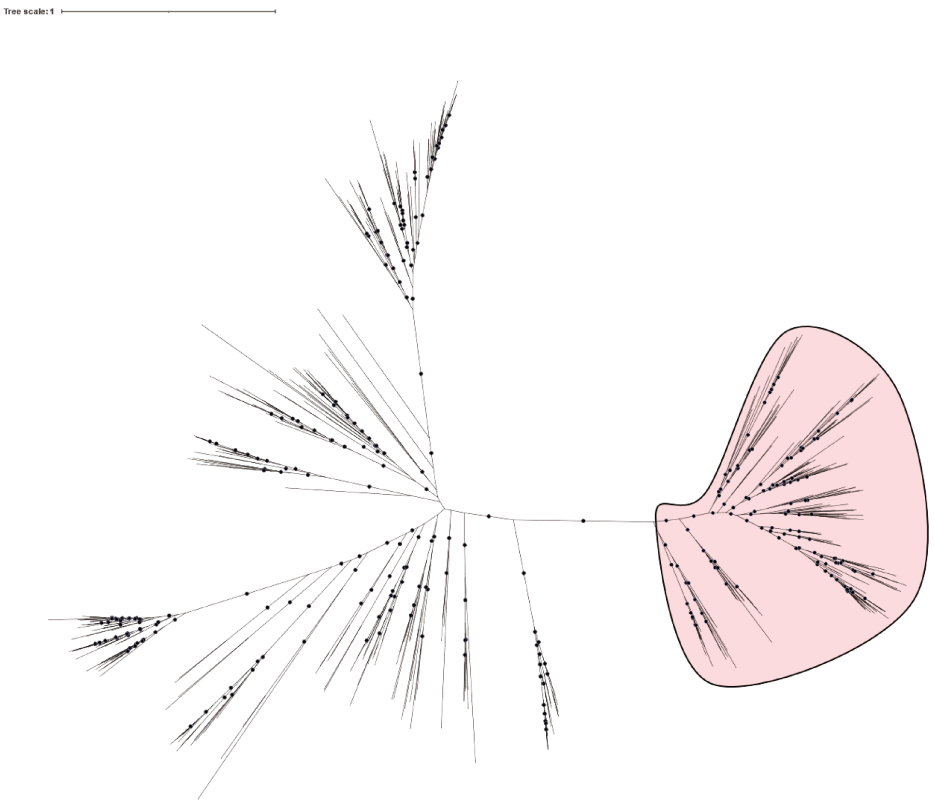
Correspondence and requests for materials should be addressed to anne.walburger@univ-amu.fr

551 **a.**



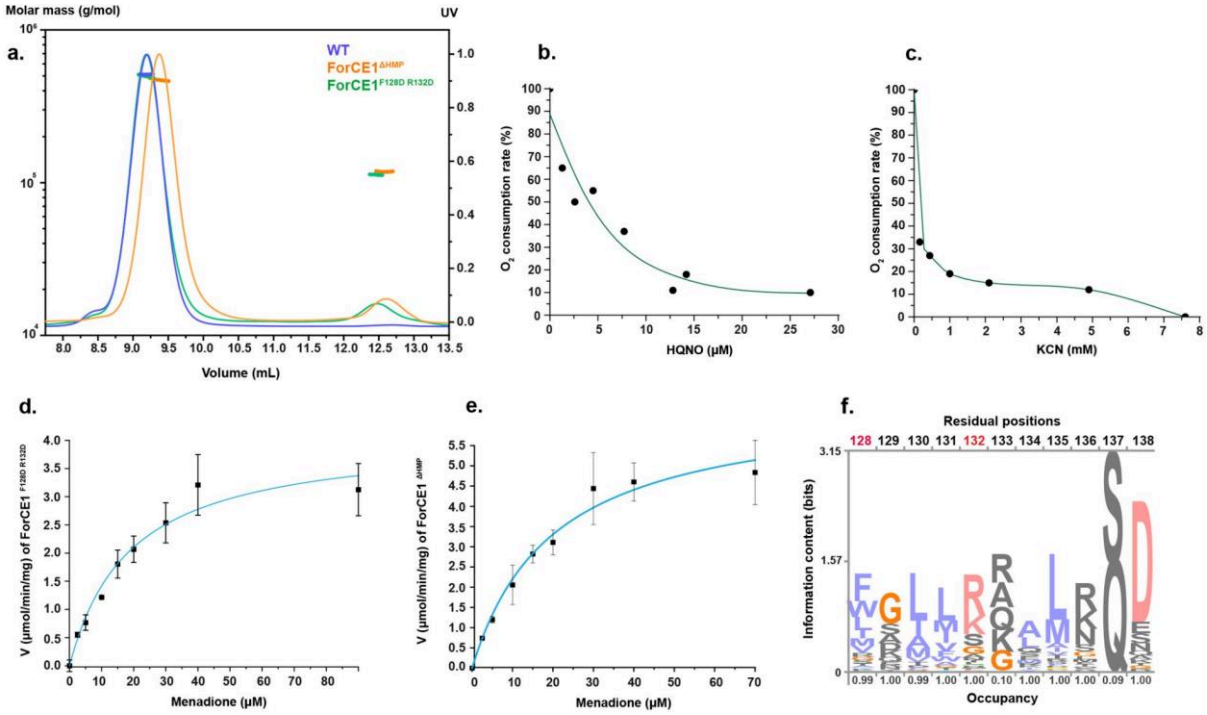
552

553 **b.**

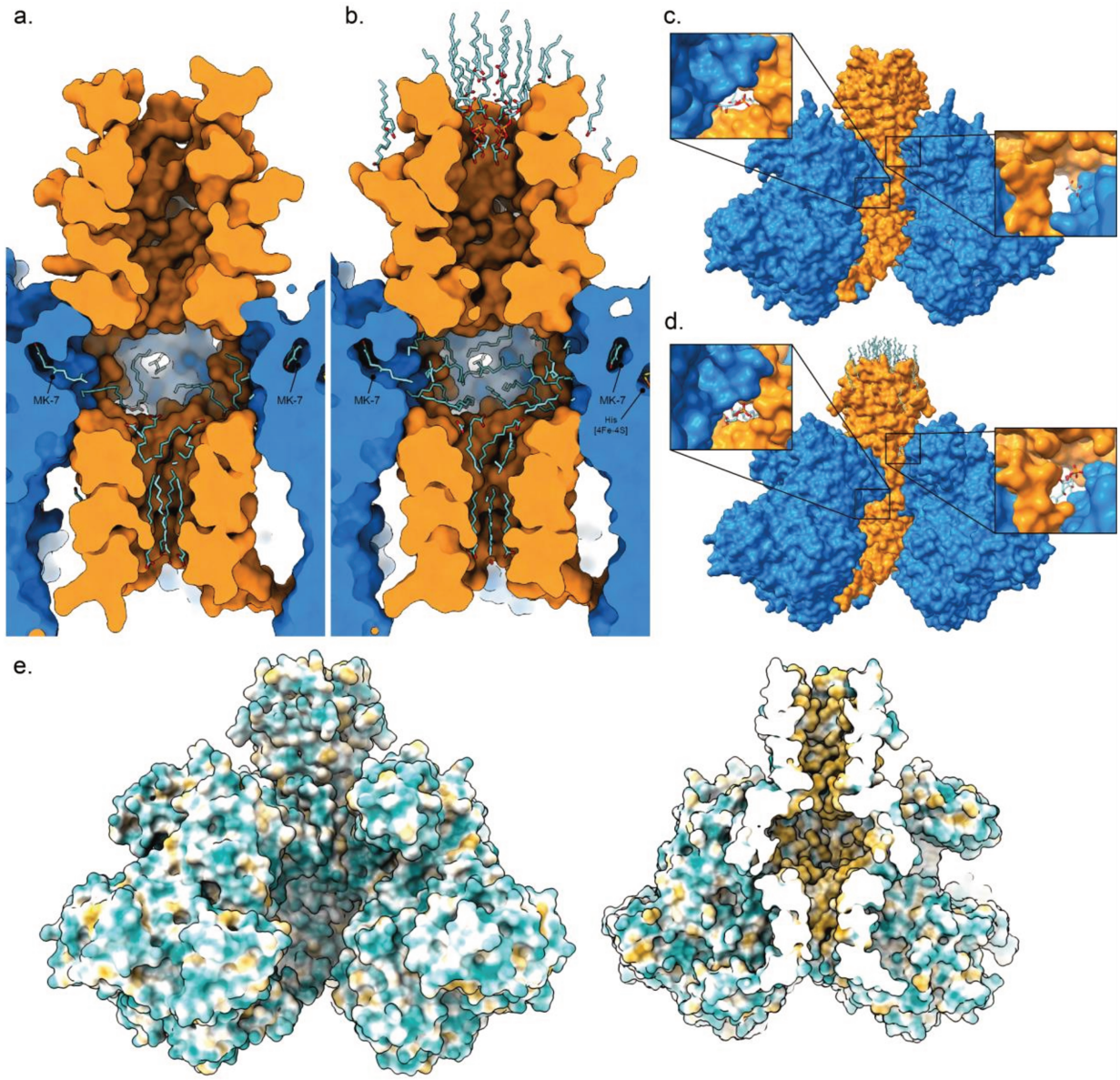


554

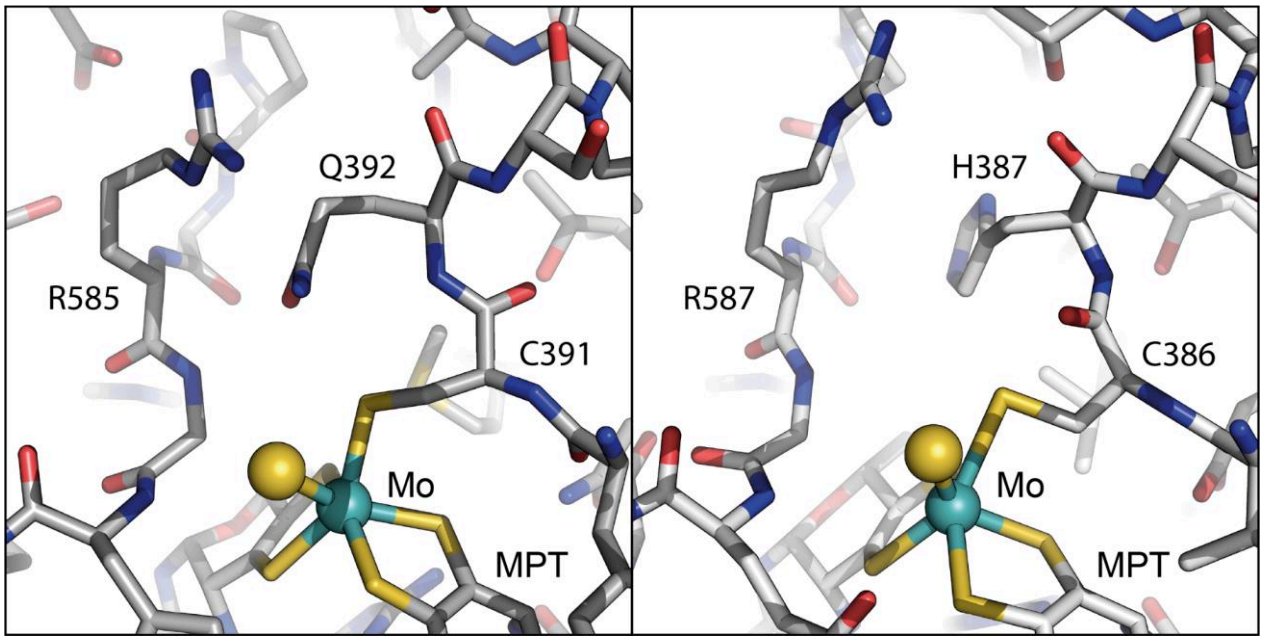
Extended Data Figure 1: In-depth bioinformatics analysis of FDHs with an N-terminal extension. a. Phylogenetic tree generated of the N-terminal domain of 442 metal-dependent FDH catalytic subunit sequences (Cata SU) using a maximum likelihood approach. Inter-sequence identity was reduced to a maximum of 90% between any two sequences. Sequences forming a clade have been collapsed. The presence of specific redox centers was deduced from the identification of conserved motifs in the primary amino acid sequence and the partner subunit(s) from the genomic organization. The arrow indicates the position at scale between the N-terminal extension and the C-terminal domain. Characterized representatives are indicated: *Bacillus subtilis* (1), *Methylobacterium extorquens* AM1 (2), *Rhodobacter capsulatus* (3) and *Gottschalkia acidurici* (4). **b.** Phylogenetic tree of the C-terminal domain of 442 FDH sequences using a maximum likelihood approach. Each branch tip represents a single sequence. ForC sequences are colored red. Both trees were built with IQ-TREE using the WAG+I+G4 model. Supports at nodes are ultrafast bootstrap values above 95% and are indicated by a black circle. iTOL 6.8.1 was used to generate the figures.



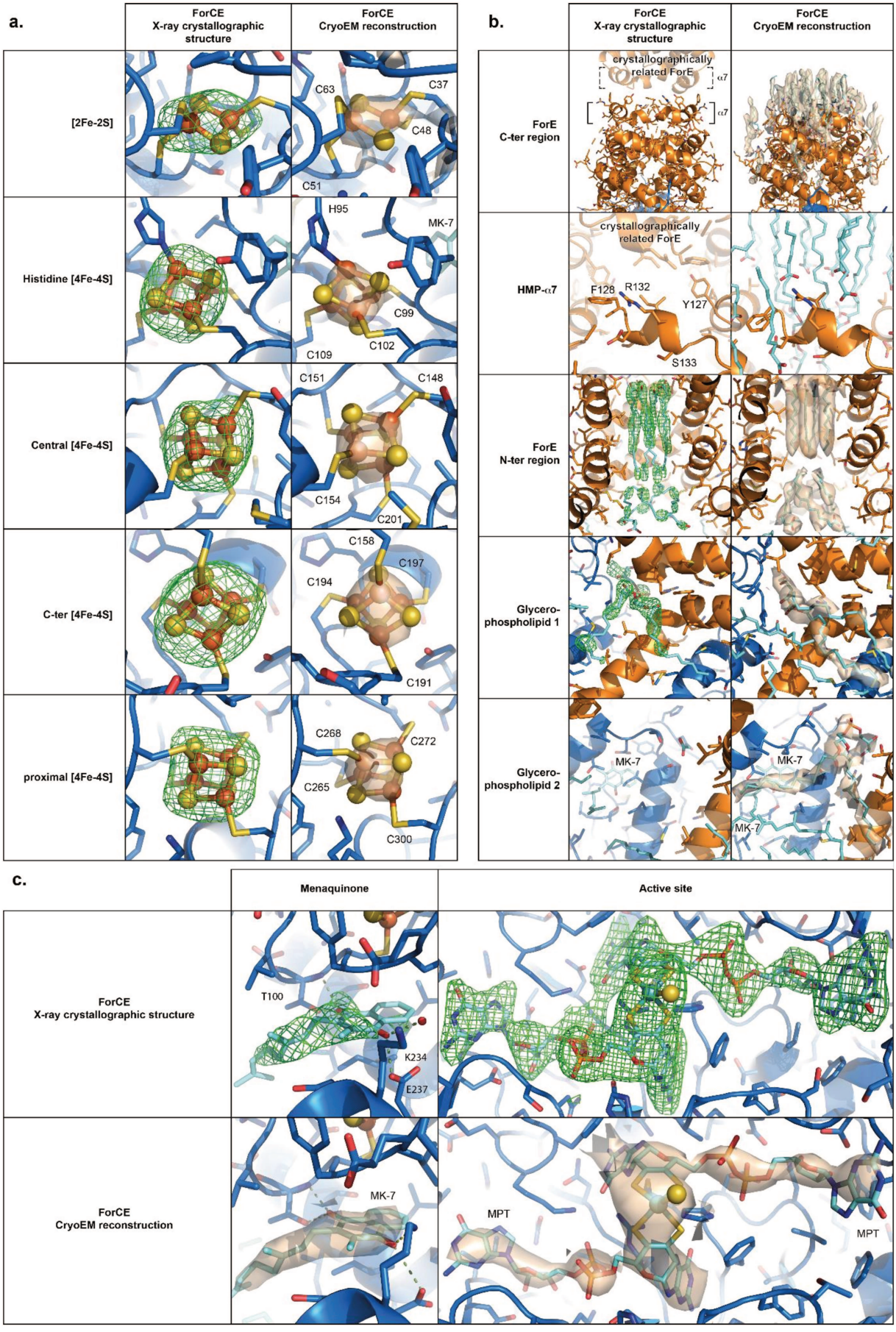
Extended Data Figure 2: Biochemical and cellular basis of formate:quinone oxidoreduction by ForCE. a. ForC and ForE form a complex with a 4:4 stoichiometry as shown by SEC-MALS analysis of *Bs*ForCE1 WT (blue curve), *Bs*ForCE1$^{F128D-R132D}$ (green curve) and *Bs*ForCE1$^{\Delta HMP}$ (orange curve). Left y-axis, molar mass; right y-axis normalized UV chromatograms, measured molar mass in coloured stars. For *Bs*ForCE1 WT and *Bs*ForCE1$^{F128D-R132D}$, complexes have a MW of 512 ± 1.5 and 495 ± 1.5 kDa respectively. For *Bs*ForCE1$^{\Delta HMP}$, the complex has a MW of 470 ± 1.9 kDa. In addition, two proteins of 117 ± 1.2 kDa and 111 ± 0.8 kDa could correspond to a monomer of ForC1. **b.** and **c.** Inhibition of the formate:O_2 consumption by respiratory chain inhibitors. WT strain was grown with 12.5mM formate. O_2 consumption was measured using an oxygen electrode after formate spiking, in presence of (b) 1.29 to 27.1 µM HQNO or (c) 0.16 to 7.6 mM KCN. 100% corresponds to 153 nmol O_2/min/mg. **d.** and **e.** Michaelis Menten plot of *Bs*ForCE1$^{F128-DR132D}$ and *Bs*ForCE1$^{\Delta HMP}$ coupling formate oxidation to menadione reduction *in vitro*. **f.** Conservation of hydrophobic and positively charged residues at the respective F128 and R132 positions in α7 helices from the DUF1641 family. Sequences from Interpro IPR012440 (DUF1641) family were clustered and restricted to 644 representatives using MMseqs2 (Many-against-Many searching, https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/mmseqs2) online software (minimum sequence identity>0.5; minimum alignment coverage>0.8). Then, multiple sequence alignment (MSA) was performed using Clustal Ω (default parameters). Finally, HMM logo was generated using http://skylign.org/ with the previously described MSA (from F^{128} to D^{132} using ForE1 sequence as reference). Each stack represents one residue position within the MSA. Height of a stack represents the conservation of this position. Height of a letter within a stack represents the frequency of the corresponding residue at this position. Occupancy (occ) represents the probability to observe a letter at one position (from 0 to 1). Residues are colored according to the ClustalX coloring scheme: Small or hydrophobic AA (purple), charged AA (light pink), Hydroxyl or amine AA (light green), Glycine (orange), proline (yellow), histidine or tyrosine (light blue).



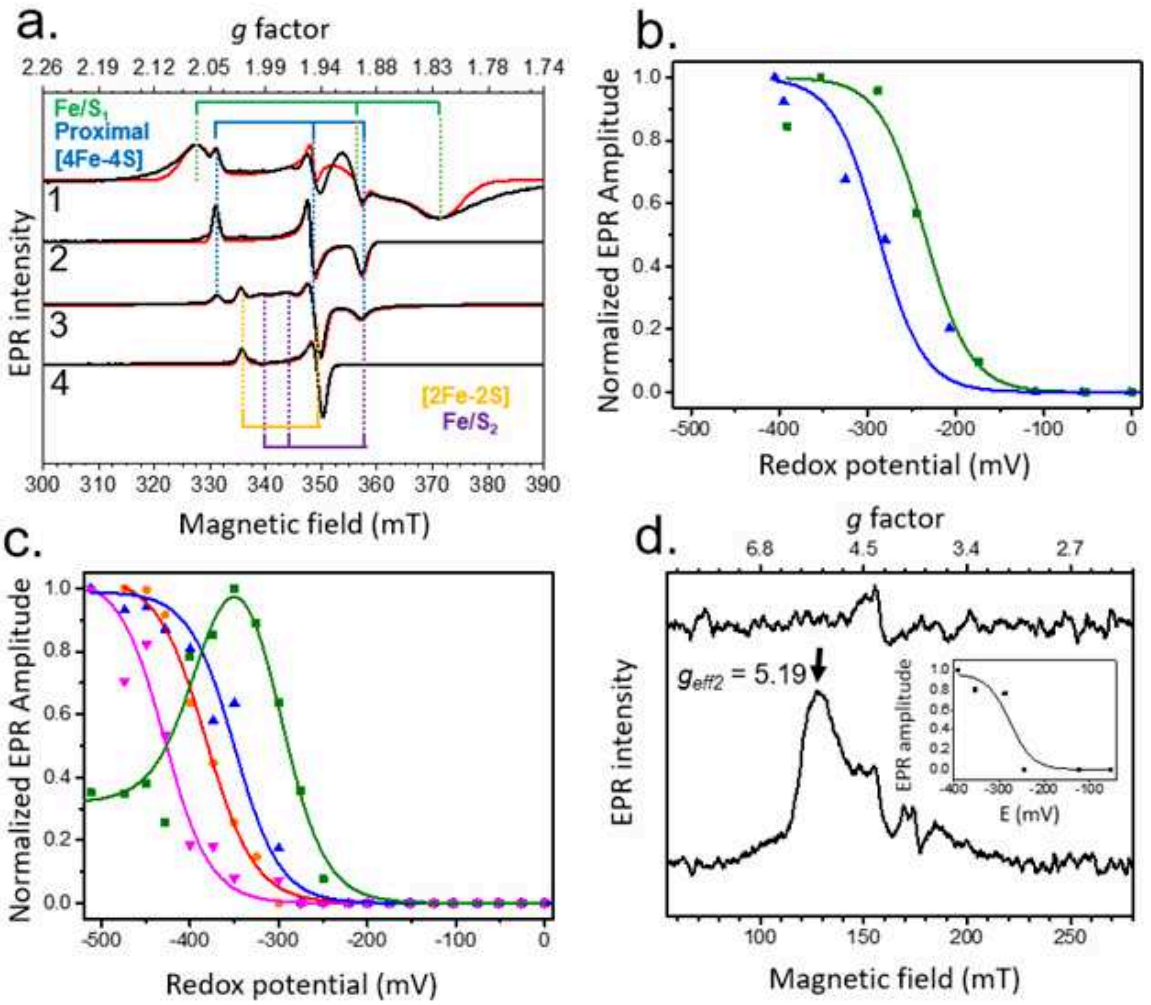
Extended Data Figure 3: **Comparison of lipid composition inside the cavity formed by ForE tetramer (a-b), comparison of the access to the ForE central cavity (c-d) and view of the electrostatic surface of ForCE (e). a.** Crystallographic and **b.** cryoEM structures are displayed in surface for the protein residues. Lipids, menaquinone and FeS clusters are depicted as sticks. ForC and ForE proteins surfaces are colored in dark blue and orange respectively. Non-protein carbon, oxygen, sulfur and iron atoms are colored in light blue, red, yellow and brown, respectively. **c.** crystallographic and **d.** cryoEM structures of one of the two openings that is free in the crystal structure while both sites are filled with glycero-phospholipids in the cryoEM reconstruction. ForC and ForE proteins surface are colored in dark blue and orange respectively. Glycero-phospholipid carbon, oxygen, and phosphorus atoms are colored in light blue, red and orange respectively. **e**. cryoEM structures are displayed in surface. Hydrophobic and hydrophilic residues are colored in light orange and light blue respectively. The cutaway shows the internal surface of ForE lined with hydrophobic residues (right).



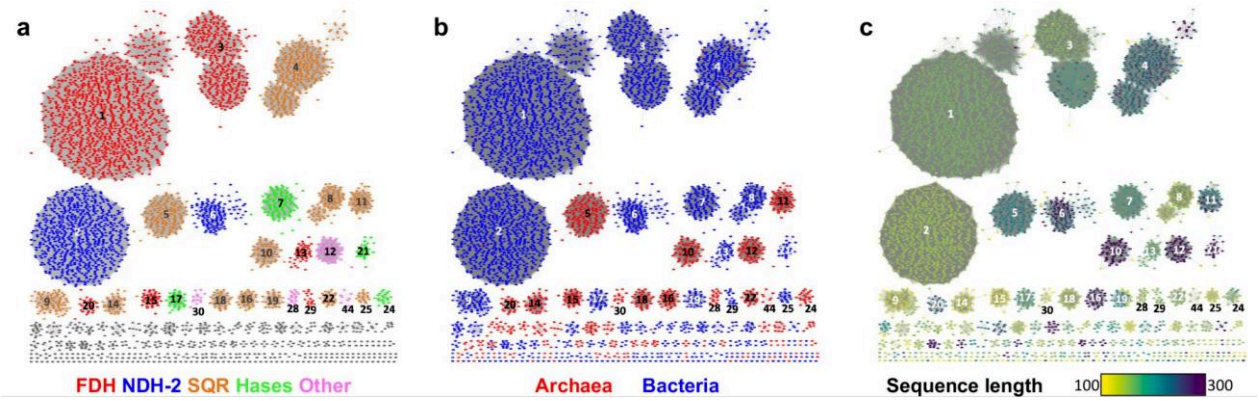
Extended Data Figure 4: **Comparison of the active site of *Bs*ForCE1 (left) to the one of *R. capsulatus* FDH (right)** Protein atoms and bispyranopterin guanosine dinucleotides (MPT) atoms are represented in sticks. Molybdenum and sulfur atoms are represented in balls. Carbon, oxygen, nitrogen, sulfur and molybdenum atoms are colored in gray, red, blue, yellow and turquoise respectively.


a.
ForCE
X-ray crystallographic
structure
ForCE
CryoEM reconstruction
[2Fe-2S]
C63
C37
C48
C51
Histidine [4Fe-4S]
H95
MK-7
C99
C102
C109
Central [4Fe-4S]
C151
C148
C154
C201
C-ter [4Fe-4S]
C158
C197
C194
C191
proximal [4Fe-4S]
C268
C272
C265
C300
b.
ForCE
X-ray crystallographic
structure
ForCE
CryoEM reconstruction
ForE
C-ter region
crystallographically
related ForE
α7
α7
HMP-α7
crystallographically
related ForE
F128
R132
Y127
S133
ForE
N-ter region
Glycero-
phospholipid 1
Glycero-
phospholipid 2
MK-7
MK-7
MK-7
MK-7
c.
Menaquinone
Active site
ForCE
X-ray crystallographic structure
T100
K234
E237
ForCE
CryoEM reconstruction
MK-7
MPT
MPT

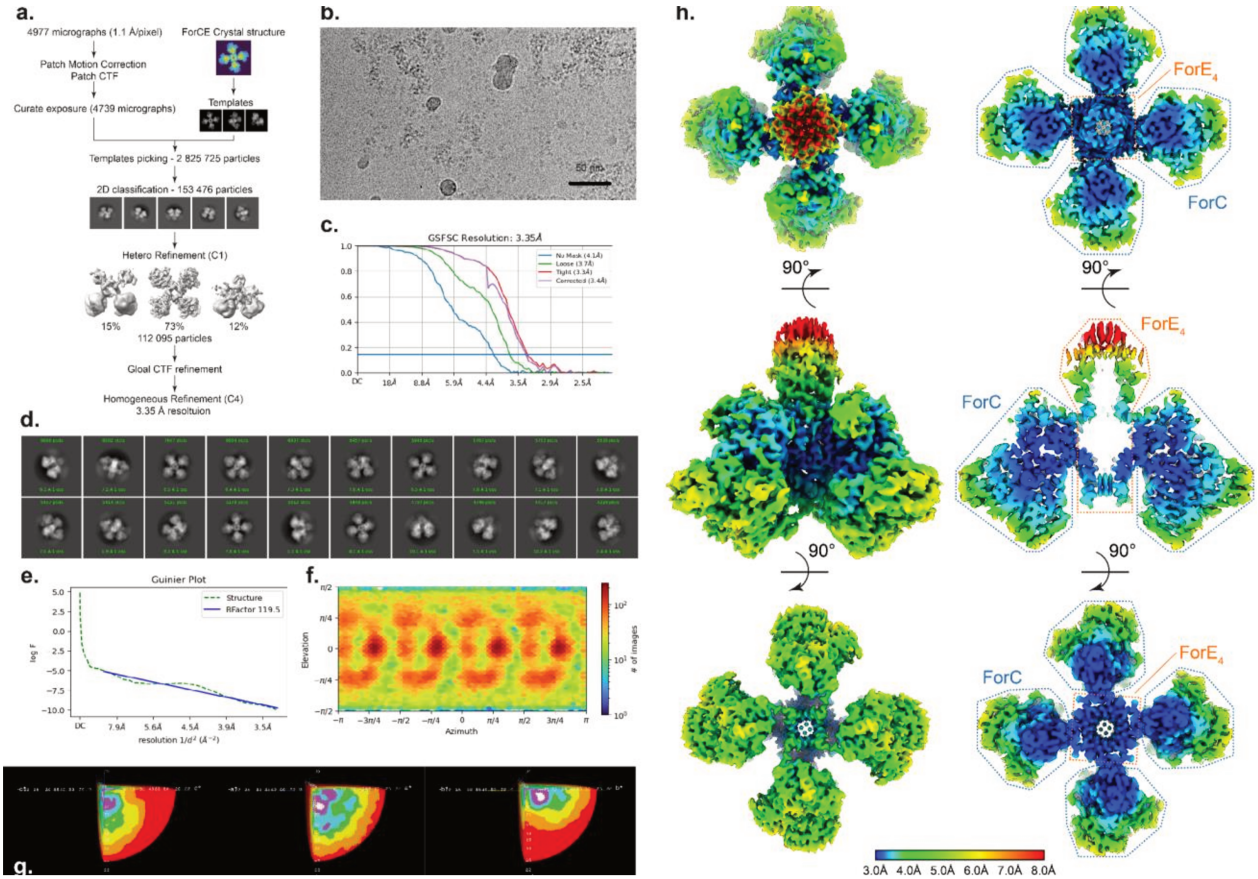
Extended Data Figure 5: a. Comparison of iron-sulfur cluster structure and coordination in the crystal structure (left) and cryoEM reconstruction (right). Main chain of the protein is represented in cartoon with the side chain in sticks. Iron-sulfur clusters are represented in balls and sticks. Carbon, oxygen, nitrogen, sulfur and iron atoms are colored in dark blue, red, blue, yellow and brown respectively. For the crystallographic structure, Fo-Fc difference Fourier electron density map (omit map) around each cluster is displayed as green mesh and contoured at 3σ. For the cryoEM reconstruction, density around each cluster is displayed as a beige semi-transparent surface and contoured at 20σ and 25σ for the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters, respectively. **b. Comparison of ForCE lipid composition in the crystal structure (left) and cryoEM reconstruction (right).** Main chain of the protein is represented in cartoon with the side chain in sticks. Lipids are represented in sticks. Carbon atoms are colored in dark blue for ForC and orange for ForE. Oxygen, nitrogen, phosphorus and sulfur, are colored in red, blue, orange and yellow respectively. For the crystallographic structure, Fo-Fc difference Fourier electron density map (omit map) is displayed as green mesh and contoured at 3σ. For the cryoEM reconstruction, Coulomb potential density is displayed as a beige semi-transparent surface and contoured at 4σ for ForE C-ter region, glycerophospholipid 1 and 2 and contoured at 3.4σ for ForE N-ter region. **c. Comparison of ForCE cofactor structure and coordination in the crystal structure (up) and cryoEM reconstruction (down).** Main chain of the protein is represented in cartoon with the side chain in sticks. Menaquinone, and the two *bis*pyranopterin guanosine dinucleotides (MPT) are represented by sticks. Molybdenum and sulfur atoms are displayed as light blue and yellow balls. Carbon ForC atoms are colored in dark blue. Cofactor carbon, oxygen, nitrogen, sulfur, phosphorus, iron and molybdenum atoms are colored in light blue, red, blue, yellow, orange, brown and turquoise respectively. For the crystallographic structure, Fo-Fc difference Fourier electron density map (omit map) is displayed as green mesh and contoured at 3σ. For the cryoEM reconstruction, coulomb potential density is displayed as a beige semi-transparent surface and contoured at 7σ and 12σ for menaquinone and the active site, respectively.



Extended Data Figure 6: EPR and redox analysis of [Fe-S] clusters in *Bs*ForCE1. a. Representative EPR spectra of *Bs*ForCE1 S = ½ [Fe-S] clusters. Simulations (red traces) are superimposed on experimental spectra (black traces). The *g* values of [Fe-S] clusters are indicated with vertical dotted lines. Experimental conditions: Temperature, 15 K (1, 3), 30 K (2), 100 K (4); microwave power, 100 mW (1), 10 mW (2-4); field modulation amplitude, 1 mT; microwave frequency, 9.4812 GHz (1), 9.4791 GHz (2), 9.4801 GHz (3), 9.4809 GHz (4); redox potential (pH = 6.0), -288 mV (1), -280 mV (2), -391 mV (3), -395 mV (4). Simulation parameters are given in Extended Data Table 2. **b. and c. EPR-monitored redox titration experiments of [Fe-S] clusters in *Bs*ForCE1 buffered at pH = 6 (b) and pH = 7.5 (c)**. EPR signal amplitudes of the Fe/S_1 [4Fe-4S] (g_3 = 1.825, green filled squares), the proximal [4Fe-4S] (g_1 = 2.044, blue filled triangles), Fe/S_2 (g_2 = 1.964, red filled circles), and the [2Fe-2S] cluster (g_1 = 2.018, pink filled triangles) were measured against the ambient redox potential. They were fitted to Nernst plots (solid lines) as described in the Methods, yielding estimated midpoint potential values as given in Figure 2b. Experimental conditions: 15 K (Fe/S_1 and Fe/S_2) or 50 K (proximal [4Fe-4S], [2Fe-2S]), 100 mW (Fe/S_1), 10 mW (proximal [4Fe-4S] at pH = 7.5, Fe/S_2, [2Fe-2S]), 1 mW (proximal [4Fe-4S] at pH = 6.0), modulation amplitude, 1 mT (Fe/S_1 and proximal [4Fe-4S] at pH = 6.0, Fe/S_2), 0.5 mT (proximal [4Fe-4S] at pH = 7.5, [2Fe-2S]). **d. Low field region of EPR spectra of dithionite-reduced *Bs*ForCE1 buffered at pH 6.0 and poised at -245 mV (top) and -390 mV (bottom).** The signal with a maximum at g_{eff2} = 5.19 and a shoulder at g_{eff1} = 5.45 is ascribed to a $[4Fe\text{-}4S]^+$ cluster with an S = 3/2 ground state (Supplementary Note 2 and Supplementary Figure 2) Experimental conditions: temperature, 8 K, microwave frequency, 9.480 GHz, microwave power, 100 mW, field modulation amplitude, 3 mT, 4 scans. The inset shows a potentiometric titration of the g_{eff1} = 5.45 signal. Experimental data were fitted to a n = 1 Nernst curve using an E_m = -275 mV, with an estimated accuracy of ± 20 mV. This cluster exhibits a midpoint potential comparable to that of the proximal [4Fe-4S] cluster (inset and Figure 2b). The latter is thus likely present in a mixture of S = ½ and S = 3/2 spin states, as reported for [4Fe-4S] clusters coordinated exclusively by cysteines or by a mixed 3-Cys and 1-His[44,45].



Extended Data Fig. 7: SSN cluster analysis of the HMP/DUF1641 family. a. The nodes/sequences are colored according to cluster type, **b.** kingdom of the organisms and **c.** sequence length. A good separation between archaeal and bacterial sequences suggests a divergent evolution of the family. We also noted that NDH-2 organization seems to be present only in bacteria, and that some clusters tend to contain sequences of homogeneous length.



Extended data Figure 8: CryoEM reconstruction (a-f), Anisotropy of the crystallographic data (g) and ForCE cryoEM reconstruction local resolution (h). a. ForCE cryoEM data processing workflow. **b.** Motion-corrected micrograph of ForCE complex. **c.** Fourier-shell-correlation plots for independently refined half-maps. Horizontal blue lines indicate Fourier-shell-correlation values of 0.143. **d.** Examples of 2D classes of the final selection of particles. Number of the particles and estimated resolution in each 2D class are indicated. **e.** Guinier plot of the final homogeneous refinement indicating a sharpening B-factor of 119.5 Å^2. **f.** Angular distribution of the particles used for the final reconstruction. **g.** Views of the I/σ(I) distribution in the reciprocal lattice along (left) a*/c*, (middle) a*/b* and (right) b*/c* axis. Data are highly anisotropic in the c* direction with a diffraction limit around 5 Å compared to a* and b* axis where the diffraction limit is around 2.7 Å. The color code corresponds to the following I/σ(I) values, red: 1.2; orange: 3.94; yellow: 7.44; green: 9.90; cyan: 13.10; magenta: 16.71; white: 18.88. Figures were generated using the STARANISO server[25] .**h.** Full reconstruction (left) and cross section (right) are colored according to the local resolution from dark blue (3.0 Å) to red (8.0 Å) and contoured at 5.2 σ. On the cross sections ForC and ForE tetramers are located with blue and orange dashed lines respectively

699

Enzyme	Name of the cofactor (assignment, if any)	*g* values	$\Delta g = g_1 - g_3$	Reference
*Bs*ForCE1	Fe/S_1	$g_{1,2,3}$ = 2.065, 1.889, 1.820	0.245	This work
*Mt*FDH	Fe/S_5	$g_{1,2,3}$ = 2.09, 1.94, 1.84	0.25	[32]
*Cn*FdsABG	A2 (C-ter [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.095, 1.888, 1.843	0.252	[15]
Cpl[Fe-Fe] H2ase	FS4B (Central [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.120, 1.909, 1.856	0.264	[46]
*Bs*ForCE1	Proximal [4Fe-4S]	$g_{1,2,3}$ = 2.044, 1.944, 1.893	0.151	This work
*Ec*FDH-H	Proximal [4Fe-4S]	$g_{1,2,3}$ = 2.045, 1.957, 1.910	0.135	[47]
*Da*FDH	Fe/S1 (Proximal [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.046, 1.946, 1.882	0.164	[48]
*Cn*FdsABG	A1 (Proximal [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.045, 1.942, 1.897	0.148	[15]
*Rc*FdsGBAD	A1 (Proximal [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.046, 1.950, 1.892	0.154	[16]
*Dv*HFdhAB	FeS1	$g_{1,2,3}$ = 2.044, 1.937, 1.898	0.146	[49]
Complex I	N7 (equ. Proximal [4Fe-4S])	$g_{1,2,3}$ = 2.045, 1.94, 1.89	0.155	[30,31]
*Bs*ForCE1	[2Fe-2S]	$g_{\parallel,\perp}$ = 2.018, 1.937	0.081	This work
*Mt*FDH	Fe/S_3	$g_{1,2,3}$ = 2.014, 1.94, 1.933	0.081	[32]
*Cn*FdsABG	A5 ([2Fe-2S])	$g_{1,2,3}$ = 2.018, 1.948, 1.935	0.083	[15]
*Rc*FdsGBAD	A5 ([2Fe-2S])	$g_{1,2,3}$ = 2.021, 1.943, 1.941	0.081	[16]
Complex I	N1b ([2Fe-2S])	$g_{\parallel,\perp}$ = 2.02, 1.94	0.08	[50–53]
Ca[FeFe] H2ase	[2Fe-2S]	$g_{\parallel,\perp}$ = 2.019, 1.936	0.083	[54]

700 **Extended Data Table 1: Comparison of the g-tensor characteristics of *Bs*ForCE1 [Fe-S] clusters with those of [Fe-S] clusters**
701 **in other related enzymes.** *Bs, Bacillus subtilis, Ec, Escherichia coli, Da, Desulfovibrio alaskensis, Cn, Cupriavidus necator, Mt,*
702 *Methylosinus trichosporium OB3b, Ca, Clostridium acetobutylicum, DvH, Desulfovibrio vulgaris Hildenborough, Rc, Rhodobacter*
703 *capsulatus, FDH, formate dehydrogenase, H2ase, hydrogenase.*

704

705

706

EPR spectrum	[Fe-S]	g values ($g_{1,2,3}$ or $g_{\parallel,\perp}$)	g-strain parameters $FWHM_{1,2,3}$	Proportion (%)
1	Fe/S_1 [4Fe-4S]	2.065, 1.889, 1.820	0.050, 0.111, 0.070	86
	Proximal [4Fe-4S]	2.045, 1.943, 1.894	0.009, 0.007, 0.010	14
2	Proximal [4Fe-4S]	2.044, 1.944, 1.893	0.017, 0.017, 0.019	100
3	Fe/S_1 [4Fe-4S]	2.060, 1.899, 1.827	0.077, 0.049, 0.140	36
	Proximal [4Fe-4S]	2.044, 1.940, 1.896	0.011, 0.013, 0.012	21
	Fe/S_2	1.998, 1.959, 1.894	0.028, 0.019, 0.034	23
	[2Fe-2S]	2.018, 1.938	0.013, 0.009	20
4	[2Fe-2S]	2.018, 1.937	0.012, 0.009	100

Extended Data Table 2: Parameters used for the simulations shown in Extended Data Fig. 6a. The numbering of the spectra in the first column is as shown in Extended data Fig. 6a.

References

1. Garcia, A. K. *et al.* Nitrogenase resurrection and the evolution of a singular enzymatic mechanism. *eLife* **12**, e85003 (2023).

2. Peters, J. W. *et al.* [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 1350–1369 (2015).

3. Wells, M. *et al.* Methane, arsenic, selenium and the origins of the DMSO reductase family. *Sci. Rep.* **10**, 10946 (2020).

4. Schoepp-Cothenet, B. *et al.* The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life. *Sci. Rep.* **2**, (2012).

5. Magalon, A., Ceccaldi, P. & Schoepp-Cothenet, B. The Prokaryotic Mo/W-bisPGD Enzymes Family. in *Molybdenum and Tungsten Enzymes* 143–191 (2016). doi:10.1039/9781782623915-00143.

6. Grimaldi, S., Schoepp-Cothenet, B., Ceccaldi, P., Guigliarelli, B. & Magalon, A. The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: A catalytic workhorse in bioenergetic. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1827**, 1048–1085 (2013).

7. Arias-Cartín, R. *et al.* Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **298**, 101384 (2022).

8. Radon, C. *et al.* Cryo-EM structures reveal intricate Fe-S cluster arrangement and charging in Rhodobacter capsulatus formate dehydrogenase. *Nat. Commun.* **11**, 1912 (2020).

9. Yoshikawa, T. *et al.* Multiple electron transfer pathways of tungsten-containing formate dehydrogenase in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Chem. Commun.* **58**, 6478–6481 (2022).

10. Zuchan, K., Baymann, F., Baffert, C., Brugna, M. & Nitschke, W. The dyad of the Y-junction- and a flavin module unites diverse redox enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1862**, 148401 (2021).

11. Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J. & Seefeldt, L. C. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from Clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**, 1853–1858 (1998).

12. Sazanov, L. A. & Hinchliffe, P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus. *Science* **311**, 1430–1436 (2006).

13. Shomura, Y. *et al.* Structural basis of the redox switches in the NAD+-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase. *Science* **357**, 928–932 (2017).

14. Feng, X., Schut, G. J., Haja, D. K., Adams, M. W. W. & Li, H. Structure and electron transfer pathways of an electron-bifurcating NiFe-hydrogenase. *Sci. Adv.* **8**, eabm7546 (2022).

15. Harmer, J. R., Hakopian, S., Niks, D., Hille, R. & Bernhardt, P. V. Redox Characterization of the Complex Molybdenum Enzyme Formate Dehydrogenase from Cupriavidus necator. *J. Am. Chem. Soc.* (2023) doi:10.1021/jacs.3c10199.

16. Duffus, B. R., Gauglitz, M., Teutloff, C. & Leimkühler, S. Redox potentials elucidate the electron transfer pathway of NAD+-dependent formate dehydrogenases. *J. Inorg. Biochem.* **253**, 112487 (2024).

17. Grinter, R. *et al.* Structural basis for bacterial energy extraction from atmospheric hydrogen. *Nature* **615**, 541–547 (2023).

18. Greening, C., Berney, M., Hards, K., Cook, G. M. & Conrad, R. A soil actinobacterium scavenges atmospheric H2 using two membrane-associated, oxygen-dependent [NiFe] hydrogenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 4257–4261 (2014).

19. Marreiros, B. C., Sena, F. V., Sousa, F. M., Batista, A. P. & Pereira, M. M. Type II NADH:quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences. *Environ. Microbiol.* **18**, 4697–4709 (2016).

20. Sousa, F. M., Pereira, J. G., Marreiros, B. C. & Pereira, M. M. Taxonomic distribution, structure/function relationship and metabolic context of the two families of sulfide dehydrogenases: SQR and FCSD. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1859**, 742–753 (2018).

21. Allen, K. N., Entova, S., Ray, L. C. & Imperiali, B. Monotopic Membrane Proteins Join the Fold. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 7–20 (2019).

22. Ojha, S., Meng, E. C. & Babbitt, P. C. Evolution of Function in the "Two Dinucleotide Binding Domains" Flavoproteins. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e121 (2007).

23. Vernède, X. & Fontecilla-Camps, J. C. A method to stabilize reduced and/or gas-treated protein crystals by flash-cooling under a controlled atmosphere. *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 505–509 (1999).

24. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).

25. Tickle, I. J. *et al.* Tickle. *STARANISO. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.657 (http://staraniso.globalphasing.org).* (2018).

26. Liebschner, D. *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **75**, 861–877 (2019).

27. Cherrier, M. V. *et al.* Oxygen-Sensitive Metalloprotein Structure Determination by Cryo-Electron Microscopy. *Biomolecules* **12**, 441 (2022).

28. Schorb, M., Haberbosch, I., Hagen, W. J. H., Schwab, Y. & Mastronarde, D. N. Software tools for automated transmission electron microscopy. *Nat. Methods* **16**, 471–477 (2019).

29. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **14**, 290–296 (2017).

30. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).

31. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **30**, 70–82 (2021).

32. Jollie, D. R. & Lipscomb, J. D. Formate dehydrogenase from Methylosinus trichosporium OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors. *J. Biol. Chem.* **266**, 21853–21863 (1991).

33. Hartmann, T. & Leimkühler, S. The oxygen-tolerant and NAD+-dependent formate dehydrogenase from Rhodobacter capsulatus is able to catalyze the reduction of CO2 to formate. *FEBS J.* **280**, 6083–6096 (2013).

34. Wang, S., Huang, H., Kahnt, J. & Thauer, R. K. Clostridium acidurici Electron-Bifurcating Formate Dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6176–6179 (2013).

35. Laukel, M., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Vorholt, J. A. The tungsten-containing formate dehydrogenase from Methylobacterium extorquens AM1: Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **270**, 325–333 (2003).

36. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).

37. Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274 (2015).

38. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. & Jermiin, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **14**, 587–589 (2017).

39. Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. & Vinh, L. S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522 (2018).

40. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **49**, W293–W296 (2021).

41. Rasmussen, S., Nielsen, H. B. & Jarmer, H. The transcriptionally active regions in the genome of Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **73**, 1043–1057 (2009).

42. Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A. & Rapoport, G. Levanase operon of Bacillus subtilis includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J. Mol. Biol.* **214**, 657–671 (1990).

817 43. Konkol, M. A., Blair, K. M. & Kearns, D. B. Plasmid-encoded ComI inhibits competence in
818 the ancestral 3610 strain of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **195**, 4085–4093 (2013).

819 44. Dhawan, I. K. *et al.* Spectroscopic studies of the tungsten-containing formaldehyde ferredoxin
820 oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus litoralis. *J. Biol. Inorg.*
821 *Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 313–327 (2000).

822 45. Lanciano, P. *et al.* New method for the spin quantitation of [4Fe-4S](+) clusters with S =
823 (3)/(2). Application to the FS0 center of the NarGHI nitrate reductase from Escherichia coli. *J.*
824 *Phys. Chem. B* **111**, 13632–13637 (2007).

825 46. Artz, J. H. *et al.* Reduction Potentials of [FeFe]-Hydrogenase Accessory Iron–Sulfur Clusters
826 Provide Insights into the Energetics of Proton Reduction Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**,
827 9544–9550 (2017).

828 47. Gladyshev, V. N. *et al.* Characterization of crystalline formate dehydrogenase H from
829 Escherichia coli. Stabilization, EPR spectroscopy, and preliminary crystallographic analysis.
830 *J. Biol. Chem.* **271**, 8095–8100 (1996).

831 48. Brondino, C. D. *et al.* Incorporation of either molybdenum or tungsten into formate
832 dehydrogenase from Desulfovibrio alaskensis NCIMB 13491; EPR assignment of the proximal
833 iron-sulfur cluster to the pterin cofactor in formate dehydrogenases from sulfate-reducing
834 bacteria. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 145–151 (2004).

835 49. Oliveira, A. R. *et al.* Toward the Mechanistic Understanding of Enzymatic CO2 Reduction.
836 *ACS Catal.* **10**, 3844–3856 (2020).

837 50. Friedrich, T. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli.
838 *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 134–146 (1998).

51. Ohnishi, T. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 186–206 (1998).

52. Yakovlev, G., Reda, T. & Hirst, J. Reevaluating the relationship between EPR spectra and enzyme structure for the iron–sulfur clusters in NADH:quinone oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12720–12725 (2007).

53. Reda, T., Plugge, C. M., Abram, N. J. & Hirst, J. Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10654–10658 (2008).

54. Gauquelin, C. *et al.* Roles of the F-domain in [FeFe] hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1859**, 69–77 (2018).

Supplementary information: A Conserved Helical Membrane Plug-in for Quinone reductases

	XDS	*STARANISO*
ESRF beamline	*ID23-2*	
Wavelength (Å)	*0.87313*	
Space group	*F222*	
Unit cell parameters (Å)	*a = 210.83 b = 210.50 c = 494.21*	
Protein molecules per asymmetric unit	*4*	
Resolution range (Å)	*49.50 – 2.65 (2.88 – 2.65)*	*49.50 – 2.65 (2.88 – 2.65)*
Completeness spherical (%)	*99.9 (100.0)*	*60. 8 (13.7)*
Completeness ellipsoidal (%)	*/*	*93.6 (65.8)*
I/σ(I)	*3.6 (0.51)*	*5.6 (1.5)*
# of measured reflections	*1 265 275 (284 479)*	*749 146 (34 385)*
Redundancy	*8.0 (8.2)*	*7.8 (7.1)*
R_{MEAS} (%)	*48.5 (411.1)*	*34.0 (136.3)*
$CC_{1/2}$ (%)	*97.9 (23.3)*	*98.4 (53.3)*
Resolution limit (Å)	*2.69*	
R_{work} / R_{free} factor (%)	*19.56 / 23.06*	
# of non hydrogen atoms		
Protein atoms	*17585*	
Heterogen atoms	*604*	
Waters atoms	*687*	
Wilson B-factor (Å²)	*55.04*	
Average B-factor (Å²)	*59.56*	
RMSD		
Bonds (Å)	*0.007*	
Angles (°)	*0.91*	
Ramachandran (%)		
Favored region	*96.28*	
Allowed region	*3.45*	
Outliers region	*0.27*	

Supplementary Table 1. X-ray crystallography data collection and refinement parameters

	(EMD-19452)
Magnification	*36 000*
Voltage (kV)	*200*
Total electron exposure ($e^-/Å^2$)	*40*
Defocus range (μm)	*-0.5 to -3.5*
Pixel size (Å)	*1.1*
Symmetry imposed	*C4*
Number of movies	*4 977*
Number of particles images in the final map	*112 095*
Map resolution (Å)	*3.35*
FSC threshold	*0.143*

Supplementary Table 2. CryoEM data collection and processing.

	(PDB-8RR0)
Model resolution (Å)	*3.2*
Map sharpening B factor ($Å^2$)	*-119.5*
Model composition	
Chains	*119.5*
Protein residues	*4 492*
Water molecules	*84*
Ligands molecules	*92*
Average B factor ($Å^2$)	
Protein	*97.95*
Ligand	*92.28*
Water	*80.14*
R.m.s. deviation	
Bond lengths (Å)	*0.005*
Bond angles (°)	*1.074*
Validation	
MolProbity score	*2.05*
Clash score	*22.78*
Rotamer outliers (%)	*0.62*
Ramachandran plot	
Favored (%)	*96.78*
Allowed (%)	*3.22*
Disallowed (%)	*0.00*
Model vs. Data	
CC (mask)	*0.84*
CC (main chain)	*0.83*
Mean CC for ligands	*0.69*

Supplementary Table 3. CryoEM refinement and validation statistics.

Enzyme	MK-7 (pmol/pmol ForCE1)	$K_M^{menadione}$ (M)	$k_{cat}^{menadione}$ (s^{-1})	$V_{max}^{menadione}$ (U)	$k_{cat}/K_M^{menadione}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)
*Bs*ForCE1	0.87 ± 0.092	25 ± 0.3	16.5 ± 0.6	7.5 ± 0.3	660
*Bs*ForCE1$^{\Delta HMP}$	0.29 ± 0.03	20 ± 3.5	14.5 ± 1.1	6.6 ± 0.5	725
*Bs*ForCE1$^{F128D-R132D}$	0.96 ± 0.093	18.8 ± 4	9 ± 0.6	4.1 ± 0.3	478

Supplementary Table 4. HPLC-ECD quantification of MK in lipid extracts of purified *Bs*ForCE1 and variants (n=1) and enzymatic catalytic constants for formate oxidation using menadione as electron acceptor.

Supplementary Table 5. All GI numbers used for the MSA

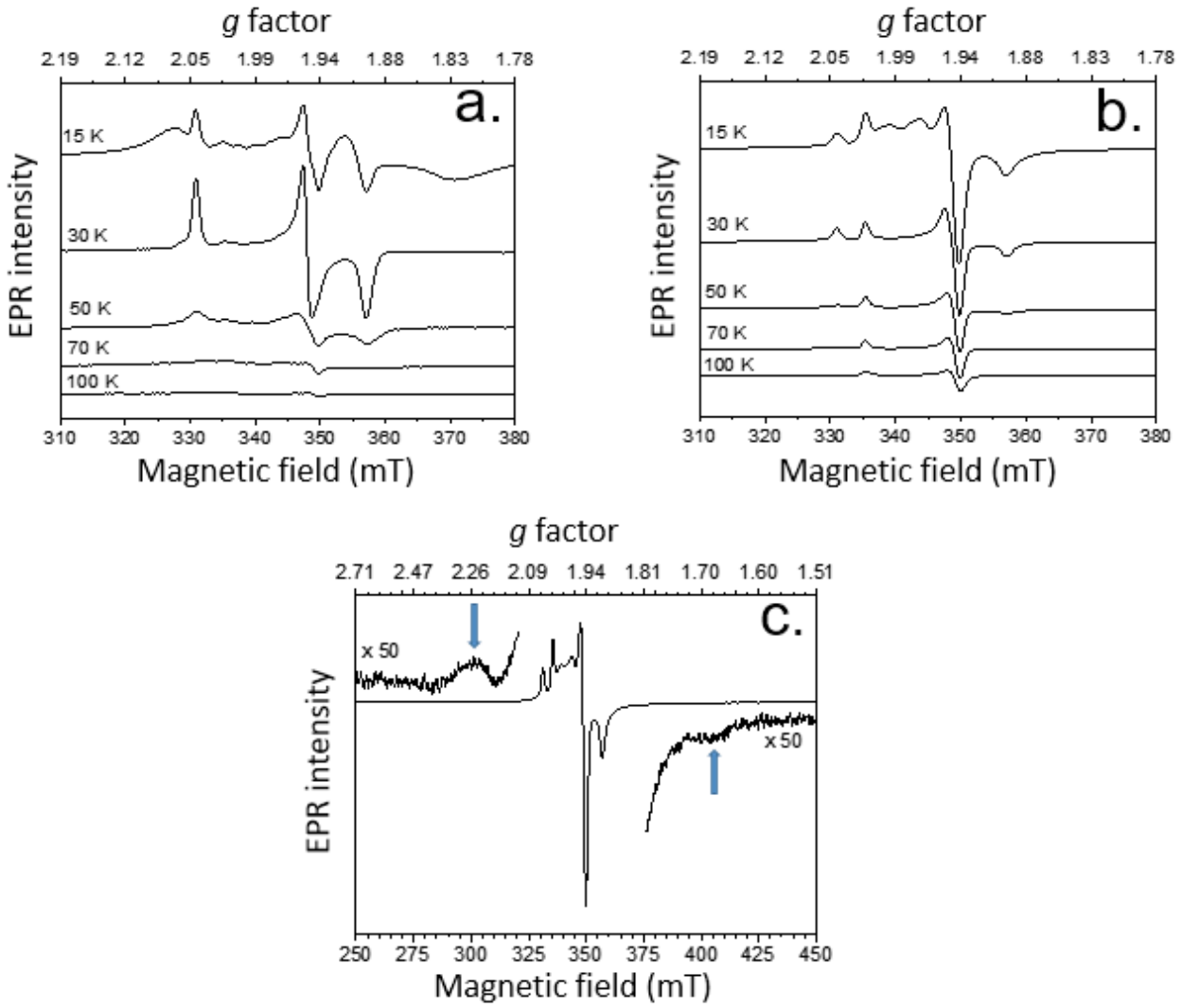
Supplementary Table 6. All GI numbers used for phylogeny analysis

Strains	Description	Reference
4039	*BS* 168 *trpC2 ΔforC1::ery*	BGSC
4040	*BS* 168 *trpC2 ΔforC2::ery*	BGSC
4076	*BS* 3610 *ΔforC1::ery*	This work
4088	*BS* 168 *trpC2 ΔamyE*::pForCE1	[1]
4158	*BS* 168 *trpC2 ΔforC2::kan*	BGSC
4112	*BS* 3610 *ΔforC2::ery*	This work
4237	*BS* 3610 *ΔforC1::kan ΔforC2::ery*	This work
4247	*BS* 168 *trpC2 ΔforE1::kan*	BGSC
4249	*BS BS* 168 *trpC2 ΔforE1::ery*	BGSC
4251	*BS* 3610 *ΔforC2::kan*	This work
4341	*BS* 3610 WT	BGSC
4342	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$	BGSC
4471	*BS* 3610 *ΔforC2::ery ΔamyE*:pForCE1	This work
4480	*BS 168 ΔforE1::ery ΔforE2::kan*	This work
4485	*BS 168 ΔforE1::ery ΔforE2::kan ΔamyE::pForCE1* $^{\Delta DUF1641}$	This work
4532	*BS* 168 *ΔforE1::ery ΔforE2::kan ΔamyE*::pForCE1^{F128DR132D}	This work
4560	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$ *ΔforE1::kan*	This work
4561	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$ *ΔforE1::kan ΔforC2::ery*	This work
4565	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$ *ΔforE1::kan ΔforC2::ery ΔamyE*::pForCE1	This work
4566	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$ *ΔforE1::kan ΔforC2::ery ΔamyE*::pForCE1^{F128DR132D}	This work
4567	*BS* 3610 $comI^{Q12L}$ *ΔforE1::kan ΔforC2::ery ΔamyE*::pForCE1$^{\Delta DUF1641}$	This work

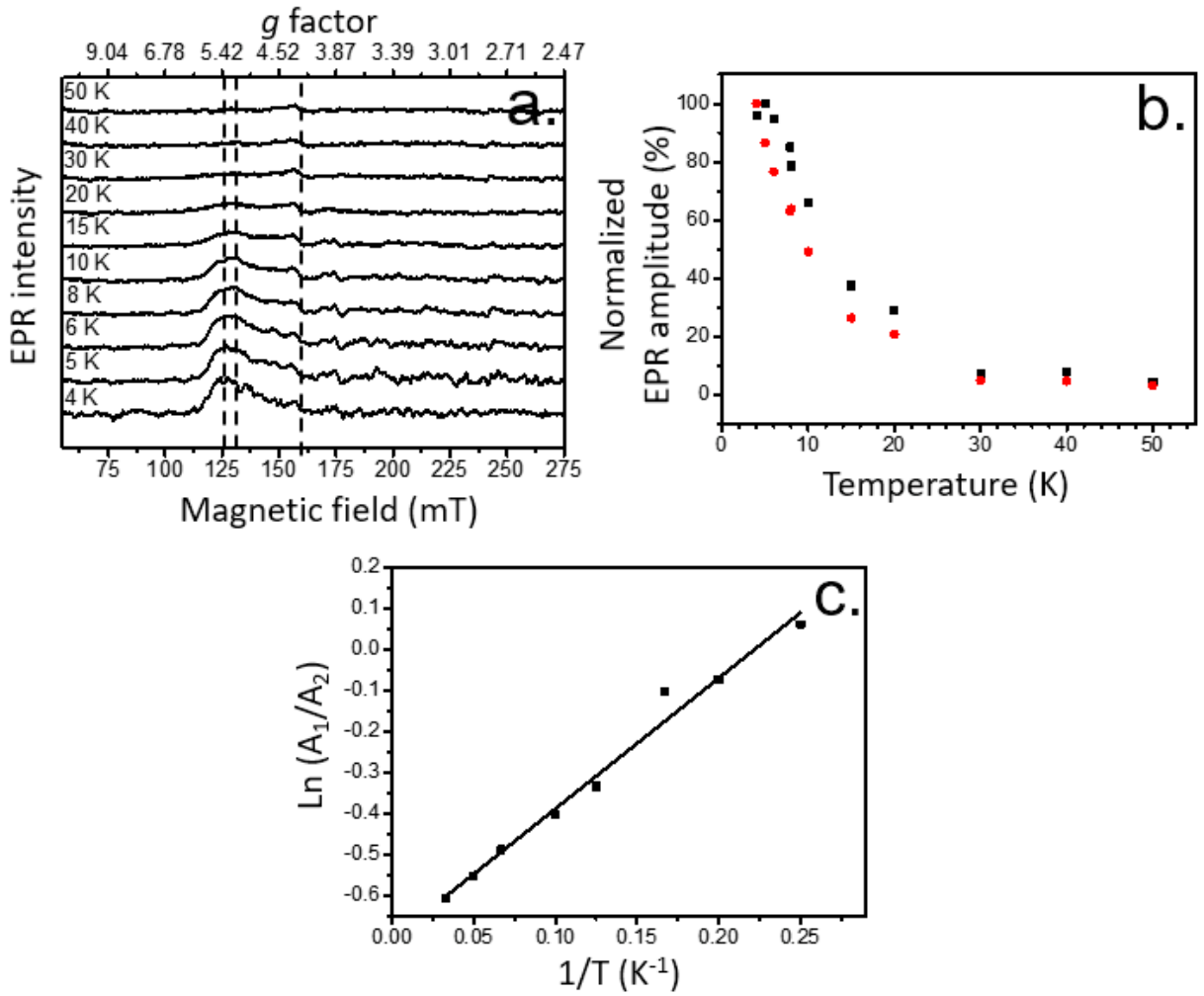
Plasmids	Description	Reference
4085	pForCE1 - Plasmid for expression of the 6his-*forCE1* construction with a xylose inducible promotor.	[1]
4391	pForCE1 $^{\Delta DUF1641}$ - Plasmid for expression of the 6his- *forCE1* $^{\Delta DUF1641}$ construction with a xylose inducible promotor.	This work
4531	pForCE1^{F128DR132D} - Plasmid for expression of the 6his-*forCE1*^{F128DR132D} construction with a xylose inducible promotor.	This work

Primers	Sequences
875	GGG-TAC-GGA-AAA-ATG-AAC-TC
906	GCA-GTG-ACG-GCA-GCG-GGA-GC
2079	AGA-AAT-GAT-GAA-ACA-GTG-AAG-AAA-AGA-CAG-GTT
2080	TGT-TTC-ATC-ATT-TCT-GCT-CTA-CAG-CGC-TTG-C
2157	GAC-CTG-ACG-CTC-ATG-GCT-GAT-ATC
2182	CAC-ATC-CTT-GGA-AAA-AGC-AAG-CCC

Supplemental Table 7.



Supplementary Figure 1. EPR analysis of S = ½ [4Fe-4S]$^{+}$ clusters in *Bs*ForCE1. a. and **b.** variable temperature EPR spectra of *Bs*ForCE1 redox poised at -280 mV (a) and –395 mV (b) in MES buffer (pH = 6.0). The temperature is given in the figure. While the Fe/S_1 [4Fe-4S]$^{+}$ EPR signal can only be detected at temperatures below 30 K (a, top), that from the proximal [4Fe-4S]$^{+}$ center broadens above 30 K and is no longer detected above 70 K (a, from top to the bottom). Other experimental conditions: microwave power, 10 mW, field modulation amplitude, 1 mT, microwave frequency, 9.48 GHz. **c**. EPR spectrum of *Bs*ForCE1 buffered at pH = 6.0 and redox poised at -390 mV. Side signals are enlarged to show the low intensity EPR lines with extrema at g = 2.23 and 1.68 (vertical arrows) assigned to inter-cluster magnetic couplings. Experimental conditions: temperature, 15 K, microwave power, 10 mW, field modulation amplitude, 1 mT, microwave frequency, 9.4801 GHz.



Supplementary Figure 2. Detection and analysis of variable temperature EPR spectra of the S = 3/2 [4Fe-4S]$^{+}$ cluster in *Bs*ForCE1. a. Variable temperature EPR spectra of the $g \sim 5$ EPR signals measured in *Bs*ForCE1 redox poised at -390 mV and buffered at pH = 6.0. Temperature is indicated. From left to right, vertical dotted lines indicate the positive EPR lines from the two S = 3/2 Kramers doublets with g_{eff1} = 5.45 and g_{eff2} = 5.19 and the first derivative line from the isotropic signal at g = 4.3 from adventitious Fe^{3+} ions, respectively. Other experimental conditions: microwave power, 100 mW, field modulation amplitude, 2 mT, 4 scans. **b.** Temperature dependence of the g_{eff1} = 5.45 (filled red circles) and g_{eff2} = 5.19 (filled black squares) features of the low-field region of the *Bs*ForCE1 EPR spectra shown in (a). Signal amplitudes were normalized to a 0-100 % scale. **c.** Plot of the natural logarithm of the ratio of the area under the g_{eff1} = 5.45 (A_1) and g_{eff2} = 5.19 (A_2) peaks against the reciprocal of the temperature. The areas were determined as described in Supplementary Note 4. Data points were fitted to Eq. 1 (Supplementary Note 4).

Supplementary Note 1. EPR analysis and assignment of S = ½ [Fe-S] clusters in *Bs*ForCE1

We have previously shown that the dithionite-reduced enzyme shows [Fe-S] EPR signals near g = 2.0 that account for the contribution of 4.7 ± 0.4 spins/enzyme in agreement with the presence of five [Fe-S] clusters in *Bs*ForCE1[1]. To further characterize the spectral and redox properties of the *Bs*ForCE1 [Fe-S] clusters, EPR-monitored redox titrations experiments were carried out on the purified enzyme buffered at two different pH, *i.e.* 6.0 and 7.5. This approach made it possible to distinguish several [Fe-S] EPR signals. At redox potentials between -200 mV and -300 mV, intense EPR signals from two magnetically-isolated S = ½ $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ clusters with $g_{1,2,3}$ = 2.065, 1.889, 1.820 (referred to as Fe/S_1) and $g_{1,2,3}$ = 2.044, 1.944, 1.893 are detected (Supplementary Figure 1a), as observed in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough FdhAB[2]. Visible below 30 K, Fe/S_1 displays a broad rhombic EPR signature (Extended Data Figure 6a) and titrates with a midpoint potential $E_{m,\,6.0}$ = -235 ± 10 mV (Extended Data Figure 6b and Table 1). The other cluster distinguishes from Fe/S_1 by its less anisotropic g-tensor, its narrower linewidth, its slower relaxation properties (Extended Data Figure 6a and Supplementary Figure 1a), and by its lower midpoint redox potential, *i.e.*, $E_{m,\,6.0}$ = -288 ± 10 mV (Extended Data Figure 6b and Table 1). It displays g tensor characteristics which are very close to those of the proximal $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ cluster of *E. coli* FDH-H[3], *Rhodobacter capsulatus* FdsGBAD[4], *Desulfovibrio alaskensis* FDH[5], or *Cupriavidus necator* FdsABG[6] (Extended Data Table 1). In these last two enzymes, the structural assignment relied on the observation of a magnetic coupling between the $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ cluster and the Mo(V) species. Based on these similarities, the g_1 = 2.044 signal is assigned to the proximal [4Fe-4S] center in *Bs*ForCE1. Despite its proximity to the Mo-*bis*PGD, no such magnetic coupling could be detected in *Bs*ForCE1 similarly to other FDHs[1] because, due to their redox properties, these two centers cannot be simultaneously paramagnetic in the enzyme[5]. In line with this assignment, this cluster also displays similar g values to the structurally-equivalent [4Fe-4S] cluster N7 in NADH:quinone oxidoreductase (Extended Data Table 1)[7–9]. Regarding Fe/S_1, this center shows the largest anisotropy (*i.e.*, Δg = 0.245) of all clusters in this enzyme and exceptionally broad features as observed for the unassigned Fe/S_5 cluster from *Methylosinus trichosporium* OB3b FDH[10], for the A2 cluster from *C. necator* FDH[6] which has been assigned to the C-ter [4Fe-4S] center located next to the proximal cluster, or for the FS4B cluster from the structurally-related [Fe-Fe]-hydrogenase from *Clostridium Pasteurianum* which has been assigned to the Central [4Fe-4S]

cluster[11] (Extended Data Table 1). Given these apparently contradictory attributions, further work is needed to definitively assign the Fe/S_1 EPR signal in *Bs*ForCE1.

Below -300 mV, additional signals develop at g = 1.996, 1.965 and 1.88-1.90 indicating the reduction of at least one additional [Fe-S] center referred to as Fe/S_2 (Extended Data Figure 6a). Detected up to 30 K (Supplementary Figure 1B), these features overlap with those of the Fe/S_1 and proximal $[4Fe\text{-}4S]^+$ clusters and display similar intensity changes upon variation of the measurement temperature, incident microwave power or of the ambient redox potential. The midpoint potential of these additional signals could be determined in samples poised at pH 7.5, leading to $E_{m,7.5}$ = -379 ± 10 mV (Extended Data Figure 6c and Table 1). Moreover, the appearance of these signals correlates with a decrease of the Fe/S_1 EPR amplitude (Extended Data Figure 6c). The latter phenomenon can indeed be explained by a magnetic coupling to another center whose midpoint potential is estimated to $E_m{}^{coupl}{}_{7.5} \backsimeq$ - 380 mV by numerical simulation of the Fe/S_1 titration curve (Supplementary Note 3), a value close to the reduction potential associated to Fe/S_2. Consistent with this interpretation, weaker signals at g = 2.23 and 1.68 are also detected (Supplementary Figure 1c) and attributed to intercluster spin coupling in *Bs*ForCE1, as observed in many enzymes containing multiple FeS clusters (see e.g.,[12–14]). Eventually, the intense axially symmetric EPR signal with ($g_{\parallel}$, $g_{\perp}$) = (2.018, 1.937) previously assigned by us to the *Bs*ForCE1 $[2Fe\text{-}2S]^+$ cluster[1], develops below -350 mV and titrates with a midpoint potential $E_{m,\,7.5}$ = - 426 ± 10 mV (Extended Data Figure 6c and Table 1). It displays spectroscopic properties similar to those of [2Fe-2S] clusters found in other enzymes containing the electron connecting module such as the unassigned Fe/S_3 cluster from *M. trichosporium* OB3b FDH[10], the A5 $[2Fe\text{-}2S]^+$ center from *C. necator* FdsABG[6] or *R. capsulatus* FdsGBAD[4], the N1b $[2Fe\text{-}2S]^+$ cluster in prokaryotic or eukaryotic NADH:quinone oxidoreductases[8], or the $[2Fe\text{-}2S]^+$ center in *C. acetobutylicum* [FeFe] hydrogenase[15] (Extended Data Table 1).

Supplementary Note 2. EPR detection and analysis of a $[4Fe\text{-}4S]^+$ cluster with an S = 3/2 ground state

The low-field region of the EPR spectrum of fully dithionite-reduced *Bs*ForCE1 reveals the presence of a low-intensity signal in the g ~ 5 region with a maximum at g_{eff2} = 5.19 (Extended Data Figure 6d). This signal titrates with an $E_{m\,6.0}$ = - 275 mV (Extended Data Figure 6d, inset) and disappears above 20 K (Supplementary Figure 2a). Careful examination of spectra measured in

variable temperature EPR experiments indicates that its shape is composite, being made of two overlapping positive lines with maxima around $g = 5.45$ and 5.19 which exhibit distinct temperature dependences (Supplementary Figure 2a). The latter has a maximal amplitude at approximately 5 K, whereas that of the former occurs at less than 4 K (Supplementary Figure 2a and 2b). These spectral characteristics are similar to those of a range of proteins containing a $[4Fe\text{-}4S]^+$ cluster with an $S = 3/2$ ground state[16–18]. They are consistent with *Bs*ForCE1 containing such a cluster whereby the $g = 5.45$ and 5.19 lines are effective g-values corresponding to the ground $M_S = \pm 3/2$ and to the excited $M_S = \pm ½$ Kramers doublets, respectively, with negative axial zero-field splitting parameter. A rhombicity parameter value R = E/D in the range [0.23 - 0.31] can be roughly estimated from inspection of rhombograms depicting effective g-values of S = 3/2 centers as a function of R assuming that the g-matrix of the FeS center is isotropic with $g_{iso} = 2.0$[19]. Quantitative study of the temperature dependence of the $g_{eff1} = 5.45$ and $g_{eff2} = 5.19$ peaks using the model presented in Supplementary Note 4 allows to estimate the energy separation D between the two Kramers doublets, leading to $D = 2.2 \pm 0.1$ cm^{-1}, a value significantly larger than h□ = 0.3 cm^{-1} (Supplementary Figure 2c). Spin quantitation indicates that the $S = 3/2$ species accounts for less than 0.05 spin/enzyme.

Supplementary Note 3. Analysis of the unusual Fe/S_1 redox behaviour

To analyze the unusual redox behavior of the Fe/S_1 [4Fe-4S] cluster, a simple model of two magnetically interacting [Fe-S] clusters (Fe/S_1 and Fe/S_2) having independent redox properties was used. Three different redox states can be distinguished, including the oxidized state S_0, the mono-reduced state S_1 in which only Fe/S_1 is reduced, and the bi-reduced S_2 state giving a signal of magnetically coupled centers. E^0_1 and E^0_2 are the standard potentials associated to the two following redox transitions, respectively: $S_0 + e^- = S_1$, $S_1 + e^- = S_2$. The normalized molar fraction f_0, f_1 and f_2 of each state S_0, S_1 and S_2, respectively, verify $f_0 + f_1 + f_2 = 1$. Using the Nernst equation, they can be expressed as a function of the ambient redox potential E, the reduction potential of Fe/S_1 (E^0_1) and that of Fe/S_2 (E^0_2). For instance,

$$f_0 = 1/(1+\exp(a(E^0_1 - E)))$$

$$f_2 = 1/(1+\exp(a(E - E^0_2)))$$

At a particular magnetic field value, the amplitude of the EPR signal A_{tot} can be expressed as a linear combination of the EPR amplitudes given by the Fe/S_1 signal and that of magnetically coupled Fe/S_1 and Fe/S_2 clusters, which are proportional to f_1 and f_2, respectively:

$$A_{tot} = a_1 \times f_1 + a_2 \times f_2.$$

The parameters a_1, a_2, E^0_1 and E^0_2 were then adjusted to best fit the experimental data points, leading to $a1 = 1.45$, $a2 = 0.33$, $E^0_1 = -302$ mV and $E^0_2 = -379$ mV.

Supplementary Note 4. Theoretical model for quantitative analysis of the temperature dependence of the S = 3/2 EPR signal

The standard model describing the EPR properties of a S = 3/2 system involves the following spin Hamiltonian:

$$H_S = D\,(S_Z^2 - S(S+1)/3 + E\,(S_X^2 - S_Y^2) + b\,(g_1 S_X B_X + g_2 S_Y B_Y + g_3 S_Z B_Z)$$

where D and E are the axial and rhombic zero-field splitting parameters, respectively, g_1, g_2, and g_3 the principal components of the g-matrix, B_X, B_Y, B_Z the coordinates of the magnetic field B in the {X, Y, Z} frame. The degeneracy of the $\{|3/2, M_S>\}$ spin states is partly removed by the zero-field splitting terms, which give rise to the two Kramers doublets separated by $D = 2\,|D|(1 + 3R^2)^{1/2}$, where R = E/D. The degeneracy of the doublets is removed in turn by the Zeeman terms.

The $g \sim 5$ part of the spectrum was recorded in nonsaturating conditions between 4 and 50 K. The areas under the $g_{eff1} = 5.45$ and $g_{eff2} = 5.19$ peaks, hereafter referred to as A_1 and A_2, respectively, were evaluated by simulating the signal as the sum of two Gaussian components whose amplitudes were adjusted independently at each temperature. The line widths were found to be essentially constant in the investigated temperature range. When $h\square << D$ is satisfied ($\square$ is the microwave frequency), the A_1/A_2 ratio satisfies[20]

$$A_1/A_2 = (g_{P1}D_1/g_{P2}D_2)\exp(D/k_BT) \quad \text{(Eq. 1)}$$

where k_B is Boltzmann's constant, g_{Pk} (k = 1, 2) is the intensity factor introduced by Aasa and Vanngard to account for the transition probability[21], and D_k is the density of resonance lines at $B = B_k$. The natural logarithm of the A_1/A_2 ratio was then plotted against the reciprocal of the temperature. Determination of the slope of the straight line fitted to the experimental data points allowed us to estimate the energy separation D between the two Kramers doublets. The quoted

error on D was deduced from the standard error on the slope value given by the fit based on least-square analysis.

References

1. Arias-Cartín, R. *et al.* Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **298**, 101384 (2022).

2. Oliveira, A. R. *et al.* Toward the Mechanistic Understanding of Enzymatic CO2 Reduction. *ACS Catal.* **10**, 3844–3856 (2020).

3. Gladyshev, V. N. *et al.* Characterization of crystalline formate dehydrogenase H from Escherichia coli. Stabilization, EPR spectroscopy, and preliminary crystallographic analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 8095–8100 (1996).

4. Duffus, B. R., Gauglitz, M., Teutloff, C. & Leimkühler, S. Redox potentials elucidate the electron transfer pathway of NAD+-dependent formate dehydrogenases. *J. Inorg. Biochem.* **253**, 112487 (2024).

5. Brondino, C. D., Rivas, M. G., Romão, M. J., Moura, J. J. G. & Moura, I. Structural and electron paramagnetic resonance (EPR) studies of mononuclear molybdenum enzymes from sulfate-reducing bacteria. *Acc. Chem. Res.* **39**, 788–796 (2006).

6. Harmer, J. R., Hakopian, S., Niks, D., Hille, R. & Bernhardt, P. V. Redox Characterization of the Complex Molybdenum Enzyme Formate Dehydrogenase from Cupriavidus necator. *J. Am. Chem. Soc.* (2023) doi:10.1021/jacs.3c10199.

7. Friedrich, T. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 134–146 (1998).

8. Ohnishi, T. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 186–206 (1998).

9. Yakovlev, G., Reda, T. & Hirst, J. Reevaluating the relationship between EPR spectra and enzyme structure for the iron–sulfur clusters in NADH:quinone oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12720–12725 (2007).

10. Jollie, D. R. & Lipscomb, J. D. Formate dehydrogenase from Methylosinus trichosporium OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors. *J. Biol. Chem.* **266**, 21853–21863 (1991).

11. Artz, J. H. *et al.* Reduction Potentials of [FeFe]-Hydrogenase Accessory Iron–Sulfur Clusters Provide Insights into the Energetics of Proton Reduction Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 9544–9550 (2017).

12. Guigliarelli, B. *et al.* Structural organization of the iron-sulfur centers in Synechocystis 6803 photosystem I. EPR study of oriented thylakoid membranes and analysis of the magnetic interactions. *J. Biol. Chem.* **268**, 900–908 (1993).

13. Pieulle, L. *et al.* Isolation and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio africanus. *Biochim. Biophys. Acta* **1250**, 49–59 (1995).

14. Maguire, J. J., Johnson, M. K., Morningstar, J. E., Ackrell, B. A. & Kearney, E. B. Electron paramagnetic resonance studies of mammalian succinate dehydrogenase. Detection of the tetranuclear cluster S2. *J. Biol. Chem.* **260**, 10909–10912 (1985).

15. Gauquelin, C. *et al.* Roles of the F-domain in [FeFe] hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1859**, 69–77 (2018).

16. Rothery, R. A. *et al.* The catalytic subunit of Escherichia coli nitrate reductase A contains a novel [4Fe-4S] cluster with a high-spin ground state. *Biochemistry* **43**, 5324–5333 (2004).

17. Lanciano, P., Magalon, A., Bertrand, P., Guigliarelli, B. & Grimaldi, S. High-stability semiquinone intermediate in nitrate reductase A (NarGHI) from Escherichia coli is located in a quinol oxidation site close to heme bD. *Biochemistry* **46**, 5323–5329 (2007).

18. Duderstadt, R. E., Brereton, P. S., Adams, M. W. & Johnson, M. K. A pure S = 3/2 [Fe4S4]+ cluster in the A33Y variant of Pyrococcus furiosus ferredoxin. *FEBS Lett.* **454**, 21–26 (1999).

19. Hagen, W. R. EPR Spectroscopy of Iron—Sulfur Proteins. in *Advances in Inorganic Chemistry* (ed. Cammack, R.) vol. 38 165–222 (Academic Press, 1992).

20. Lanciano, P. *et al.* New method for the spin quantitation of [4Fe-4S](+) clusters with S = (3)/(2). Application to the FS0 center of the NarGHI nitrate reductase from Escherichia coli. *J. Phys. Chem. B* **111**, 13632–13637 (2007).

21. Aasa, R. & Vänngård, T. EPR signal intensity and powder shapes: A reexamination. *J. Magn. Reson. 1969* **19**, 308–315 (1975).

Informations complémentaires

Le manuscrit Broc et al. a été rédigé dans un format court pour une soumission à NSMB. Certains éléments tels que le rôle du centre [2Fe-2S] dans ForC, la zone d'interaction entre ForC et ForE ou encore l'environnement proche du site actifs n'ont pas pu être commenté dans le manuscrit, et seront abordés dans la discussion générale.

Par ailleurs, je souhaite ici apporter des informations complémentaires concernant l'étude de l'interaction du complexe ForCE avec la membrane présentée dans l'article soumis. L'oxygraphie est une technique permettant d'évaluer de manière indirecte l'interaction d'une oxydoréductase avec le pool de quinones situé dans la membrane. Il ne peut donc pas être exclu que l'enzyme ForCE connecte la membrane *via* un partenaire protéique non identifié. Plusieurs approches expérimentales complémentaires ont donc été réalisées afin de démontrer l'interaction du complexe ForCE1 avec la membrane de manière plus directe.

Le fractionnement cellulaire présenté dans la Table 1 montre que l'enzyme est majoritairement retrouvée dans la fraction cytoplasmique.

	Activité totale (µmol/min/mL)		Activité (%)	
Fraction	**SDH**	**FDH**	**SDH**	**FDH**
Totale	3,6 ± 1,26	19,9 ± 0,84	100	100
Membranaire	1,11 ± 0,08	0,98 ± 0,033	30,7	4,95
Cytoplasmique	nd	14,9 ± 0,35	nd	75

Table 2 : L'activité FDH de ForCE1 est majoritairement retrouvée dans la fraction cytoplasmique

L'enzyme ForCE1 a été surproduite dans *B. subtilis* cultivée en milieu riche LB. Les cellules ont été cassées par l'ajout de lysozyme à 1mg/mL final et par une mise sous pression à 1Kbar en utilisant une presse de French. Les fractions membranaire et cytoplasmique sont été séparées par deux étapes d'ultracentrifugation successives. Les activités formiate :BV oxydoréductase (FDH) ont été mesurées dans du tampon CHES 25mM à pH10, en présence de 35mM de formiate et 12.5mM de benzyl viologen (BV). Les activités succinate :DCPIP oxydoréductase (SDH) ont été mesurées en dans du tampon phosphate 50mM à pH7, en présence de 0.3mM de DCPIP, 0.4mM de PMS et 0.4mM de succinate.

Ce résultat est cohérent avec le protocole de purification dans lequel aucun détergent est ajouté. En réalité, le fractionnement cellulaire n'est pas une technique très adaptée pour étudier la localisation subcellulaire d'enzymes monotopiques. En effet, ces dernières sont faiblement attachées à la membrane via une interaction amphipatique sujette à perturbation dans les

conditions *in vitro*, tandis que la quasi-totalité de leur surface est localisée dans le compartiment soluble (Balali-Mood, Bond, et Sansom 2009). Ainsi, une deuxième approche impliquant l'utilisation de nanodisques de lipides a été employée en collaboration avec Victoria Schmitt (LISM, Marseille). Les nanodisques sont formés à partir de polymères de plastique capables de s'enchâsser dans les bicouches lipidiques et d'en extraire des fragments sous une forme soluble (Dörr et al. 2014). Cette technologie s'avère indispensable pour décrire l'environnement natif du système membranaire étudié, certains lipides plus affins du système sont ainsi isolés. L'objectif ici était différent et consistait à étudier *in vitro* l'interaction entre le complexe ForCE1 et les lipides piégés dans les nanodisques. L'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille permettait alors de distinguer le complexe formé par les nanodisques et ForCE1 des autres états. Malgré plusieurs tentatives de mise au point, l'agrégation de la protéine en présence de nanodisques a rendu les résultats ininterprétables. L'une des explications pourrait reposer sur la nature du polymère choisi, le « styrene-maléic acid » (SMA), dont les propriétés physico-chimiques ne seraient pas optimales pour l'interaction avec ForCE1. En effet, ce polymère est chargé négativement et peut interagir avec les zones chargées positivement en surface de la protéine. L'une des pistes d'amélioration consiste à renouveler l'expérience avec un polymère neutre (Glueck 2022). Si la participation d'un partenaire supplémentaire dans l'interaction avec la membrane ne peut être exclue à ce stade, elle n'est pas probable pour les raisons suivantes. Hormis l'absence de synténie avec un gène codant pour une protéine disposant de segments transmembranaires, la présence de lipides dans la structure de ForCE1 et la perte d'activité respiratoire avec les variants du domaine HMP sont des éléments forts en faveur d'une interaction directe entre ForCE et la membrane. L'approche pourrait néanmoins reposer sur l'emploi d'un agent pontant ou de la technique APEX (Santin et al. 2018) afin d'identifier le proxisome du complexe ForCE1. Plus généralement, il est à noter que l'interaction de l'hydrogénase HucSLM avec la membrane a également été démontrée de manière indirecte par oxygraphie (Grinter et al. 2023; Cordero et al. 2019), suggérant que ForCE et HucSLM adoptent un comportement similaire post-purification rendant difficile leur manipulation en présence de lipides par exemple.

Partie 2 : Le métabolisme du formiate chez *Bacillus subtilis*

La découverte des FDH chez *Bacillus subtilis* a révélé l'existence d'un métabolisme du formiate insoupçonné chez cette bactérie et a soulevé des questions concernant la source de formiate. Les expériences d'oxygraphie réalisées sur cellules entières ont montré que le formiate exogène est une source d'électrons *forCE* dépendante, suggérant que ce dernier pénètre dans les cellules. Pour confirmer cela, nous avons réalisé un suivi de croissance couplé à une mesure de la concentration extracellulaire en formiate par RMN. Nous avons trouvé que le formiate est consommé rapidement par les cellules. De ce fait, nous nous sommes demandé comment ce dernier traverse-t-il la membrane cellulaire ? Comme évoqué dans l'introduction (section C - chapitre 1), il existe chez les microorganismes des transporteurs spécifique du formiate. La présence d'homologues a donc été recherchée chez *B. subtilis* et la capacité des candidats identifiés à importer le formiate a été testée en délétant les gènes cibles et en dosant le formiate au cours de la croissance. Par ailleurs, la démonstration que ForCE1 et ForCE2 sont des déshydrogénases primaires questionne sur l'importance relative de ces 2 enzymes, et dans quelles conditions de croissance interviennent-elles. En effet, dans les conditions de croissance utilisées en laboratoire (milieu minimum glucose à pH7), il n'y a pas de différence de croissance entre les souches WT et *ΔforC1ΔforC2* en présence ou en absence de formiate. *B. subtilis* est retrouvée dans des environnements où le formiate est présent (Mielnik et al. 2018) . Lorsque le pH diminue, le formiate coexiste avec l'acide formique et celui-ci diffuse à travers les membranes. L'acide formique est un acide organique faible qui peut créer une acidification du cytoplasme. Le pouvoir antimicrobien de nombreux acides faibles a été étudié (Azeredo et al. 2016 ; Gabba et al. 2020 ; Moro et al. 2022), en revanche le stress acide formique a seulement été étudié chez la levure (Zheng et al. 2011). Ainsi, nous avons testé l'importance des ForCEs pendant la croissance de *B. subtilis* à pH acide en présence de formiate/acide formique, situation qu'il peut rencontrer dans le sol par exemple. Des suivis de croissance à pH acide en présence de concentrations croissantes de formiate ont été réalisés avec *B. subtilis* et des souches pour lesquelles les gènes impliquées dans le métabolisme du formiate ont été inactivés.

Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme d'un manuscrit en cours de rédaction, dans lequel je figure en qualité de première auteure. De ma propre initiative, j'ai souhaité me confronter à l'exercice de rédaction d'un article scientifique en entier. J'ai donc fait le choix personnel de rédiger la seconde partie de mes résultats en anglais sous la forme d'une publication. Je suis consciente que le manuscrit présenté n'est pas publiable en l'état, et que des expériences complémentaires doivent être réalisées pour développer certains points. La majorité des résultats qui y figurent ont été obtenus durant les 6 derniers mois de ma thèse, et j'ai œuvré au mieux afin que cette section de résultats soit la plus complète possible.

Mes contributions :

Dans ce manuscrit, j'ai contribué à la réflexion, la conception et la réalisation des expériences. J'ai également supervisé une étudiante en première année de thèse, qui assure maintenant la continuité du projet.

A respiratory FDH helps to cope with formic acid stress

Marianne Broc[1], Laura Lizen[1], Laëtitia Shintu[2], Séverine Gagnot[1], Olivier Bornet[3], Axel Magalon[1] and Anne Walburger[1]

[1] Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR7283), IMM, IM2B, 13009 Marseille, France.
[2] Aix Marseille Université, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (UMR7313), 13013 Marseille, France.
[3] Aix Marseille Université, CNRS, Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IFR88), 13013 Marseille, France.

Abstract

Weak organic acids are widely used to prevent growth of spoilage organisms such as *Bacilli*. However, the effect of formate was poorly studied while it was recently shown that *Bacillus subtilis* is able to use a formate-oxygen respiratory chain. Low concentration of formate increases the lag phase of *B. subtilis* grown at pH 5.8. Formate is uptaken by WT cells and oxidized in a FDH (ForCE2) dependent manner. Consequently, formate toxicity is exacerbated in absence of *forC2*. The gene *yrhG* encodes a formate transporter belonging to the FNT family but its inactivation has not impact on the sensibility of *B. subtilis* to formic acid. Finally, isolation of a highly formate-tolerant strain in these conditions opens up new perspectives to better understand the physiological determinants of microbial acid stress tolerance.

Introduction

Formate is a metabolic end product of many different microorganisms that often functions as a shared metabolite in microbial consortia for interspecies electron transfer, such as in the case of dihydrogen (Moon et al. 2023; De Bok, Luijten, et Stams 2002; McDaniel et al. 2023). Within these consortia, it can serve as a carbon or energy source, thanks to Mo/W-dependent enzymes belonging to the formate dehydrogenase family (Grimaldi 2013), and as substrate in purine metabolism. Formate is present in various ecological niches, including soils, atmospheric air, mammalian digestive systems, and hydrothermal vents (Mielnik et al. 2018; Lang et al. 2018; Huang et al. 2008; Pietzke, Meiser, et Vazquez 2020). As a weak organic acid (WOA) with a pKa of 3.75, formic acid can passively diffuse across biological membranes under low acid conditions. WOAs are often used as antimicrobials and food preservatives due to their ability to acidify the cytoplasm by releasing a proton (Azeredo et al. 2016; Moro et al. 2022; Booth et Stratford 2003). Common food spoilage organisms, such as *Bacillus cereus* or *Bacillus subtilis*, are often used as model organisms to study the mechanisms of tolerance displayed by these organisms upon WOA exposure. Strategies identified to date involve maintaining intracellular pH homeostasis, addressing the consequences of acid stress, or dealing with anion accumulation (Ter Beek et al. 2015; Van Beilen et al. 2014; Beek et al. 2008; Mols et Abee 2011; Kitko et al. 2009) Cellular responses to WOA are complex and varied, with no single mechanism being able to fully explain toxicity. To date, one considers that different pK_A and hydrophilicity values (as estimated through octanol-water partition

coefficient) impact membrane diffusion and solubility, ultimately influencing the response of the microorganism (Ter Beek et al. 2015).
Interestingly, among WOAs, formate has received little attention. Formate metabolism was recently discovered in *B. subtilis* with the characterization of two formate dehydrogenases ForCE, part of the aerobic electron transfer chain (Arias-Cartín et al. 2022 *; Broc et al.*) Functioning of this chain is associated with the net release of protons in the periplasm and might be seen as an additional mean for coping with acidification of the cytoplasm upon formic acid exposure. *Interestingly, genes encoding these enzymes, forCE1 and/or forCE2 were* found upregulated in response to high concentration of WOA at acidic pH (Kitko et al. 2009; Ter Beek et al. 2015) and *forC2* was upregulated by acidic pH (Wilks et al. 2009). Moreover, *forCE1* is likely part of the *sigB* regulon which is activated in conditions of WOA stress (Mols et Abee 2011; Ter Beek et al. 2015; Kitko et al. 2009). In this study, we investigate the consequences of formic acid in *B. subtilis* and explore the role of formate dehydrogenase activity and formate transporter in this process.

Results

Formate/formic acid is bacteriostatic and increases the growth rate

Adding formate to the growth medium, which is buffered at pH 5.8, at a concentration of up to 20 mM delays the entry of bacterial cells into the exponential phase, as shown in Figure 1A. Notably, the lag phase becomes more pronounced as the concentration of formate increases. For instance, at 2 and 4 mM, there is no appreciable difference in the lag phase when compared to the formate-free condition. However, at 6 mM, the lag phase begins to extend, and the cells start to enter the exponential phase after approximately 45 minutes. At 8 mM, the lag phase is approximately 1 hour, and at 12.5 mM, it extends to 2 hours and a half. Finally, at 15 mM and 20 mM, the lag phase reaches approximately 4 and 9 hours, respectively. These findings differ markedly from those obtained with other WOAs like acetic acid or sorbic acid, where no cell growth retardation has been reported (Ter Beek et al. 2015; Kitko et al. 2009; Van Beilen et al. 2014; Beek et al. 2008). Additionally, there is a notable reduction of the generation time (GT) when the cells enter the exponential phase in the presence of formate The GT progressively decreases with an increasing concentration of formate, ultimately reaching 95 minutes at a concentration of 12.5M, compared to 115 minutes in its absence (Figure 1A). Formate has initially a bacteriostatic effect on the growth of *B. subtilis*, but it subsequently promotes growth. These findings were supported by tests on solid medium, which showed that after 18 h of incubation, cells grown in presence of 8 mM formate formed smaller colonies than those grown with 2 mM formate but yielding equivalent CFU/mL values (Figure 1B). Moreover, with longer incubation times, previously undetectable colonies became countable, reaching quantities equivalent to the CFU/mL recorded at lower concentrations (Figure S1). It is worth noting that at high cell densities, 2 to 6 mM of formate increased the spread of colonies on M9-agar after 18 h at 37°C (Figure 1B).
To evaluate if the increase in lag phase at pH 5.8 is attributable to the effect of formic acid, identical experiments were performed at neutral pH, where the concentration of formic acid is reduced 15-fold (Figure S2). At this pH, cells grow equally well in the presence or absence of up to 12.5 mM formate in liquid medium and up to 30 mM in solid medium. To conclude, it can be inferred that the increase in formic acid concentration is correlated with an increase in lag phase.

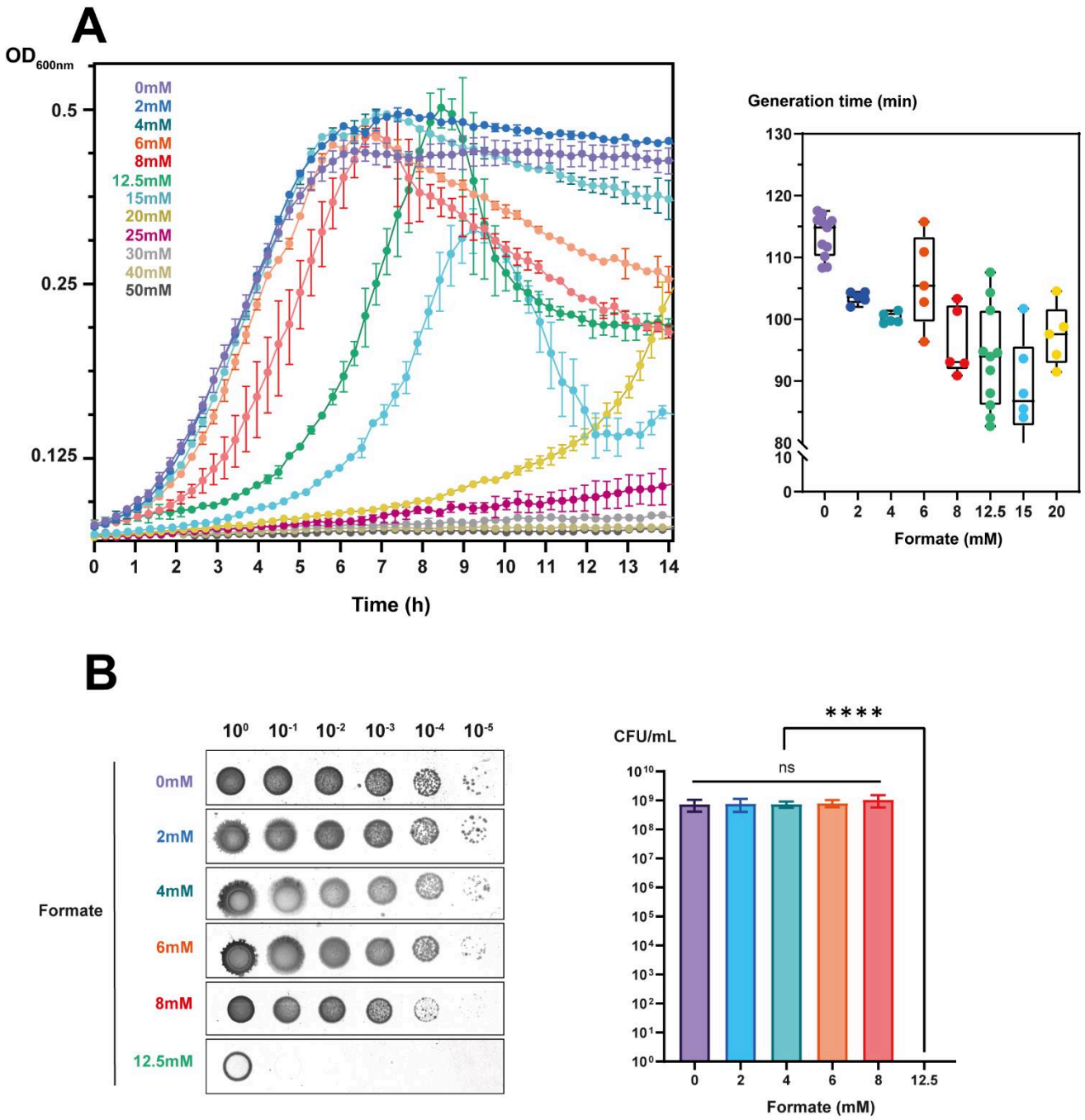


Figure 1: Formate is bacteriostatic at pH 5.8

WT strain was cultivated in M9 medium at pH 5.8 supplemented with different concentrations of formate.

A: Left panel: growth curves of cells cultivated in liquid medium supplemented with formate (from 2 to 50 mM). Standard deviations represent the mean of at least two biological replicates. **Right panel**: respective generation times were calculated for each growth curve and boxplotted. Each mark represents a technical replicate.

B: Left panel: serial dilutions of the cells plated on solid medium supplemented with formate (from 2 to 12.5 mM). Images were acquired after 18h of incubation. **Right panel**: corresponding CFU/mL were determined by counting each apparent colony on plate (without considering the size of the colony) and plotted as a histogram. Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates. Statistical analysis was performed using a Tukey test (P-value: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****)).

Deletion of *forC2* sensitizes B. subtilis to formic acid

The acceleration of the growth rate may be attributed to the exploitation of formate in the cytoplasm by FDH. To evaluate this hypothesis, the relative contribution of each of the two FDH was determined by inactivating the gene encoding the corresponding catalytic subunits, ForC1 and ForC2.

The first observation is the increased sensitivity of the *forC2* strain to formate at pH 5.8, as evidenced by a significant increase in generation time, reaching a value of approximately 270 minutes at 12.5 mM (Figure 2A). While the delay in entering the exponential phase is less pronounced than in the parental strain, a slight biphasic behavior of the growth curve can be observed. Furthermore, the enhanced sensitivity of the strain is manifested in its bacteriostatic behavior, as evidenced by a minimum inhibitory concentration half that of the wild-type strain (6 mM vs 12.5 mM) (Figure 2B). Moreover, even after 39 h of incubation, cells are unable to form colonies in presence of 12.5 mM formate (Figure S1B). At pH7, the proportion of formic acid is reduced by 15 times, and the inactivation of *forC2* does not impact the growth of the cells even in presence of 30mM of formate (Figure S2). Notably, formate exacerbates the spread of the colonies in the *forC2* mutant strain. The inactivation of *forC1* does not impact the growth on solid medium in presence of different concentration of formate at pH 5.8 (Figure S3), as the *forC1* mutant grows as the WT and the *forC1forC2* double mutant grows as the *ΔforC2* mutant. Altogether, these results highlighted the importance of ForCE2 in response to formic acid stress, its inactivation sensitizing *B. subtilis* to formic acid.

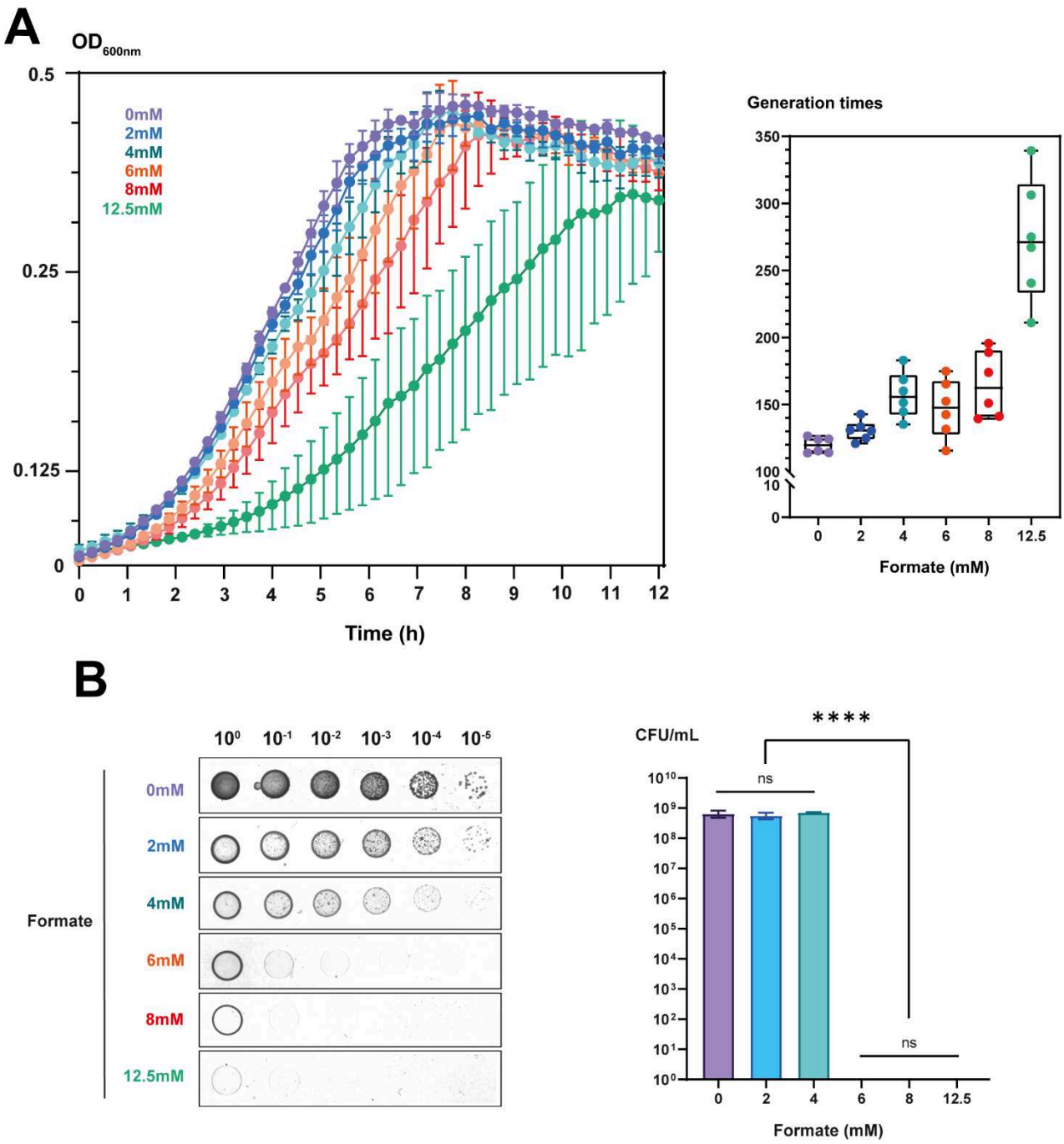


Figure 2: Deletion of *forC2* sensitizes *B. subtilis* to formate

The *forC2* strain was cultivated in M9 medium at pH5.8 supplemented with different concentrations of formate.

A: Left panel: growth curves of cells cultivated in liquid medium supplemented with formate (from 2 to 12.5 mM). Standard deviations represent the mean of at least two biological replicates. **Right panel:** respective generation times were calculated for each growth curves and boxplotted. Each mark represents a technical replicate.

B: Left panel: serial dilutions of the cells plated on solid medium supplemented with formate (from 2 to 12.5 mM). Images were acquired after 18h of incubation. **Right panel:** corresponding CFU/mL were determined by counting each apparent colony on plate (without considering the size of the colony) and plotted as a histogram. Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates. Statistical analysis was performed using a Tukey test (P-value: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****)).

WT cell quickly oxidize formate and the *forC2* strain keeps formate out of the cell

Intracellular formate oxidation mediated by ForCE2 may help mitigate formic acid stress and could potentially account for the difference in formic acid sensitivity between the WT and the *forC2* strains. To test this hypothesis, we measured the extracellular formate concentration during the growth of both strains at pH 5.8, which served as a proxy for intracellular formate oxidation. The growth of the WT and *forC2* strains was monitored in minimal medium supplemented with 2 mM of formate, and the extracellular formate concentrations were measured at mid-log and stationary phases (Figure 3A). As shown, WT cells rapidly consume formate, with only 36% remaining extracellular at mid-log and no formate detected at stationary phase. This disappearance of formate from the extracellular medium is likely due to the oxidizing activity of ForCE2, as the extracellular concentration of formate remains constant during the growth of the *forC2* strain. Nevertheless, to explain the increased sensitivity of the *forC2* strain to formic acid stress, it is hypothesized that formic acid is imported and formate is exported, creating a continuous cycle of formic acid import and formate export. This cycle would require the cell to constantly manage an influx of protons. This hypothesis is also based on the existence of a formate transporter whose identity remains elusive.

A

Time (h)	WT		*ΔforC2*	
	OD_{600nm}	% of extracellular formate	OD_{600nm}	% of extracellular formate
0	0,05	100 ± 2,3	0,05	100 ± 0,53
4	0,38 ± 0,02	35,7 ± 3,4	0,49 ± 0,05	90,6 ± 0,2
7,3	2,1 ± 0,14	0	0,98 ± 0,12	97 ± 3,1

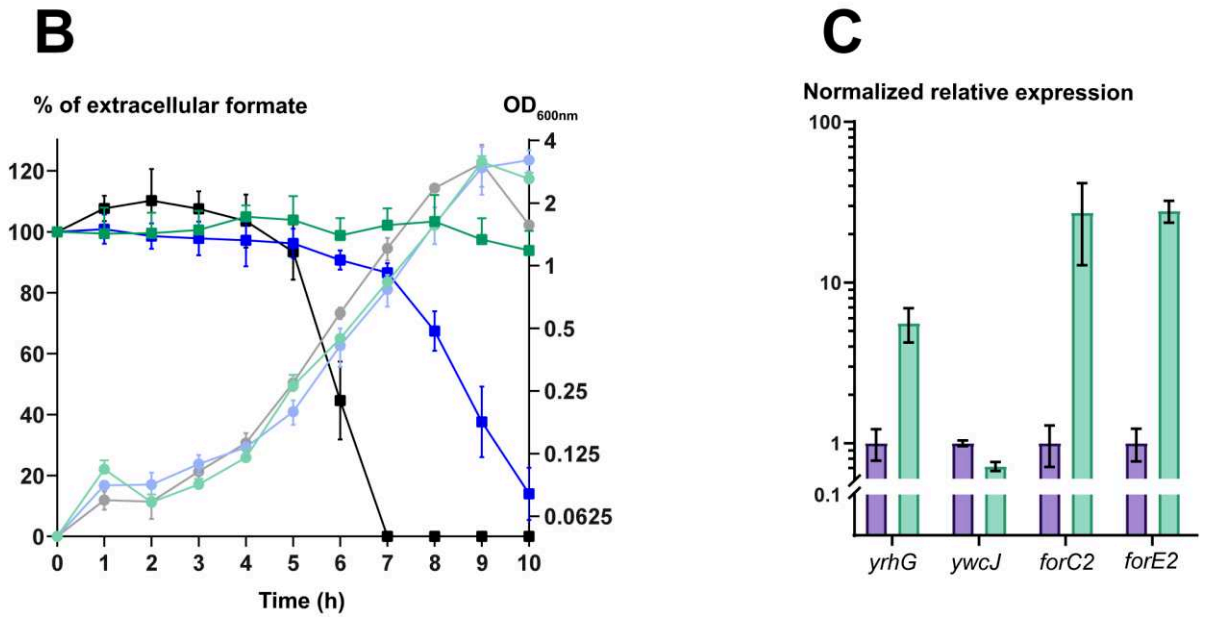


Figure 3: Extracellular formate uptake rely on YrhG and passive diffusion.

A: Extracellular formate concentration was followed over growth in the WT (black) and *ΔforC2* strain (green). Cells were grown in M9 minimal medium at pH 5.8 supplemented with 2mM formate. Growth was followed by spectrophotometry at 600nm and extracellular formate concentration was measured by liquid-NMR. Standard deviations represent the mean of at least two biological replicates.

B: Kinetic of extracellular formate consumption during growth of the WT (black), *ΔyrhG* (blue) and *ΔforC1ΔforC2* (green) strains. Cells were grown in M9 minimal medium at pH 7 supplemented with 2mM formate. Growth was followed by spectrophotometry at 600nm and extracellular formate concentration was measured by liquid-NMR. Standard deviations represent the mean of at least two biological replicates. OD values are represented by transparent curves with circles marks and formate concentrations are represented by opaque curves with square mark. Generation times were calculated: 58min ± 7 for the WT strain, 60min ± 3 for the *ΔyrhG* strain and 70min ± 3 for the *ΔforC1ΔforC2* strain.

C: *yrhG* and *forCE2* are upregulated in presence of 12.5mM of formate, in the WT strain. Cells were grown in M9 medium at pH7 supplemented (green bars) or not (purple bars) with 12,5mM of formate. qRT-PCR experiments were performed on RNAs extracted from 10^9 cells. For each gene, relative expression in presence of 12,5mM formate was normalized to the formate free condition. Standard deviation represents the mean of at least two technical replicates.

YrhG is an FNT importing formate and is not involved in response to formic acid stress

Examining the genome of *B. subtilis*, we identified two putative transporters, YrhG and YwcJ, which were annotated as Formate Nitrite Transporters (FNTs) (Figure 4). FNTs are pentameric aquaporin-like transporters that catalyze the protonation-coupling translocation of anionic cargo molecules, such as formate, nitrite, lactate and hydrosulfide (Lü et al. 2013). The three well-characterized formate transporters FocA from *E. coli*, FdhC from *Methanobacterium formicicum,* as well as the nitrite transporter NirC from *E. coli,* all include a set of crucial amino acids that are necessary for the transport of substrates (Kammel, Trebbin, et Sawers 2022; Kammel et al. 2022). This essential consensus is also present in YrhG and YwcJ (Figure 4A). YrhG shares 45% of identity with FdhC which is consistent with the taxonomic distribution of the FdhC clade in Firmicutes (Figure 4B) (M. Mukherjee, Vajpai, et Sankararamakrishnan 2017).

A



B

	FdhC	FocA	NirC	YrhG	YwcJ
FdhC	100	29,2	30	45,6	23
FocA		100	25,4	30,3	27,6
NirC			100	28,4	32
YrhG				100	23,8
YwcJ					100

Figure 4: YrhG and YwcJ are Formate-Nitrite transporters (FNTs).

A: Sequence alignment of FdhC from *Methanobacterium formicicum*, FocA from *Escherichia coli* (P0AC23), YrhG from *Bacillus subtilis* (O05399), NirC from *Escherichia coli* (P0AC26*)* and YwcJ from *Bacillus subtilis* (P39608). Important conserved amino acids found in the canal of FNTs are pinpointed by brown (F202), blue (L79), fuchsia (L89), green (T91), pink (F202) and red (H209) stars (amino acids are numerated taking the sequence of FocA as reference). Residues are colored according to their conservation across the five sequences (black: 100%; dark grey: ≥ 80%; light grey ≥ 60%; white: ≤ 60%). Alignment was generated with Geneious software.

B: Percentage of identity between the previous sequences aligned 1 by 1. The highest scores of identities for YrhG and YwcJ are highlighted in yellow.

In addition, the gene *yrhG* is clustered with the *forCE2* operon in the genome of *B. subtilis*, which further supports the idea that YrhG is likely involved in formate transport. Concerning YwcJ, it bears an indistinguishable identity to that of formate or nitrite transporters, without offering any indication of the substrate being transported. We next addressed the participation of both putative FNTs to extracellular formate uptake at pH 7. After a period of 7 hours of growth at pH7, the formate present in the medium of the WT strain disappeared completely, as shown in Figure 3B. In contrast, 86% of the formate remained in the medium of the *yrhG* strain, which required more than 10 hours for complete disappearance. This suggests the presence of another formate transporter with lower specificity. As indicated in Figure S4, the deletion of *ywcJ* produced similar results to the WT strain. Additionally, the kinetic of the *ywcJ, yrhG* strain was delayed similarly to the *yrhG* mutant, indicating that YrhG is the primary formate transporter under these conditions. The qRT-PCR experiments showed that both the *forCE2* operon and *yrhG* were up-regulated by formate by 27-fold and 6-fold, respectively (Figure 3C). In contrast, *ywcJ* and *forC1* did not respond to formate. YrhG functions as a formate transporter in *B. subtilis*, and its inactivation could affect sensitivity to formic acid stress. Figure 5A demonstrates that the growth of the *yrhG.ywcJ* strain on solid medium is similarly affected by formate as compared to the WT strain. Moreover, the hypersensitivity of the *forC2* strain to formate is not influenced by the *yrhG* deletion. These findings suggest that YrhG and YwcJ are not involved in sensitivity to formic acid stress.

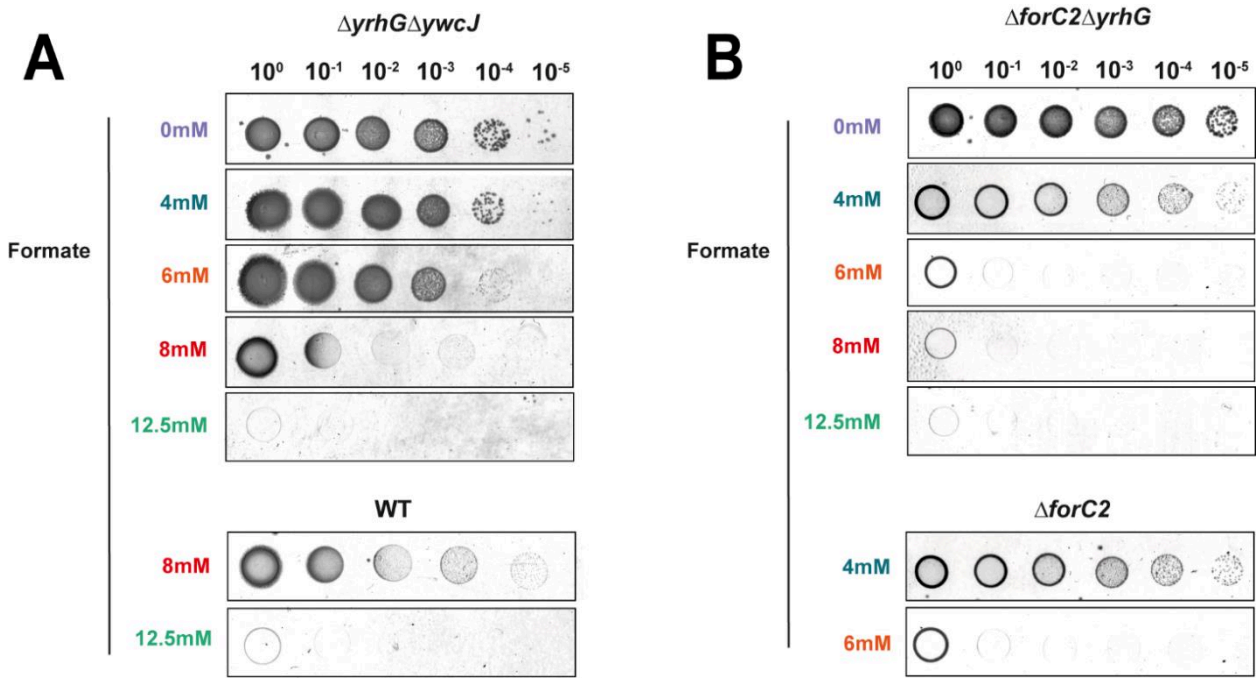


Figure 5: The formate transporter YrhG is not involved in formate toxicity in the WT and the *forC2* strains.

Serial dilutions of the *ΔyrhGΔywcJ* **(A)** and *ΔforC2ΔyrhG* **(B)** strains plated on solid M9 medium at pH5.5, supplemented with 0mM (purple), 4 (turquoise), 6mM (orange), 8mM (red) and 12.5mM (green) of formate. Images were respectively acquired after 18h and 21h of incubation. These experiments were not performed at the same time than those presented Figure 1 and 2. Thus, the parental strain used as internal control is depicted behind each panel at the relevant concentrations.

Isolation of a strain with high tolerance to formic acid

In order to decipher the strategies used by *B. subtilis* to cope with formic acid stress, we searched for suppressive mutations that would enable growth in presence of inhibitory concentrations of formic acid. For this purpose, 10^8 WT cells/mL were plated on solid medium at pH 5.8 and supplemented with 12.5 mM of formate. After a period of 12 hours, few isolated colonies appeared on the plate. These colonies were then individually selected and re-isolated on a selective medium before being designated as new strains, referred to as “MB” strains. After 36h of incubation, the initial plate was fully covered with bacteria, confirming that the MB strains were able to grow faster than the rest of the cells in these conditions. It is noticeable that the frequency of appearance of MB colonies was estimated at $2{,}3.10^{-7}$cells/mL. Then, growth curves and serial dilution experiments were performed with the MB1 strain using a panel of formate concentrations (Figure 6A et 6B). MB1 strain exhibits a reduce lag phase compared to the WT strain for equivalent concentrations of formate. 2 h of lag phase are required for MB1 and WT for 20 mM and 12.5 mM formate, respectively. Moreover, there is no lag phase for MB1 growing with 8 and 12.5 mM formate. On solid medium, the minimal inhibitory concentration of the MB1 strain is approximately 2.5 times higher than that of the WT strain. Thus, the MB1 strain is able to deal with higher concentration of formic acid than the WT strain. Unexpectedly, the GT of MB1 is increased compared to the WT strain (144 min *versus* 114). However, addition of formate increases the rate of growth with a concomitant decrease of the GT (115 min at 12.5mM formate) and the spreading of cells on solid medium. The MB1 was genome sequenced and was equivalent to the WT strain.

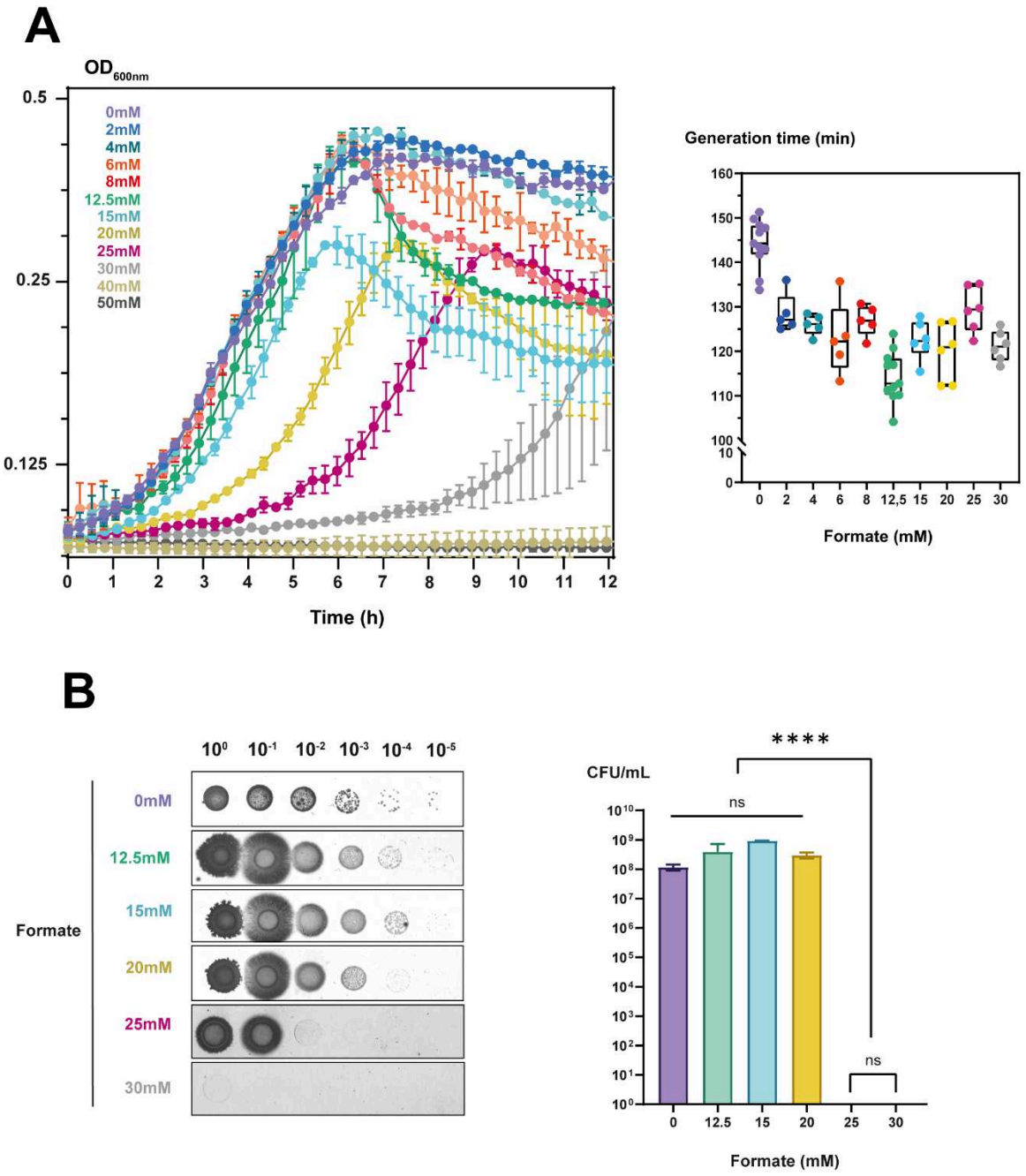


Figure 6: Tolerance of formate under acidic condition is enhanced in the MB1 strain.

The MB1 strain was cultivated in M9 medium at pH5.8 supplemented with different concentrations of formate.

A: Left panel: growth curves of cells cultivated in liquid medium supplemented with 0mM (purple), 2mM (blue), 4mM (turquoise), 6mM (orange), 8mM (red) and 12.5mM (green), 15mM (cyan), 20mM (yellow), 25mM (fuchsia), 30mM (grey), 40mM (dark yellow) and 50mM (dark grey) of formate. Standard deviations represent the mean of at least two biological replicates. **Right panel:** respective generation times were calculated for each growth curves and boxplotted. Each mark represents a technical replicate.

B: Left panel: serial dilutions of the cells plated on solid medium supplemented with 0mM, 12.5mM (green), 15mM (cyan), 20mM (yellow), 25mM (fuchsia) and 30mM (grey) of formate. Images were acquired after 19h of incubation. **Right panel:** corresponding CFU/mL were determined by counting each apparent colony on plate (without considering the size of the colony) and plotted as a histogram. Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates. Statistical analysis was performed using a Tukey test (P-value: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****)).

Discussion

Our study has demonstrated that the combined influence of acidic pH and the presence of formate can significantly affect the growth of *B. subtilis*. This is accompanied by a delay in growth, which is subsequently followed by an acceleration in generation time. This behavior is linked to the activity of the cell's FDH. Our findings have also identified the YrhG protein as the primary formate transporter responsible for this process. Remarquably, the growth of *B. subtilis* is significantly impacted by a concentration of formate as low as 12.5 mM at pH 5.8. These findings differ from previous studies (Beek et al. 2008; Ter Beek et al. 2015), which indicated that concentrations above 20 mM of WOA were required to affect *B. subtilis* growth. Moreover, formic acid is less hydrophobic than the aforementioned WOA compounds, benzoic and sorbic acid, as evidenced by their respective logP values (-0,54; 1,87 and 1,33, respectively) (pubchem data). The sequencing of the MB1 strain, which growth remains unaffected upon 8 mM of formate, may provide valuable insights into the potent effect of formic acid (Figure 6). Although the MB1 strain has already been sequenced, no differences were observed when compared to the WT strain. It is possible that large chromosome rearrangements could have evaded detection through short-read sequencing, warranting further analysis of this strain. The lag phase observed in with WT cells grown with formate at pH 5.8 (Figure 1) may be attributed to the bacteria requiring time to cope with excessive intracellular proton entry. The slightly impaired growth at pH 5.8, compared to pH 7 (110 versus 90 minutes), suggests that acidic pH has an impact on the bacteria's growth. Moreover, following a WOA stress, *Bacillus subtilis* decreases its pHi and rapidly restore it (Pandey et al. 2016). In contrast, the MB1 strain grown with 6, 8 and 12,5 mM of formate exhibits no lag phase or only a short lag phase. It must be noted that the MB1 strain grown without formate has a longer generation time compared to the WT strain, indicating that the MB1 strain has evolved an energy-intensive process to adapt to formic acid stress. Thus, the pHi homeostasis of the WT, *ΔforC2*, *ΔyrhG* and MB1 strains will be analyzed in the presence of formate at pH 5.8. Despite the added complexity of formate, it is expected that the strains will display varying abilities to restore their pHi to a suitable value. Upon entering the exponential phase, the cells exhibit a growth rate that is accelerated compared to conditions without formate (Figure 1). This could be attributed to the increased production of ForCE2, as formate has been shown to upregulate *forCE2* (Figure 3C). In fact, the decrease of GT is dependent on *forC2*, as the inactivation of *forC2* results in an increase of the GT, coinciding with an increase of formate concentration (Figure 2). Oxidizing formate through ForCE2 may also provide an advantage for cells to generate energy in the form of ATP (Broc et al.), as WOA mimic carbon starvation (Ter Beek et al. 2015). The proton balance of the oxidation of one molecule of formate by ForCE2 is one cytoplasmic proton consumed, as MK is the electron acceptor of ForCE2. Moreover, as MKH2 is the substrate of the bc1 complex and/or of the cytochrome oxidase, proton will be pumped from the cytoplasm to the periplasm, creating a proton gradient that can be utilized to generate ATP through the ATP synthase. The oxygen consumption rates of wild-type cells in presence of increase concentrations of formate, when exposed at pH 5.8 or 7, will be examined using oxygraphy. While it is expected that increasing concentrations of formate will enhance the cells' ability to consume dioxygen, the combined effect of acidic pH may provide valuable insights complementary to pHi measurements. Collectively, these findings could explain why *forC2* and *forE2* have been observed to be overexpressed under several WOA stresses (Kitko et al. 2009; Beek et al. 2008). It must be noted that the presence of formate during experiments on solid medium (Figure 1, 5, S1, S2, S3) increases the spreading of bacteria on the plates. At pH 5.8, this phenotype is *forC2* dependent as in absence of *forC2*, there are no more spreading. In contrast, at pH 7, spreading occurs both with the WT and the *ΔforC2* strain in presence of

formate. This may be indicative that formate induces swarming. This required to be tested in real swarming conditions, *ie* dedicated medium and low agar concentration. Indeed, *yrhG* displayed a gradual upregulation pattern among the swarmer populations (Dergham et al. 2023) and formate may increase the pmf which fuels the flagellum apparatus required for swarming. We have demonstrated that *B. subtilis* imports formate, and this import is *yrhG* dependent. In *E. coli*, formate transport through FocA is modulated by its interaction with the formate producing enzyme PflB (Beyer et al. 2013; Doberenz et al. 2014). Notably, it has been shown that efflux and influx of formate are blocked when FocA interacts with inactive PflB. However, in *Bacillus subtilis*, PflB is lacking, and it is unknown whether ForCE2 regulates the activity of YrhG. YwcJ is not involved in formate transport at pH7, but in these conditions, it is likely not expressed as it has been shown to be repressed by Rex, and its expression is induced at low oxygen tension (Larsson, Rogstam, et Von Wachenfeldt 2005). While we have demonstrated that YrhG is a FNT that transports formate (Figure 3 et 4), in the *ΔyrhG*, formate is still imported. We believe that this results from formic acid diffusion through membrane. This is corroborated by the fact that at pH 5.8, formate import is faster than at pH 7 with WT cells (36% remaining at pH 5.8 at mid-log phase compared to ~60% at pH 7). To go further, the kinetic of formate transport will be measured during the growth of WT and *ΔyrhG* strains at acidic and basic pH. It is anticipated that the formate uptake of *ΔyrhG* will be significantly reduced at pH 8 compared to 5.8, as the concentration of formic acid is very low at pH 8. The diffusion of formic acid may provide an explanation for the fact that the inactivation of *yrhG* does not impact the growth of cells. However, it is likely that the amount of formic acid that crosses the membrane at pH 5.8 is sufficient to impair the growth of *ΔyrhG* and *ΔyrhG ΔforC2* on solid media. To fully understand the effects of these deletions, it is necessary to measure the growth curves of *ΔyrhG* and *ΔyrhG ΔforC2* in liquid medium under formic acid stress, as the bacteriostatic effect of formate may have led to an underestimation of these effects on solid media.

Lastly, we have shown the importance of ForCE2 during formic acid stress. In a *ΔforC2* strain, the effect of formic acid stress is exacerbated and growth is inhibited (Figure 2 et 3). We have hypothesized that formic acid still enters the cell followed by formate extrusion. In the extracellular environment, the anion can reassociate with proton and diffuse back into the cell, thereby acidifying the cytoplasm further. In yeast, a dedicated ATP binding cassette (ABC) transporter, Pdr12 mediates energy-dependent extrusion of water-soluble carboxylate anions and thus prevents the accumulation of the anion S- (Piper 1998). Moreover, there is a sorbate resistance of the *B. subtilis yhcA* mutant, YhcA being a multidrug resistance transporter homologue part of the major facilitator superfamily(Beek et al. 2008). YhcA or other members from the major facilitator (MF) superfamily which are numerous in *B. subtilis* may be at play to extrude formate and increase formic acid effect This will require more investigations and isolation of the formate-resistant MB1 strain marks the initial stride towards comprehension of how *B. subtilis* cope with formic acid stress.

Material and methods

Strains construction

To generate *B. subtilis* (*BS*) 3610 *ΔforC1*, *ΔforC2, ΔforC1ΔforC2*, *ΔyrhG, ΔywcJ* and *ΔyrhGΔywcJ*, BS 3610 WT was transduced with phage SPP1 isolated from lysates of *BS* 168 *trpC2 ΔforC1:ery* (BKE12160), *ΔforC2:kan* (BKK27220), *ΔyrhG:ery* (BKE27200) and *ΔywcJ:kan* (BKK38060). To generate *BS* 3610 *ΔforC2ΔyrhG*, *BS* 3610 *ΔforC2* was transformed with genomic DNA *ΔyrhG:ery* using the competence medium from (Konkol, Blair, et Kearns 2013).

Growth curve experiments

One colony was cultivated overnight at 37°C in LB medium, then diluted 1/500 times in liquid M9 medium (Rasmussen, Nielsen, et Jarmer 2009) (pH7, without formate) and cultivated at 37°C until exponential phase. Then, OD_{600nm} was normalized at 0.05 in 1mL of M9 medium (pH7 or pH5.8, supplemented or not with formate and xylose when necessary) and 100uL are inoculated in a well from a 96-wells microtiter plate. The plate was incubated at 37°C for at least 7 hours in a microplate reader (Tecan infinite M200, orbital shaking with 4mm of amplitude (182.6 rpm), 25 flashes of measurement at 600 nm each 15 min). Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates. When specified, culture performed in Erlenmeyer were inoculated at 0.05 with an overnight preculture in M9 medium at pH7, and incubated at 37°C under agitation at 180rpm.

Serial dilution on agar plate and CFU/mL determination

One colony was cultivated overnight at 37°C in LB medium, then diluted 1/500 times and cultivated at 37°C in liquid M9 medium (ref) (pH7, without formate) until exponential phase. Then, 2 UDO_{600nm} are centrifuged and resuspended in 1 mL of M9 buffer, which corresponds to the 10^0 concentration. Cells were then serially diluted in M9 buffer until the dilution 10^{-6}, and 5 uL of each dilution were plated on solid M9 medium (pH7 or pH5.8, supplemented or not with formate and xylose when necessary). Plates were then incubated at 37°C for 40h. CFU/mL was determined by counting each apparent colony on plate (without considering the size of the colony). Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates.

qRT-PCR experiments

qRT-PCR analysis of the *forC2, forE2, forC1, yrhG* and *ywcJ* transcripts was performed in absence or presence of 12.5 mM formate. Values were normalized to the *16s* transcript. The value obtained for the condition minus formate was set to 1. RNAs were extracted from *B. subtilis* 3610 grown in M9 medium under rotation at 37°C until OD600nm, without or in presence of 12,5mM of formate.

NMR quantification of formate

Five hundred microliters were placed into a 5 mm NMR tube. Experiments were carried out on a Bruker Avance III spectrometer operating at 600 MHz for the 1 H frequency equipped with a TXI probe. A NOESY 1D pulse sequence experiment with a relaxation time of 17.5 s associated with a water presaturation pulse of 2.5 s and an acquisition time of 2.7 s was run on each sample at a temperature of 300 K. The mixing time was set to 10 ms.

Supplementary data

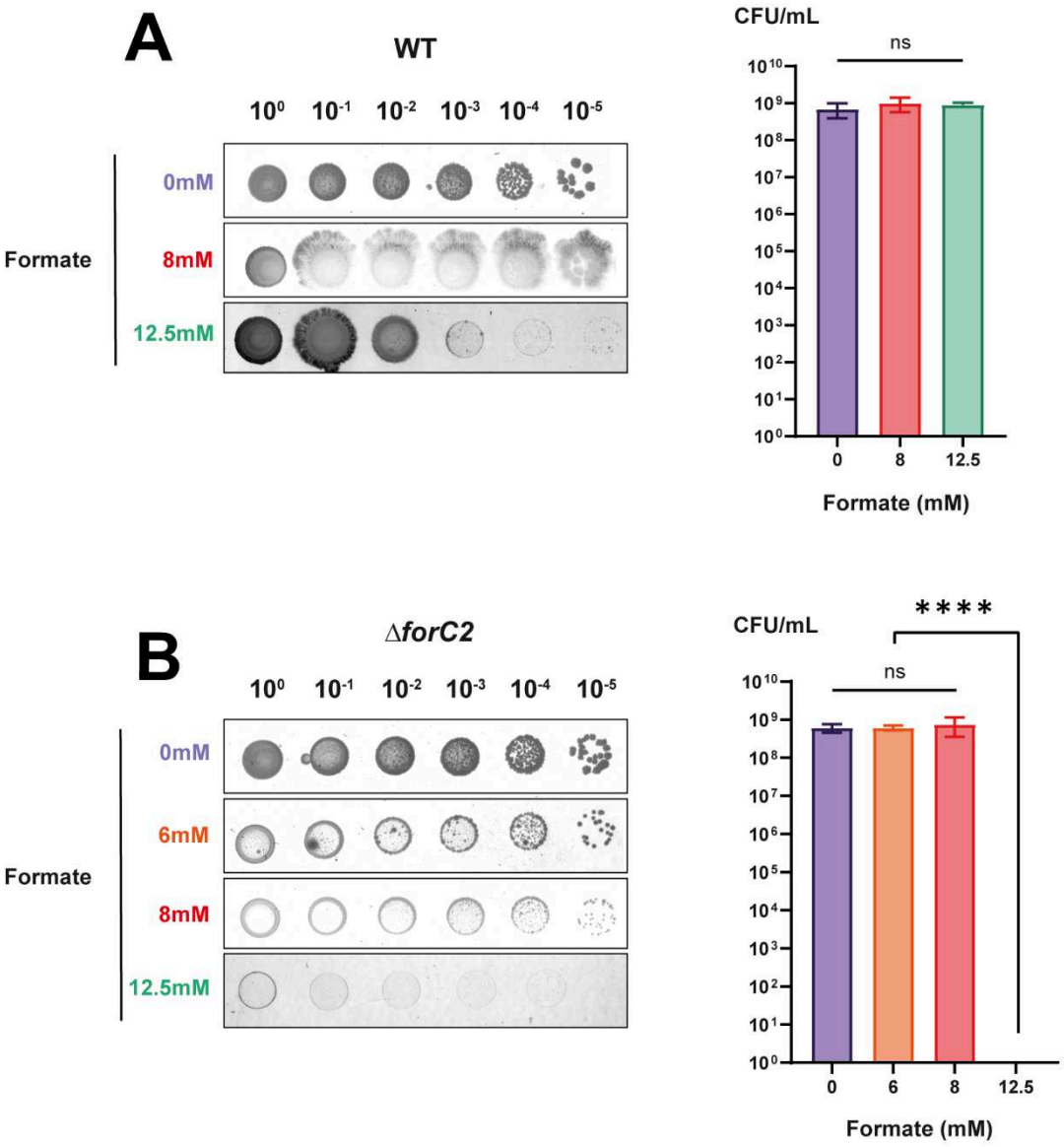


Figure S1: Growth of the WT and the *ΔforC2* strains at pH5.8 after 39h of incubation

Left panels: Serial dilutions of the cells plated on solid M9 medium at pH5.8, supplemented with 0mM (purple), 6mM (orange), 8mM (red) and 12.5mM (green) of formate. Images were acquired after 39h of incubation.

Right panels: Corresponding CFU/mL were determined by counting each apparent colony on plates (without considering the size of the colony) and plotted as a histogram. Standard deviation represents the mean of at least two biological replicates. Statistical analysis was performed using a Tukey test (P-value: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****)).

A: WT strain

B: *ΔforC2* strain

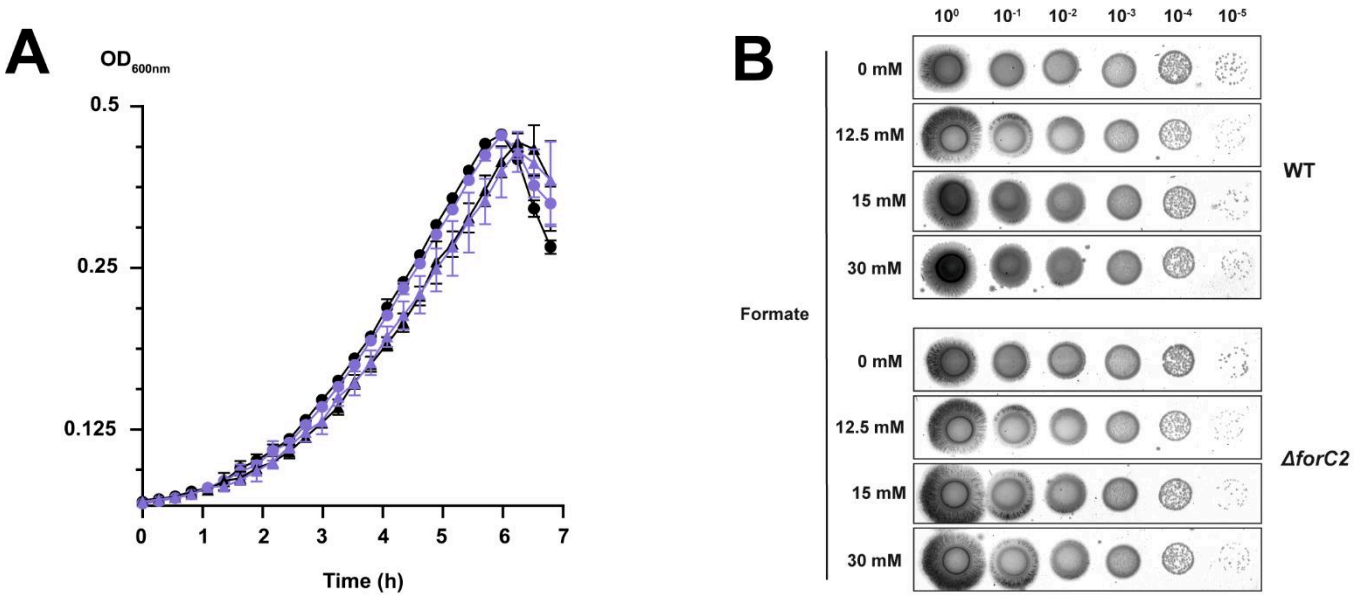


Figure S2: Addition of formate don't impact growth of the WT and *ΔforC2* strain at pH7

A: Growth curves of the WT (circles) and *ΔforC2* (triangles) cultivated in liquid M9 medium at pH7, supplemented (violet) or not (black) with 12.5mM of formate. OD was followed by spectrophotometry at 600nm over time. Standard deviation represents the mean of three biological replicates. **B:** Serial dilutions of the WT and *ΔforC2* strain plated on solid M9 medium at pH7, supplemented with different formate concentrations. Images were acquired after 14h of incubation.

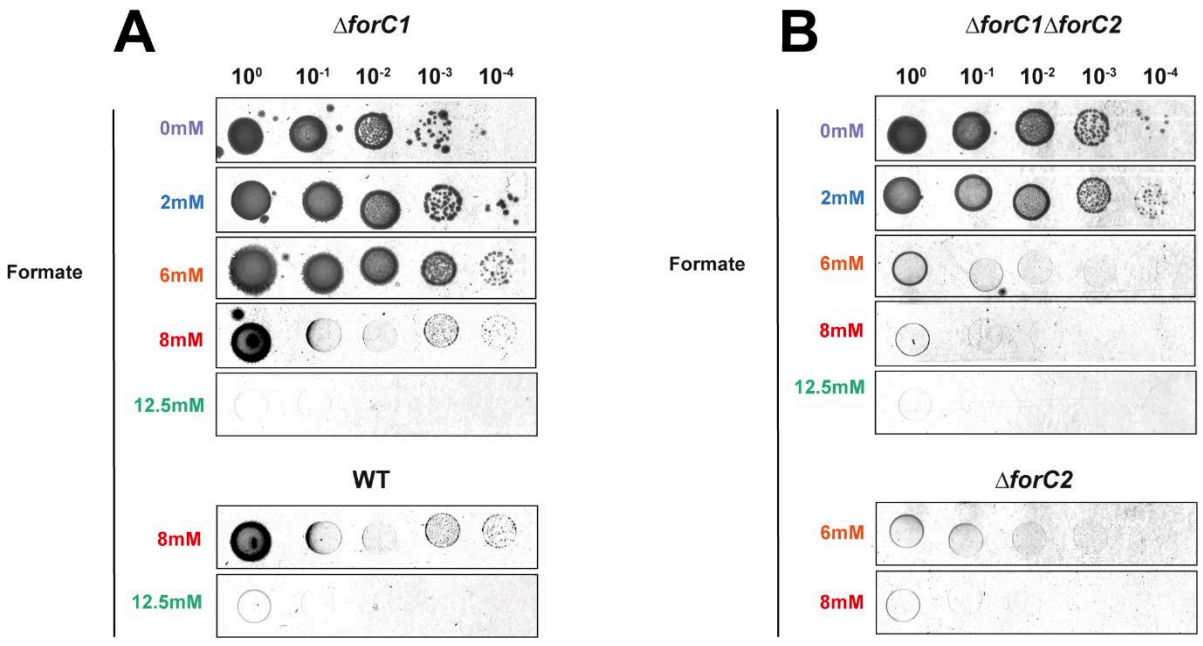


Figure S3: ForCE1 is not involved in formate detoxification

Serial dilutions of the *ΔforC1* **(A)** and *ΔforC1ΔforC2* **(B)** strains plated on solid M9 medium at pH5.5, supplemented with 0mM (purple), 4mM (turquoise), 6mM (orange), 8mM (red) and 12.5mM (green) of formate. Images were respectively acquired after 18h of incubation. These experiments were not performed at the same time than those presented Figure 2 and 3. Thus, the parental strain used as internal control is depicted behind each panel at the relevant concentrations.

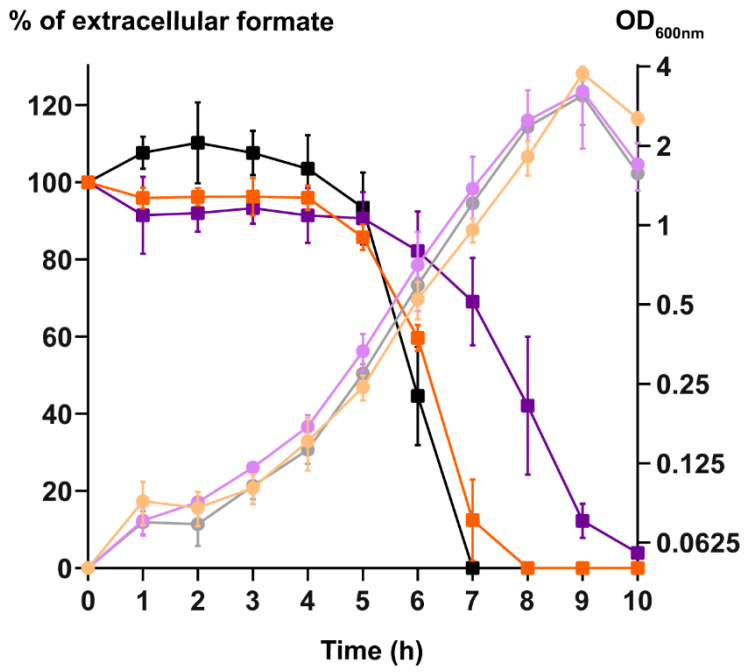


Figure S4: YwcJ is not involved in extracellular formate uptake

Extracellular formate concentration was followed over growth in the WT (black), *ΔywcJ* (orange) and *ΔyrhGΔywcJ* (pink) strains. Cells were grown in M9 minimal medium (pH7) supplemented with 2mM formate. Growth curves were followed by spectrophotometry at 600nm and represented by transparent curves with circles marks. Extracellular formate concentration was measured by liquid-NMR spectroscopy, and represented by opaque curves with square marks. Generation times were calculated: 58min ± 7 for the WT, 68min ± 5 for the *ΔywcJ* strain and 60min ± 6 for the *ΔyrhGΔywcJ* strain. Standard

Arias-Cartín, Rodrigo, Alexandre Uzel, Farida Seduk, Guillaume Gerbaud, Fabien Pierrel, Marianne Broc, Régine Lebrun, et al. 2022. « Identification and Characterization of a Noncanonical Menaquinone-Linked Formate Dehydrogenase ». Journal of Biological Chemistry 298 (2): 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

Azeredo, Denise R.P., Verônica Alvarenga, Anderson S. Sant'Ana, et Armando U.O. Sabaa Srur. 2016. « An Overview of Microorganisms and Factors Contributing for the Microbial Stability of Carbonated Soft Drinks ». Food Research International 82 (avril): 136-44. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.024.

Beek, Alex Ter, Bart J. F. Keijser, Andre Boorsma, Anna Zakrzewska, Rick Orij, Gertien J. Smits, et Stanley Brul. 2008. « Transcriptome Analysis of Sorbic Acid-Stressed Bacillus Subtilis Reveals a Nutrient Limitation Response and Indicates Plasma Membrane Remodeling ». Journal of Bacteriology 190 (5): 1751-61. https://doi.org/10.1128/JB.01516-07.

Beyer, Lydia, Claudia Doberenz, Dörte Falke, Doreen Hunger, Bernhard Suppmann, et R. Gary Sawers. 2013. « Coordination of FocA and Pyruvate Formate-Lyase Synthesis in Escherichia Coli Demonstrates Preferential Translocation of Formate over Other Mixed-Acid Fermentation Products ». Journal of Bacteriology 195 (7): 1428-35. https://doi.org/10.1128/JB.02166-12.

Booth, I. R., et M. Stratford. 2003. « Acidulants and Low pH ». In Food Preservatives, édité par N. J. Russell et Grahame W. Gould, 25-47. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_3.

De Bok, Frank A. M., Maurice L. G. C. Luijten, et Alfons J. M. Stams. 2002. « Biochemical Evidence for Formate Transfer in Syntrophic Propionate-Oxidizing Cocultures of Syntrophobacter Fumaroxidans and Methanospirillum Hungatei ». Applied and Environmental Microbiology 68 (9): 4247-52. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4247-4252.2002.

Dergham, Yasmine, Dominique Le Coq, Pierre Nicolas, Elena Bidnenko, Sandra Dérozier, Maxime Deforet, Eugénie Huillet, et al. 2023. « Direct Comparison of Spatial Transcriptional Heterogeneity across Diverse Bacillus Subtilis Biofilm Communities ». Nature Communications 14 (1): 7546. https://doi.org/10.1038/s41467-023-43386-w.

Doberenz, Claudia, Michael Zorn, Dörte Falke, David Nannemann, Doreen Hunger, Lydia Beyer, Christian H. Ihling, Jens Meiler, Andrea Sinz, et R. Gary Sawers. 2014. « Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation ». Journal of Molecular Biology 426 (15): 2827-39. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.023.

Huang, Yanyan, Mitsu Suyemoto, Cherilyn D. Garner, Kellie M. Cicconi, et Craig Altier. 2008. « Formate Acts as a Diffusible Signal To Induce Salmonella Invasion ». Journal of Bacteriology 190 (12): 4233-41. https://doi.org/10.1128/JB.00205-08.

Kammel, Michelle, Oliver Trebbin, Constanze Pinske, et R. Gary Sawers. 2022. « A Single Amino Acid Exchange Converts FocA into a Unidirectional Efflux Channel for Formate ». Microbiology 168 (1). https://doi.org/10.1099/mic.0.001132.

Kammel, Michelle, Oliver Trebbin, et Robert Gary Sawers. 2022. « Interplay between the Conserved Pore Residues Thr-91 and His-209 Controls Formate Translocation through the FocA Channel ». Microbial Physiology 32 (3-4): 95-107. https://doi.org/10.1159/000524454.

Kitko, Ryan D., Rebecca L. Cleeton, Erin I. Armentrout, Grace E. Lee, Ken Noguchi, Melanie B. Berkmen, Brian D. Jones, et Joan L. Slonczewski. 2009. « Cytoplasmic Acidification and the Benzoate Transcriptome in Bacillus Subtilis ». Édité par Malcolm James Horsburgh. PLoS ONE 4 (12): e8255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008255.

Konkol, M. A., K. M. Blair, et D. B. Kearns. 2013. « Plasmid-Encoded ComI Inhibits Competence in the Ancestral 3610 Strain of Bacillus Subtilis ». Journal of Bacteriology 195 (18): 4085-93. https://doi.org/10.1128/JB.00696-13.

Lang, Susan Q., Gretchen L. Früh-Green, Stefano M. Bernasconi, William J. Brazelton, Matthew O. Schrenk, et Julia M. McGonigle. 2018. « Deeply-Sourced Formate Fuels Sulfate Reducers but Not

Methanogens at Lost City Hydrothermal Field ». Scientific Reports 8 (1): 755. https://doi.org/10.1038/s41598-017-19002-5.

Larsson, Jonas T., Annika Rogstam, et Claes Von Wachenfeldt. 2005. « Coordinated Patterns of Cytochrome Bd and Lactate Dehydrogenase Expression in Bacillus Subtilis ». Microbiology 151 (10): 3323-35. https://doi.org/10.1099/mic.0.28124-0.

Lastauskienė, Eglė, Auksė Zinkevičienė, Irutė Girkontaitė, Arnoldas Kaunietis, et Violeta Kvedarienė. 2014. « Formic Acid and Acetic Acid Induce a Programmed Cell Death in Pathogenic Candida Species ». Current Microbiology 69 (3): 303-10. https://doi.org/10.1007/s00284-014-0585-9.

Lü, Wei, Juan Du, Nikola J. Schwarzer, Tobias Wacker, Susana L.A. Andrade, et Oliver Einsle. 2013. « The Formate/Nitrite Transporter Family of Anion Channels ». Bchm 394 (6): 715-27. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0339.

Maia, Luisa B., José J. G. Moura, et Isabel Moura. 2015. « Molybdenum and Tungsten-Dependent Formate Dehydrogenases ». JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry 20 (2): 287-309. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1218-2.

McDaniel, Elizabeth A, Matthew Scarborough, Daniel Girma Mulat, Xuan Lin, Pranav S Sampara, Heather M Olson, Robert P Young, et al. 2023. « Diverse Electron Carriers Drive Syntrophic Interactions in an Enriched Anaerobic Acetate-Oxidizing Consortium ». The ISME Journal 17 (12): 2326-39. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01542-6.

Metcalfe, George D., Thomas W. Smith, et Michael Hippler. 2020. « On-Line Analysis and in Situ pH Monitoring of Mixed Acid Fermentation by Escherichia Coli Using Combined FTIR and Raman Techniques ». Analytical and Bioanalytical Chemistry 412 (26): 7307-19. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02865-5.

Mielnik, Anne, Michael Link, James Mattila, S. Ryan Fulgham, et Delphine K. Farmer. 2018. « Emission of Formic and Acetic Acids from Two Colorado Soils ». Environmental Science: Processes & Impacts 20 (11): 1537-45. https://doi.org/10.1039/C8EM00356D.

Mols, Maarten, et Tjakko Abee. 2011. « Bacillus Cereus Responses to Acid Stress ». Environmental Microbiology 13 (11): 2835-43. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x.

Moon, Jimyung, Anja Schubert, Lara M Waschinger, et Volker Müller. 2023. « Reprogramming the Metabolism of an Acetogenic Bacterium to Homoformatogenesis ». The ISME Journal 17 (7): 984-92. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01411-2.

Moro, Camila Brombilla, Jéssica Gonçalves Lemos, Alessandra Marcon Gasperini, Andrieli Stefanello, Marcelo Valle Garcia, et Marina Venturini Copetti. 2022. « Efficacy of Weak Acid Preservatives on Spoilage Fungi of Bakery Products ». International Journal of Food Microbiology 374 (août): 109723. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109723.

Mukherjee, Mishtu, Manu Vajpai, et Ramasubbu Sankararamakrishnan. 2017. « Anion-Selective Formate/Nitrite Transporters: Taxonomic Distribution, Phylogenetic Analysis and Subfamily-Specific Conservation Pattern in Prokaryotes ». BMC Genomics 18 (1): 560. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3947-4.

Pandey, Rachna, Norbert O. E. Vischer, Jan P. P. M. Smelt, Johan W. A. Van Beilen, Alexander Ter Beek, Winnok H. De Vos, Stanley Brul, et Erik M. M. Manders. 2016. « Intracellular pH Response to Weak Acid Stress in Individual Vegetative Bacillus Subtilis Cells ». Édité par D. W. Schaffner. Applied and Environmental Microbiology 82 (21): 6463-71. https://doi.org/10.1128/AEM.02063-16.

Peters, Katharina, et Frank Sargent. 2023. « Formate Hydrogenlyase, Formic Acid Translocation and Hydrogen Production: Dynamic Membrane Biology during Fermentation ». Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1864 (1): 148919. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2022.148919.

Pietzke, Matthias, Johannes Meiser, et Alexei Vazquez. 2020. « Formate Metabolism in Health and Disease ». Molecular Metabolism 33 (mars): 23-37. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.012.

Piper, P. 1998. « The Pdr12 ABC Transporter Is Required for the Development of Weak Organic Acid Resistance in Yeast ». The EMBO Journal 17 (15): 4257-65. https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4257.

Ragsdale, Stephen W., et Elizabeth Pierce. 2008. « Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway of CO2 Fixation ». Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1784 (12): 1873-98. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012.

Rasmussen, Simon, Henrik Bjørn Nielsen, et Hanne Jarmer. 2009. « The Transcriptionally Active Regions in the Genome of Bacillus Subtilis ». Molecular Microbiology 73 (6): 1043-57. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06830.x.

Ter Beek, Alexander, Janneke G.E. Wijman, Anna Zakrzewska, Rick Orij, Gertien J. Smits, et Stanley Brul. 2015. « Comparative Physiological and Transcriptional Analysis of Weak Organic Acid Stress in Bacillus Subtilis ». Food Microbiology 45 (février): 71-82. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.013.

Van Beilen, J. W. A., M. J. Teixeira De Mattos, K. J. Hellingwerf, et S. Brul. 2014. « Distinct Effects of Sorbic Acid and Acetic Acid on the Electrophysiology and Metabolism of Bacillus Subtilis ». Édité par C. A. Elkins. Applied and Environmental Microbiology 80 (19): 5918-26. https://doi.org/10.1128/AEM.01391-14.

Vivijs, Bram, Leticia U. Haberbeck, Victor Baiye Mfortaw Mbong, Kristel Bernaerts, Annemie H. Geeraerd, Abram Aertsen, et Chris W. Michiels. 2015. « Formate Hydrogen Lyase Mediates Stationary-Phase Deacidification and Increases Survival during Sugar Fermentation in Acetoin-Producing Enterobacteria ». Frontiers in Microbiology 6 (février). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00150.

Wilks, Jessica C., Ryan D. Kitko, Sarah H. Cleeton, Grace E. Lee, Chinagozi S. Ugwu, Brian D. Jones, Sandra S. BonDurant, et Joan L. Slonczewski. 2009. « Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in Bacillus Subtilis ». Applied and Environmental Microbiology 75 (4): 981-90. https://doi.org/10.1128/AEM.01652-08.

Zheng, Dao-Qiong, Xue-Chang Wu, Pin-Mei Wang, Xiao-Qin Chi, Xiang-Lin Tao, Ping Li, Xin-Hang Jiang, et Yu-Hua Zhao. 2011. « Drug Resistance Marker-Aided Genome Shuffling to Improve Acetic Acid Tolerance in Saccharomyces Cerevisiae ». Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 38 (3): 415-22. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0784-8.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude d'une nouvelle famille de FDH aux propriétés atypiques. ForCE1 et ForCE2, les deux membres caractérisés chez *Bacillus subtilis*, sont des déshydrogénases primaires de la chaine respiratoire aérobie. Elles sont notamment reliées à la membrane par un module partenaire ForE contenant un domaine HMP amphipatique. Enfin, sur le plan physiologique, ForCE2 a été montrée comme importante lors de la gestion du stress acide formique. De ces résultats découlent plusieurs questions abordées dans ce chapitre de discussion. Dans une première section, je reviendrai sur la description du site actif non-canonique et du trajet électronique dans ForCE1. Dans une seconde section, je questionnerais la contribution physiologique de deux protéines ForCE chez *B. subtilis* en abordant les conditions de régulation de l'opéron *forCE1*. Enfin, je discuterai de l'importance des modules à domaine HMP chez les oxydoréductases dans les deux dernières sections.

A. Les ForCE, des enzymes non modèles

1. Le site actif non-canonique

L'un des éléments les plus frappants de la sous-famille des FDH de type ForCE est le caractère atypique du site catalytique. En effet, l'histidine jusqu'ici conservée est remplacée par une glutamine dans l'ensemble des membres de la famille ForC. Les données structurales que nous avons obtenu sur l'un des membres de cette famille confirment la position du résidu Gln392 à 4.6 Å du Mo. Quelles informations peut-on en tirer ? Comme indiqué dans la section B du chapitre 2 de l'introduction, les données disponibles dans la littérature concernant le rôle de ce résidu sont limitées à quelques systèmes. Ainsi, il est proposé que l'histidine interagisse avec le formiate pour l'orienter et le stabiliser à proximité du site actif (Hartmann et al. 2016). Une autre étude propose que la mobilité de la chaîne latérale de ce résidu contrôle l'accès du substrat au site actif en ouvrant et en fermant le canal dédié à son trafic (Oliveira et al. 2020). La forte conservation de l'histidine parmi les FDH suggère que ses propriétés physico-chimiques sont spécifiquement requises à cette position et participent aux fonctions énoncées ci-dessus. Bien que la glutamine ne soit pas protonable, elle possède une chaine latérale polaire, ce qui suggère que l'accès et la stabilisation du formiate au niveau du site actif de ForC est toujours possible par cet acide aminé. Dans l'enzyme FdhAB de *D. vulgaris* Hildenborough, la fermeture du canal d'accès du formiate lorsque l'enzyme est réduite pourrait protéger le site actif de l'oxygène, puisque l'enzyme y est sensible dans cet état rédox (Oliveira et al. 2024). La

chaine latérale de la glutamine est de grande taille et pourrait, de façon analogue à celle de l'histidine, assurer la fermeture du canal. Dans ForCE1, l'analyse des données structurales indique une faible mobilité de la chaine latérale du résidu Gln392 dans les cartes de densité électronique ou de potentiel de coulomb. Une étude plus spécifique de la mobilité du site actif est requise en utilisant par exemple, la dynamique moléculaire qui rend compte de l'évolution temporelle d'un système. Cet aspect fait l'objet d'un des axes de recherche d'un autre doctorant de l'équipe. Enfin, la stricte conservation d'un résidu arginine à proximité immédiate du métal dans les FDH (e.g. *Bs*Arg585 dans ForCE1) pourrait l'impliquer dans la stabilisation du substrat en raison de la charge positive (Hartmann et al. 2016; Maia et al. 2016). La substitution de l'histidine par une glutamine n'apparait donc pas comme un frein pour l'activité de l'enzyme. Néanmoins, il s'agit à ce jour de la seule substitution retrouvée parmi les séquences de FDH identifiées et amène à se questionner sur le rôle de la glutamine chez les enzymes ForCE. De manière intéressante, une autre histidine en position 587 est curieusement retrouvée dans l'environnement immédiat du molybdène chez les ForCE (~ 5 Å). Cette dernière avait déjà été identifiée dans la comparaison des séquences du site actif de ForC avec d'autres FDH (Figure 1A Arias-Cartín et al. 2022), où elle remplace une glutamine conservée dans les séquences de FDH de classe I. Il est donc envisageable que la substitution de l'histidine 392 conservée par une glutamine soit compensée par la présence de l'histidine en position 587. Des résultats préliminaires de l'équipe montrent que la substitution His587Ala impacte drastiquement l'activité formiate : ménadione oxydoréductase de ForCE1, soulignant l'importance de ce résidu (Table 2).

Variants	K_{cat} (s^{-1})	V_{max} (U)	$K_{cat}/K_{m\ app}$ ($mM.s^{-1}$)	optimum de pH
ForCE1	17,4 ± 0,95	7,9 ± 0,43	3,4	9
ForC^{Q392H}E1	< 0,1	< 0,05	nd	nd
ForC^{H587A}E1	0,12 ± 0,01	0,054 ± 0,007	0,03	8
ForC^{H587Q}E1	3,41 ± 0,11	1,55 ± 0,05	0,085	9
ForC$^{Q392H\ H587Q}$ E1	< 0,1	< 0,05	nd	nd

Table 2 : Constantes catalytiques de la réduction de la ménadione par les variants du site catalytique ForCE1.

Les variants ForC^{Q392H}E1, ForC^{H587A}E1, ForC^{H587Q}E1 et ForC$^{Q392H\ H587Q}$E1 ont été purifiés chez *Bacillus subtilis* et leur activité formiate:ménadione OR a été mesurée en anaérobiose dans du tampon CHES 25mM, en présence de 50mM de formiate et de 60µM de ménadione.

Néanmoins, la substitution Gln392His abolit complètement l'activité de l'enzyme. Ces résultats préliminaires confirment le rôle clef du résidu Gln392 mais également que sa seule substitution par un résidu His ne suffit pas à reconstituer un site actif fonctionnel commun à d'autres FDH. Enfin, la restauration du consensus Gln392His / His587Gln entraîne également une inactivation totale de l'enzyme (Table 2). En résumé, ces expériences confirment que les enzymes ForCE catalysent l'oxydation du formiate *via* un site actif non-consensus, et que ce dernier n'est pas le résultat d'une simple inversion de résidus n'ayant aucune influence sur la fonctionnalité de l'enzyme. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender le rôle des acides aminés environnant le site actif. Également, il serait intéressant de regarder l'impact de la substitution de l'arginine dans la catalyse.

2. Rôle du centre [2Fe-2S] au sein de l'enzyme

Une fois le formiate oxydé au niveau du site actif, les électrons transitent jusqu'à la quinone *via* de nombreux centres Fe-S. Les derniers relais électroniques de ce trajet sont organisés selon le motif « Y junction » défini par (Zuchan et al. 2021). Ce motif illustre la séparation du trajet électronique en deux voies distinctes à partir du centre [4Fe-4S] dit central, vers le centre [2Fe-S] d'une part et le centre [4Fe-4S]-Histidine d'autre part (Figure 2a - Broc et al. (1)). Dans ForCE1, le centre [4Fe-4S]-Histidine est le dernier relais électronique avant la MK-7 alors que le centre [2Fe-2S] est localisé à 23.6 Å du site de fixation de la quinone. Le centre [2Fe-2S] est connecté au trajet électronique puisqu'il est réduit lorsque l'enzyme est incubée en présence de formiate (Arias-Cartín et al. 2022). De plus, il est strictement conservé chez les membres de la famille ForC et chez les autres FDH à extension N-terminale (Figure ExtData 1a – Broc et al. (1)), ce qui soulève des questions concernant son rôle au sein du complexe. L'agencement des centres au sein du module « Y junction » permet la bifurcation ou la confurcation de deux trajets électroniques distincts permettant de relier un site actif à des partenaires rédox différents et couplant des réactions endergoniques à d'autres exergoniques (Zuchan et al. 2021; Schut et al. 2022). Sur ce principe, le centre [2Fe-2S] pourrait constituer une seconde voie d'entrée ou de sortie d'électrons au sein de l'enzyme. Au regard de son potentiel rédox très électronégatif (-426 mV à pH 7.5) et par analogie à d'autres systèmes enzymatiques, le partenaire rédox pourrait être le dihydrogène ou une ferrédoxine. Si la recherche de séquences pouvant coder des hydrogénases dans le génome de *Bacillus subtilis* s'est révélée infructueuse, le génome contient un gène *fer* codant pour une ferrédoxine (Fdx). Cette dernière contient un centre [4Fe-4S] dont le potentiel rédox est de à -385 mV à pH 7 (Green et al. 2003). Fdx s'avère être capable de donner des électrons au cytochrome P450 (BioI) impliqué dans la biosynthèse de biotine ou bien encore à Δ5-Des, une enzyme membranaire qui catalyse la désaturation des phospholipides chez *B. subtilis* (Chazarreta-Cifre et al. 2011). Les ferrédoxines étant des protéines abondantes impliquées dans une multitude de processus, Fdx pourrait servir comme donneur ou accepteur d'électrons du complexe ForCE au niveau du centre [2Fe-2S] situé à proximité de la surface (~ 7 Å). Afin de vérifier cette hypothèse, l'approche consisterait à purifier la Fdx de *B. subtilis* et à évaluer si cette dernière est capable *in vitro* de servir de partenaire rédox en assurant la réduction d'analogues de quinone ou du CO_2, ou bien encore d'être réduite par le formiate.

Par ailleurs, chez les enzymes FdsABGD de *R. capsulatus* et FoDH1 *M. extorquens*, qui sont des FDH à extension N-terminale dont la sous-unité catalytique interagit avec des sous-unités partenaires distinctes de ForE, le dernier relais électronique de la sous-unité catalytique est le centre [2Fe-2S] (Radon et al. 2020; Yoshikawa et al. 2022). Si le centre [4Fe-4S]-Histidine est à une distance lui permettant d'être relié au trajet électronique, il n'est pas indispensable comme en témoigne son absence dans la FDH FoDH1 caractérisée chez *Methylobacterium extorquens AM1*. Cette situation où le centre est [4Fe-4S]-Histidine est absent, est retrouvée dans au moins trois sous-familles de FDH comme l'illustre notre analyse bio-informatique (Figure ExtData 1a – Broc et al. (1)). S'il n'est pas impliqué dans le trajet électronique vers la quinone, quel peut être le rôle du centre [2Fe-2S] dans la famille ForC ? S'agit-il d'un rôle purement structural ? Il est intéressant de noter que le centre [2Fe-2S] est également conservé chez les différentes oxydoréductases possédant le module « Y junction » (Zuchan et al. 2021; Broderick et al. 2014; Sazanov et Hinchliffe 2006). Ainsi, il apparait indispensable d'évaluer l'impact de l'absence du centre [2Fe-2S] chez ForCE1, par la substitution de certains de ces ligands cystéine, sur la stabilité du complexe et son activité enzymatique.

B. Pourquoi deux enzymes ForCE chez *Bacillus subtilis* ?

En étudiant le rôle physiologique des enzymes ForCE chez *B. subtilis*, j'ai démontré que ForCE1 et ForCE2 participent au métabolisme énergétique de la cellule en qualité de déshydrogénase primaires de la chaine respiratoire aérobie. Le fonctionnement d'une telle chaîne dépend de la disponibilité en formiate. *Bacillus subtilis* est majoritairement retrouvée dans les sols, et est donc exposée au formiate, à l'oxalate ainsi qu'à des variations de pH. En sa qualité d'acide organique faible, l'acide formique pourrait avoir un pouvoir antimicrobien sur la cellule, au même titre que d'autres acides comme l'acide lactique, acétique ou sorbique (Moro et al. 2022; Azeredo et al. 2016; Beek et al. 2008; Mollapour, Shepherd, et Piper 2008). Durant ma thèse, j'ai montré pour la première fois que l'ajout de formiate affecte la croissance de *B. subtilis* à pH acide. Dans ce contexte, l'absence de ForCE2 exacerbe les phénotypes obtenus tandis que l'absence de ForCE1 n'entraine aucun phénotype. Un tel résultat suggère que ForCE1 et ForCE2 puissent intervenir dans des conditions physiologiques distinctes. Un premier élément en faveur de cette hypothèse est leur condition d'expression (Figure 26).

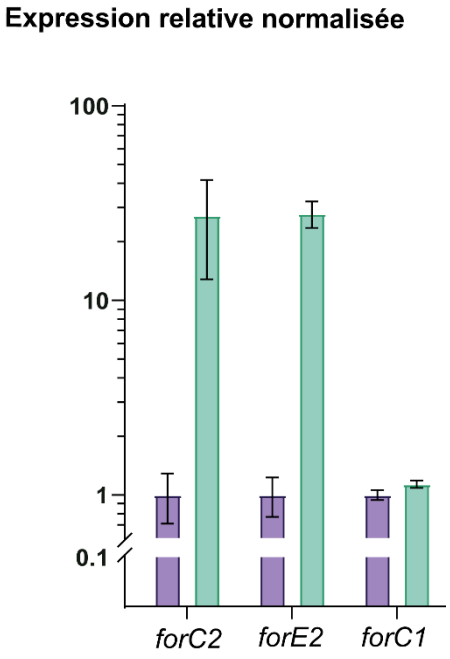


Figure 26 : l'opéron *forCE2* est surexprimé en présence de formiate.

Les cellules ont été cultivées en milieu M9 à pH 7 supplémenté (barres vertes) ou non (barres violettes) avec 12.5mM de formiate. Les expériences de qRT-PCR ont été réalisés sur les ARN extrait de 10^9 cellules. Pour chaque gène, l'expression relative en présence de formiate a été normalisée à l'expression relative en absence de formiate. Les résultats présentés correspondent à des triplicats techniques.

En effet, la transcription de l'opéron *forCE2* est augmentée d'un facteur 27 en présence de formiate, tandis que le niveau de transcription de l'opéron *forCE1* ne varie pas. En lien avec ce résultat, les expériences d'oxygraphie réalisées sur des cellules cultivées en aérobiose en présence de formiate indiquent que le niveau d'expression de *forCE1* n'est pas suffisant pour

détecter une activité de consommation d'oxygène dépendante du formiate (Broc et al. Figure 3 ?). De ce fait, je me suis demandée dans quelles conditions de croissance ForCE1 intervient au sein de la cellules.

1. L'opéron *forCE1* sous le contrôle de la réponse générale au stress

Dans la littérature, plusieurs résultats suggèrent que l'opéron *forCE1* est régulé par le facteur d'initiation de la transcription SigmaB, induisant l'expression de plus de 150 gènes impliqués dans la réponse générale au stress (RGS) (Rodriguez Ayala, Bartolini, et Grau 2020). En effet, une étude de transcriptomique montre que le profil de transcription du gène *forC1* est identique à celui du gène *sigB*, codant pour SigmaB (Figure 27A) (Nicolas et al. 2012). De plus, des sites de fixation de SigmaB ont été identifiés sur le chromosome de *B. subtilis* en amont du gène *forC1* (Figure 27B) (Petersohn et al. 2001).

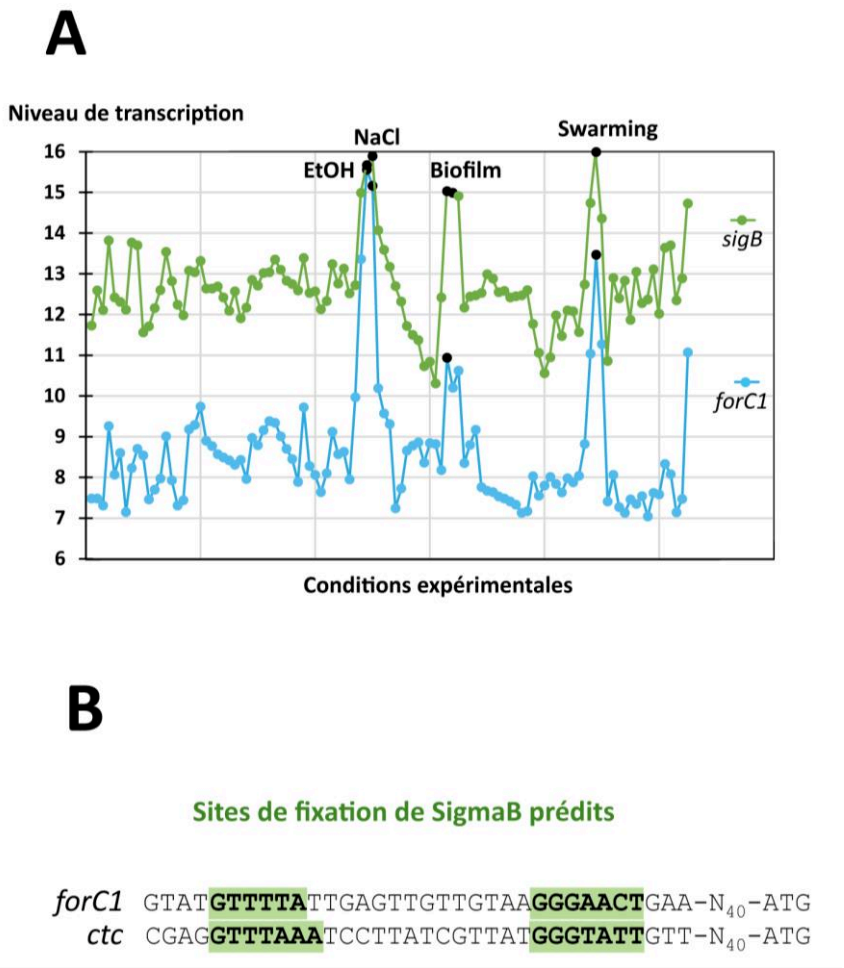


Figure 27 : Le gène *forC1* pourrait faire partie du régulon *sigB*.

A : Graphique représentant les niveaux de transcription des gènes *forC1* (bleu) et *sigB* (vert) en fonction de différentes conditions expérimentales. Figure tirée du site subtiwiki, et générée à partir des données de (Nicolas et al. 2012).

B : Site de fixation de SigmaB prédit en amont des gènes *ctc* et *forC1*. Ctc est une protéine ribosomale impliquée dans la réponse générale au stress et faisant partie du régulon SigmaB. Figure tirée de (Petersohn et al. 2001).

Il est donc vraisemblable que l'opéron *forCE1* fasse parti du régulon *SigB*. Cette hypothèse est notamment abordée dans le cadre d'un autre projet de thèse porté par Laura Lizen au sein de l'équipe.

La RGS repose sur trois cascades de régulation distinctes, répondant spécifiquement aux stress environnementaux, au stress énergétique, et aux faibles températures (Rodriguez Ayala, Bartolini, et Grau 2020). Ces trois voies de régulations aboutissent à l'activation de SigmaB et à la transcription des gènes cibles. Il est mentionné dans la littérature que le stress acide est un signal permettant de déclencher une réponse transcriptionnelle comparable à celle observée lors du déclenchement de la réponse générale au stress (Hecker, Pané-Farré, et Uwe 2007; Hopper, Korsa, et Böck 1996; Rodriguez Ayala, Bartolini, et Grau 2020; KovÃ¡cs et al. 1998). De ce fait, je me suis demandée si la délétion du gène *sigB* pouvait avoir une influence sur la croissance de *B. subtilis* à pH acide en présence de formiate ? La réponse est non, laissant supposer que *forCE1* n'est pas exprimé lors du stress acide formique (Figure 28).

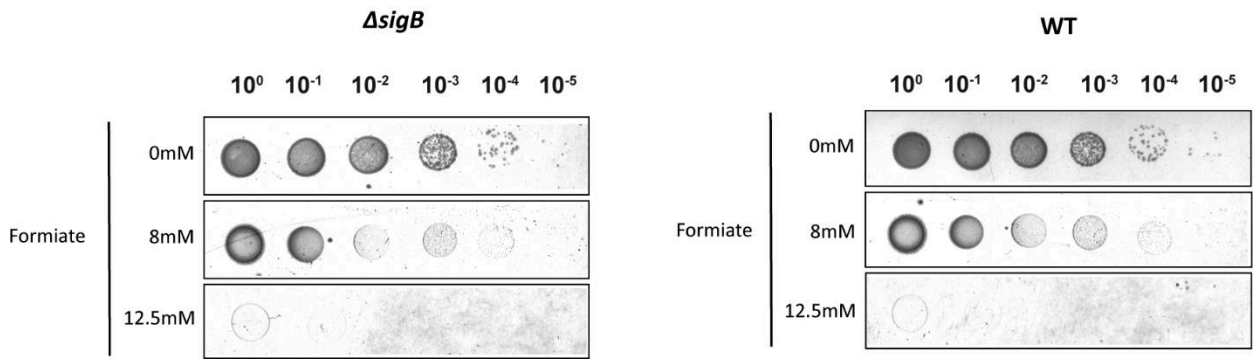


Figure 28 : La délétion du gène *sigB* n'a pas d'impact sur la croissance de *B. subtilis* à pH5.8 en présence de formiate

Les souches WT et *ΔsigB* ont été cultivées en milieu M9 solide à pH5.8, supplémenté avec 0, 8 et 12.5mM de formiate. Pour chaque souches, des dilutions sérielles ont été effectuées et 5uL ont été déposées sur boite, d'après le protocole décrit dans (Broc et al. (2)). Les images ont été capturées après 18h d'incubation à 37°C.

Pour aller plus loin dans ces conclusions, une évaluation directe de la quantité des transcrits de *forCE1* dans ces conditions reste indispensable. Par ailleurs, si ForCE1 n'est pas requise pour consommer le formiate lors d'un stress acide, dans quelles autres conditions peut-elle être nécessaire ? L'une des pistes est le biofilm, une structure hétérogène caractérisée par des pulses d'activation de *sigB* dans sa périphérie (Nadezhdin et al. 2020). Par ailleurs, la

surproduction de l'oxalate décarboxylase OxdC dans le biofilm peut conduire à la production intracellulaire de formiate (Cui et al. 2020). L'une de nos hypothèses est que l'expression de *forCE1* dans le biofilm permet d'alimenter la chaine de transfert d'électrons et ainsi d'atténuer le stress énergétique auquel les cellules font face dans certaines régions du biofilm. L'étude de l'importance de ForCE1 dans le biofilm s'inscrit également dans le projet de thèse de Laura Lizen.

2. ForCE1 et ForCE2 : des enzymes jumelles mais différentes

Les sous-unités catalytiques ForC1 et ForC2 partagent 61% d'identité de séquence et sont considérées comme des orthologues. Une étude sur la duplication des gènes au sein des génomes montre une divergence au niveau de leurs conditions d'expression dans plus de 40% des cas, probablement pour assurer le maintien de la copie sur le chromosome (Gu et al. 2002). Cette divergence d'expression conduit généralement à une divergence fonctionnelle entre les enzymes paralogues. A titre d'exemple, les enzymes Glutamate déshydrogénases GudB et RocG chez *B. subtilis* partagent 75% d'identité et catalysent la même réaction. Pour autant, elles ne sont pas régulées dans les mêmes conditions et ne présentent pas les mêmes propriétés physico-chimiques (Noda-Garcia et al. 2017). Le cas des ForCE chez *B. subtilis* fait écho à cette situation, et leur comparaison révèle effectivement des points de dissimilitude. Sur le plan catalytique, les activités formiate : ménadione oxydoréductase de ForCE1 et ForCE2 montrent des optimums de pH similaires, et des paramètres cinétiques du même ordre de grandeur. Cependant, leur comportement vis-à-vis de l'oxygène est totalement différent. Tandis que ForCE2 est rapidement inactivée après quelques heures d'exposition à l'oxygène, ForCE1 conserve près de 75% de son activité après 20h d'exposition à l'air (Figure 29). A travers cette différence, les ForCE de *B. subtilis* apparaissent donc comme des modèles de choix pour étudier le phénomène de tolérance à l'oxygène chez les FDH. Les questionnements autour de ce point sont notamment abordés par Stéphane Zakarian dans le cadre de son projet de thèse.

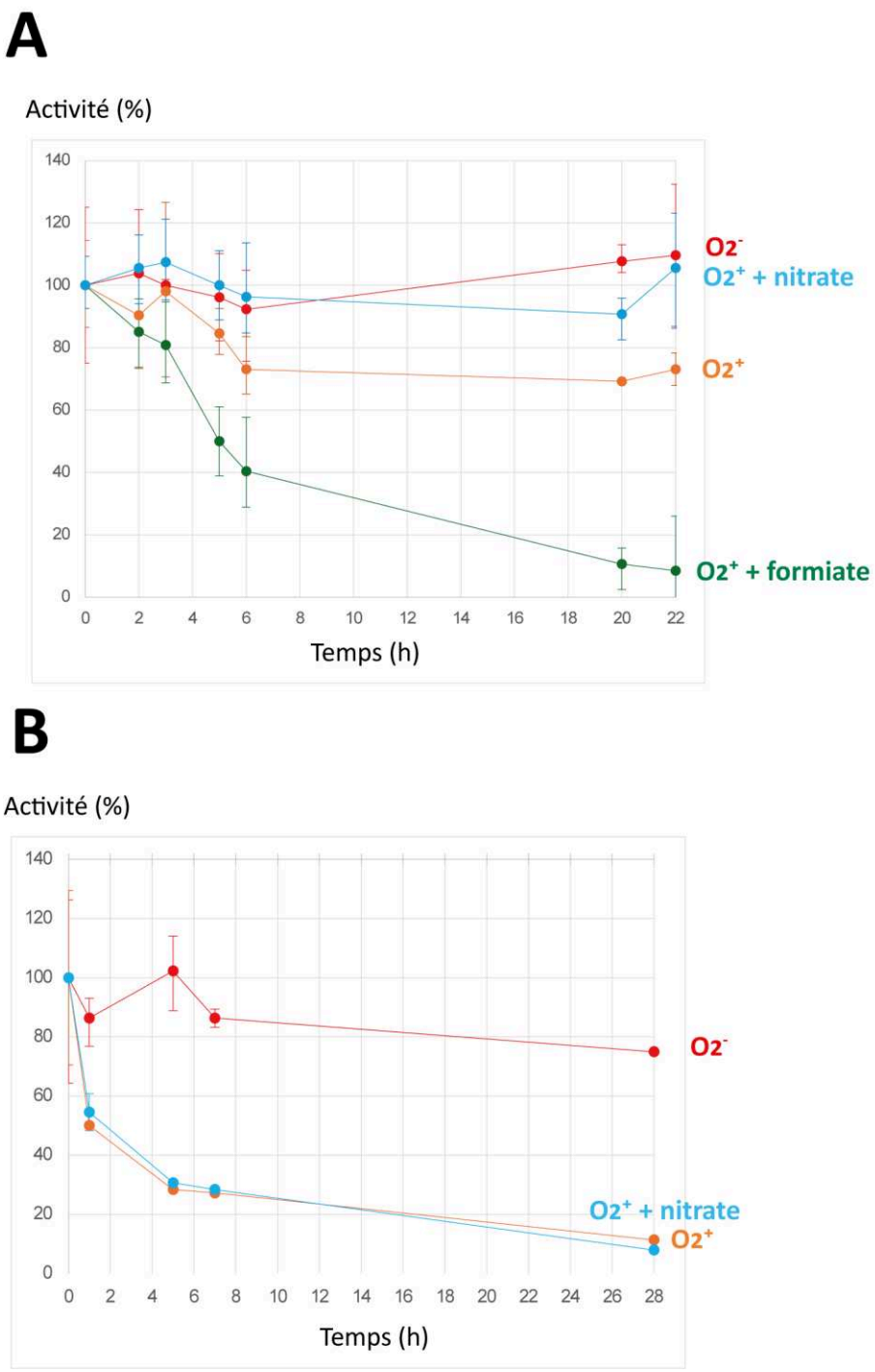


Figure 29 : ForCE1 et ForCE2 n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de l'oxygène.

Pourcentage d'activité formiate : ménadione OR de ForCE1 **(A)** et ForCE2 **(B)**. Les enzymes ont été conservées boites à gants (rouge) ou exposées à l'air libre (orange), sans ou avec ajout de 12.5mM de formiate (vert) ou 10mM de nitrate (bleu) ; pendant 1 à 28h, à température ambiante, et les activités ont été mesurée périodiquement sur des prélèvements d'échantillons durant l'exposition à l'oxygène. Pour les mesures d'activités, l'échantillon est exposé à un flux de N_2 et dilué 800 fois dans un tampon gardé en anaérobiose. Les mesures d'activités ont été réalisées sous atmosphère contrôlée dans du tampon CHES 25mM à pH9, en présence de 50mM de formiate et 150µM de ménadione.

C. Une protéine à module HMP pour optimiser la respiration ?

Durant ma thèse, j'ai caractérisé la fonction du module ForE au sein du complexe ForCE. Ce module permet de connecter la sous-unité catalytique au pool de quinones grâce à la présence d'un domaine amphipatique HMP médiant l'interaction entre le complexe et la membrane. Également, j'ai démontré que ce type de module est commun à d'autres oxydoréductases retrouvées dans différents phyla microbiens.

L'interaction des protéines avec les membranes microbiennes repose sur un panel de stratégies. Certaines protéines intégralement constituées d'hélices transmembranaires (les cytochromes par exemple) ou de feuillets bêta (les porines par exemple), sont enchâssées dans la membrane. D'autres y sont seulement rattachées par un segment transmembranaire ou par la fixation d'un lipide. Enfin, certaines interagissent avec le feuillet interne de la membrane de manière monotopique, grâce à un domaine amphipatique qui interagit à la fois avec les têtes chargées des phospholipides et les chaînes d'acides gras hydrophobes. Dans le cas des différentes oxydoréductases identifiées dans l'analyse SSN-GNN, l'évolution a fait le choix d'un module HMP tétramérique pour relier ces dernières à la membrane. Pour autant, certaines de ces enzymes étaient déjà connues pour interagir avec les membranes *via* d'autres stratégies. Notamment, les enzymes NDH et SQR sont classiquement décrites comme des enzymes monotopiques interagissant directement avec la membrane *via* deux hélices amphipatiques (Cherney et al. 2010; Marreiros et al. 2017; Brito et al. 2009). A travers de telles observations, pourquoi deux stratégies d'ancrage à la membrane coexistent pour une même famille d'oxydoréductase ? La réponse à cette question n'est pas simple, et l'une des situations envisageables est tout simplement que l'acquisition d'un module HMP confère un avantage, et si oui, lequel ? Ces questions ouvertes seront discutées dans la section à venir.

Un premier avantage pourrait être apporté par le caractère tétramérique du module partenaire. En effet, grace à cette topologie, les modules ForE et HucM recrutent simultanément 4 et 8 sous-unités catalytiques en un endroit précis de la membrane. Cette dernière est un compartiment cellulaire très encombré où la notion de diffusion est déterminante pour le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons. De ce fait, des stratégies d'optimisation de l'espace membranaire sont mises en place pour faciliter les rencontres entre navettes électroniques et complexes respiratoires. Les complexes respiratoires sont ainsi retrouvés regroupés en clusters ou associés physiquement en supercomplexes (Magalon et Alberge 2016). Sur ce principe, le module HMP participe-t-il à la

compartimentation en regroupant plusieurs modules catalytiques sur un espace restreint de la bicouche lipidique ? Au regard de sa topologie, une telle hypothèse parait plausible. La longueur variable du tétramère HMP (pouvant être formé par des chaines polypeptidiques allant jusqu'à 300 acides aminés) pourrait également permettre le recrutement de plusieurs « étages » de sous-unités catalytiques, comme l'illustre la modélisation du complexe SQR (Figure 4b et Figure ExtData 7 -Broc et al. (1)). L'avantage d'un tel module pourrait donc être de réduire l'encombrement au niveau de la membrane, afin de maximiser la proximité entre les déshydrogénases et les réductases. Ainsi, l'étude du proxisome du complexe ForCE pourrait permettre d'identifier les protéines localisées dans son voisinage immédiat. Parmi elles, des complexes respiratoires tels que les cytochromes oxydases seraient notamment attendues.

Par ailleurs, cette multimérisation des sous-unités catalytiques multiplie également le recrutement des accepteurs d'électrons. En effet, les complexes ForCE et HucSLM fixent respectivement un total de 4 et 8 quinones. Dans ForE, la cavité interne hydrophobe du tétramère est remplie de lipides. Il s'agit donc en quelque sorte d'une extension de la membrane dans laquelle les quinones circulent à proximité de sites permettant leur réduction. Une telle organisation peut-elle représenter un avantage bioénergétique en favorisant l'efficacité de réduction des quinones ? Sur le plan catalytique, aucune coopérativité entre les sous-unités a été observée lors de l'activité formiate : ménadione OR chez ForCE. Ce constat a également été fait pour l'activité H_2 : ménadione OR de HucSLM. Il semble donc que la capacité à fixer plusieurs quinones simultanément n'a pas d'influence sur l'efficacité catalytique de ces enzymes. La contribution du module HMP se limite donc à concentrer les quinones en un point donné. Ces dernières ne sont donc pas réduites plus efficacement mais « plus localement ». Néanmoins, pour que cela représente un avantage bioénergétique, il faut impérativement que le flux de quinols produit par ce « hub » de déshydrogénases primaires puisse être réoxydé tout aussi efficacement par des réductases terminales à proximité. La diffusion des quinones dans les membranes est considérée comme l'étape limitante du transport des électrons au sein des chaines respiratoires mitochondriales et bactériennes (Gupte et al. 1984; Budin et al. 2018). En lien avec l'hypothèse d'un proxisome ForCE-cytochrome oxydases évoqué plus haut, le module HMP pourrait faciliter les échanges de quinones entre complexes en augmentant leur probabilité de rencontrer les réductases terminales, si celles-ci sont localisées à proximité du tétramère. Ainsi, le module HMP pourrait présenter un avantage en mettant à disposition quatre fois plus de sous-unités catalytiques au service de la réduction du pool de quinone, tout

en maximisant la proximité de ces dernières avec les oxydases terminales, en optimisant l'encombrement à la membrane *via* la formation d'une micro-compartimentation ou d'un supercomplexe. Pour explorer cette théorie, il serait intéressant de regarder, en plus du proxisome, la localisation spatiotemporelle de ForCE2 et de la quinol oxydase *aa3* (impliquée dans la respiration aérobie chez *B. subtilis*) en conditions de respiration formiate-oxygène. En considérant l'hypothèse de la micro-compartimentation évoquée plus haut, on s'attend notamment à observer une colocalisation des deux acteurs. Pour regarder cela, notre équipe possède une expertise en microscopie super-résolutive, mise au point par Milica Denić lors de son post-doctorat. C'est une technique de microscopie à fluorescence adaptée pour l'étude des protéines membranaires, qui permet d'observer leur localisation à l'échelle nanométrique. Un tel degré de résolution permet notamment de distinguer le signal de fluorescence émis par un objet en particulier. Il est donc possible de dénombrer et de quantifier individuellement chaque protéine au sein de la membrane, et d'évaluer leur colocalisation en utilisant des fluorophores ayant des longueurs d'ondes d'émission différentes. Par ailleurs, la validation d'une telle hypothèse implique que les observations faites pour un complexe donné s'appliquent aux autres protéines ayant un module HMP. Il serait donc intéressant de réaliser les expériences évoquées plus haut avec différents membres caractérisés au sein de différents clusters de l'analyse SSN-GNN.

D. Une protéine à domaine HMP peut-elle recruter différents types de sous-unité catalytique ?

Au regard de la topologie similaire à travers laquelle les oxydoréductases s'assemblent autour du tétramère HMP, et ce quelle que soit leur nature, on peut imaginer qu'un seul module HMP puisse être commun à plusieurs oxydoréductases au sein d'une même cellule. A titre d'exemple, des expériences préliminaires suggèrent que les sous-unités ForC1 et ForC2 sont interchangeables. La purification de l'enzyme ForC1 dans une souche *ΔforE1* aboutit à la co-purification de la sous-unité ForE2. Sur la base de cette hypothèse, la cellule pourrait ainsi assembler les oxydoréductases de son choix selon un concept de type « plug-and-play ». De ce fait, l'une des questions de cette discussion porte sur la spécificité d'interaction entre la sous-unité catalytique et le tétramère HMP.

1. Un motif V-shape universel pour connecter les oxydoréductases et les protéines HMP ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 de la section résultats, la sous-unité catalytique ForC interagit avec le tétramère ForE par un motif constitué de deux hélices amphipatiques appelé V-shape. Est-ce que la séquence correspondant à ce motif est un critère d'identification de protéines capables d'interagir avec le tétramère ? Après avoir établi un profil HMM de ce motif sur la base de l'alignement multiple de séquences, la recherche dans les bases de données a uniquement permis d'identifier des séquences de type ForC. Par ailleurs, l'examen de la structure Cryo-EM de HucSLM révèle que la zone d'interaction entre HucS et HucM implique non pas un motif V-shape, mais deux hélices parallèles l'une à l'autre provenant chacune d'un monomère de HucS. Ces premiers constats laissent donc entendre que chaque oxydoréductase possède son propre motif pour interagir avec un module HMP. Ces observations font écho à notre analyse SSN de la famille des protéines à domaine HMP dont la répartition en groupes permet de distinguer 4 types selon la nature de l'oxydoréductase avec laquelle ces protéines interagissent (Figure 4a – Broc at al. (1)). Pour aller plus loin, il est donc indispensable d'obtenir des informations structurales sur des membres des groupes II contenant des NADH déshydrogénases (NDH) et III contenant des Sulfide quinone réductases (SQR), afin d'évaluer leur mode d'interaction avec le module HMP.

Chez les ForC, la séquence définissant le motif V-shape est située dans l'extension N-terminale. Comme évoqué précédemment, c'est un critère distinctif qui caractérise cette famille de FDH. Outre leur site actif non-consensus, ce qui caractérise un membre de la famille ForC est son interaction avec le module ForE. De ce fait, nous avons spéculé que les ForC ont divergé des autres FDH à extension en acquérant la capacité à interagir avec un module ForE. De manière intéressante, les analyses phylogénétiques présentées en Figure S1b (Broc et al. (1)) et Figure 30 montrent que l'information définissant les ForC comme une famille de FDH à part entière est portée à la fois par les domaines N- et C-terminaux.

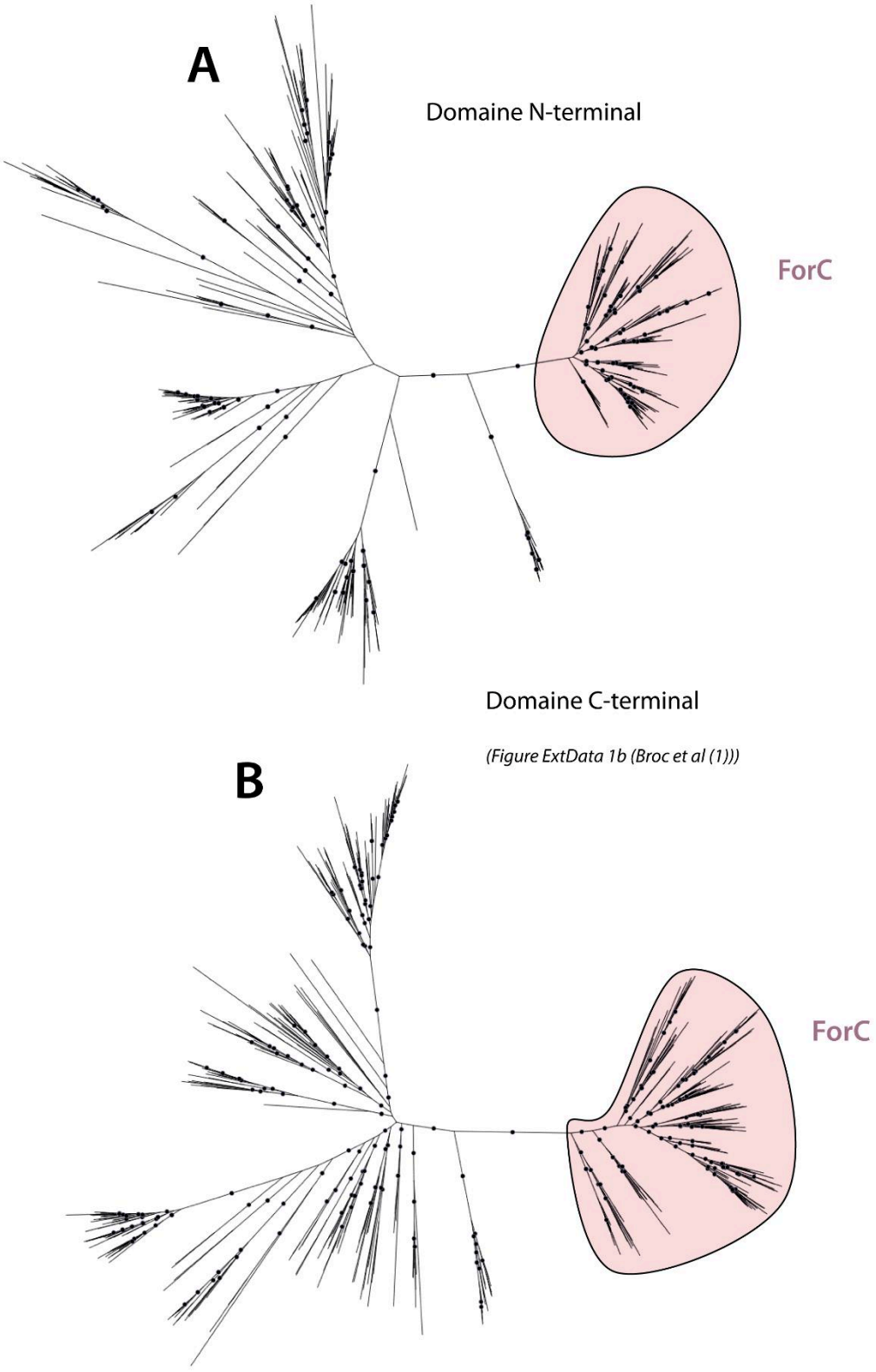


Figure 30 : Les séquences de domaines N-terminal et C-terminal ForC groupent distinctivement des autres séquences de FDH à extension.

Analyses phylogénétiques sur les domaines C-terminaux (A) et N-terminaux (B) de séquences de FDH à extension, réalisées avec l'approche de maximum likelihood. Chaque branche représente une unique séquence. Les séquences ForC sont colorées en rose. Les ronds noirs représentent des nœud pour lesquels les valeurs de bootstrap sont supérieures à 95%.

Ce résultat ne va pas dans le sens de notre hypothèse, car il était attendu que les séquences correspondant au domaine C-terminal de ForC se mélangent à celles des autres FDH. L'hypothèse de travail actuelle est donc que les sous-unités ForC ont évoluées et se sont différentiées après l'acquisition du module partenaire ForE. Par ailleurs, la répartition des séquences archéennes et bactériennes de ForC dans des embranchements distincts suggère que les ForC présentent un caractère ancien. Néanmoins, une analyse évolutive plus approfondie est nécessaire pour savoir si les ForC étaient présentent chez LUCA.

2. ForE, un module «plug- and-play »?

A ce stade, la simple comparaison entre ForCE et HucSLM n'est pas suffisante pour répondre à cette question, et une analyse plus globale concernant l'interaction avec le module HMP est requise. Sur cette base, nous avons récemment engagé, en collaboration avec Alain Schmitt (IGS, Marseille), des analyses computationnelles exploitant l'outil AlphaFold-multimer pour prédire les complexes entre une protéine cible et l'ensemble du protéome d'un organisme. Cette approche, plus communément appelée AlphaPulldown (Yu et al. 2023), visait à répondre à plusieurs questions : quels sont les partenaires potentiels d'interaction avec le module HMP ? Existe-t-il d'autres modalités structurales d'interaction avec le module ? L'analyse AlphaPulldown de ForE1 contre le protéome de *B. subtilis* a ainsi permis d'extraire une liste de partenaires potentiels, parmi lesquels ForC1 et ForC2 figurent avec le meilleur score d'interaction. Comment filtrer cette liste de candidats ? Pour cela, nous avons tiré profit du changement conformationnel du tétramère ForE1 induit par l'interaction avec ForC1. En effet, la prédiction structurale AlphaFold du tétramère de ForE1 se distingue de celle obtenue dans le complexe ForCE1 (lui-même très proche de la structure expérimentale) au niveau des fenêtres permettant l'interaction avec les sous unités ForC1. La formation des fenêtres permet de relier l'intérieur du tube au site de fixation de la quinone dans ForC, et constitue à ce titre un critère structural fonctionnel de l'interaction.

Chez *B. subtilis*, l'examen du cluster II de l'analyse SSN-GNN (Figure 4 – Broc et al. (1)) a révélé que le gène *ndh* est retrouvé en synténie avec le gène *yjlC* codant pour une protéine HMP. De manière intéressante, les analyses AlphaPulldown ont révélé que l'enzyme Ndh n'est pas un bon candidat pour l'interaction avec le tétramère ForE1, renforçant l'idée selon laquelle les sous-unités catalytiques ne sont pas interchangeables entre les différentes familles.

Toutefois, un troisième partenaire potentiel pour l'interaction avec ForE1 a été mis en lumière à travers cette approche computationnelle, en utilisant le filtre évoqué plus haut. Il s'agit de la protéine YuxK de fonction inconnue, faisant partie de la famille PFAM (PF04134) des Thiol-disulfide oxydoréductase (TDOR). Les TDOR sont des enzymes qui introduisent des ponts disulfures dans les protéines clientes en oxydant une paire de cystéines. Pour cela, un transfert d'électrons est réalisé depuis les cystéines de la protéine cliente vers le site actif de la TDOR composé d'un motif CXXC (Fujimoto, Inaba, et Kadokura 2019). Une fois son site actif réduit, la protéine TDOR doit le réoxyder afin de reformer son pont disulfure et prendre en charge une nouvelle protéine cliente. A titre d'exemple, la TDOR DsbA chez *E. coli* régénère son pont disulfure en libérant ses électrons à la protéine membranaire DsbB réagissant avec les quinones de la chaine respiratoire (Fujimoto, Inaba, et Kadokura 2019). Ainsi, la TDOR YuxK pourrait effectivement transférer ses électrons aux quinones de la chaine respiratoire en se servant du module ForE1 pour connecter la membrane. De manière intéressante, la modélisation du complexe YuxK-ForE1 via l'outil AlphaPulldown montre que l'interaction entre les deux protéines est médiée par deux hélices formant un V-shape dont la topologie est très similaire à celle de ForC1 (Figure 31A). Ceci conforte une nouvelle fois le fait que la présence d'un motif V-shape est spécifiquement requis pour interagir avec un module HMP de type ForE.

Dans le complexe ForE1-YuxK prédit, la zone d'interaction de YuxK avec la fenêtre de ForE1 forme une cavité similaire à celle observée dans ForC1 au sein de laquelle la quinone pourrait se loger, à proximité du pont disulfure formé par les cystéines C17 et C20 (Figure 31B). L'interaction entre ForE1 et YuxK semble donc pertinente, au regard de leurs fonctions respectives vis-à-vis de la réduction des quinones. Il serait intéressant de valider expérimentalement la formation des complexes YuxK-ForE1/ForE2 en les purifiants. Suite à cela, il faudrait évaluer la capacité de la ménadione à régénérer le pont disulfure de YuxK *in vitro*. Si l'interaction entre YuxK et ForE1/ForE2 s'avère fondée, l'impact de la délétion du gène *yuxK* sur la croissance de *B. subtilis* sera analysé. Cette question pourrait également être adressée à travers la double inactivation des gènes *forE1 et forE2*.

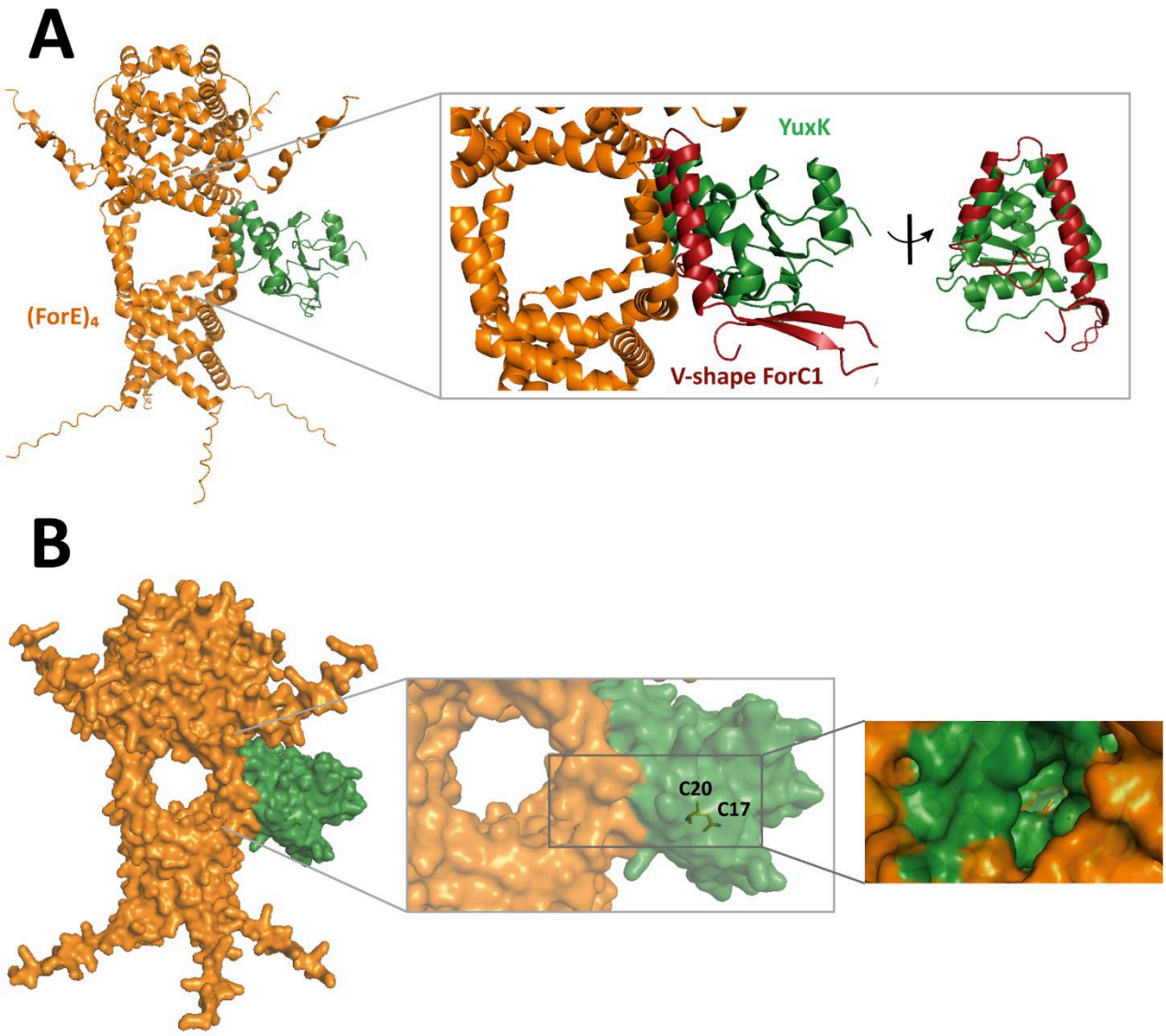


Figure 31 : Modélisation de l'interaction entre YuxK le tétramère de ForE1 prédit par l'analyse pulldown.

A : La protéine YuxK (vert) est prédite pour interragir avec le tétramère de ForE1 (orange) au niveau des fenêtres permettant donnant sur l'intérieur du tétramère. L'interraction est médiée par deux hélices, dont la topologie est très similaire au motif V-shape de ForC1 (rouge).

B : Représentation en surface du complexe $(ForE1)_4$-YuxK. La fenêtre du tétramère donne sur l'intérieur de la protéine YuxK, qui forme une cavité renfermant le site actif de la protéine composée des deux cystéines n°17 et 20.

La structure du complexe a été généré via le logiciel Alphafold-Multimer. Les images ont été générée via le logiciel Pymol.

Plus généralement, l'outil AlphaPulldown a permis de mettre en lumière une nouvelle famille de partenaires catalytiques potentiels, non identifiée lors des analyses GNN. Il est important de se rappeler qu'une cinquième organisation génomique a été révélée par cette analyse (groupe « non conserved arrangement »), au sein de laquelle le gène codant pour la protéine HMP est retrouvé isolé sur le génome. Ceci suggère que le gène codant pour le partenaire catalytique de ce module est localisé ailleurs sur le chromosome, à l'image du gène *yuxK* sur le chromosome de *B. subtilis*. Ceci laisse grandement penser que la nature des protéines en interaction avec une protéine HMP ne se restreint pas à 4 types d'oxydoréductases, et il serait intéressant d'approfondir la caractérisation de ce groupe à travers une approche de pulldown. A travers ce nouveau set d'analyse, nous espérons ouvrir de nouvelles perspectives concernant la diversité métabolique existant autour des protéines à domaine HMP.

En conclusion de ce manuscrit de thèse, l'identification et la caractérisation des enzymes ForCE en qualité de FDH atypiques a permis d'apporter un nouveau regard sur la diversité existante au sein de cette grande famille d'enzyme. Mes travaux de thèse ont suivi un fil conducteur constitué de cinq objectifs majeurs. (1) La caractérisation des ForCE au niveau biochimique a montré que l'activité formiate : quinone oxydoréductase de ces enzymes est portée par des résidus non-canoniques. Ce constat m'a amené à reconsidérer le postulat concernant le consensus d'acides aminés caractéristique de la famille des FDH. Par ailleurs, la différence de sensibilité à l'oxygène des enzymes ForCE les place comme des candidates pertinentes pour adresser les questions en suspens autour de ce phénomène. (2) L'analyse bio-informatique des FDH à extension N-terminale a révélé des organisations génomiques inédites permettant de définir de nouvelles sous-familles. Outre le fait qu'il serait enrichissant d'en caractériser les membres, ces analyses ont révélé la conservation du centre [2Fe-2S] au sein de l'extension N-terminale des enzymes ForCE, suscitant des questions quant au rôle de ce dernier. (3) La caractérisation de la sous-unité ForE en tant que module de liaison à la membrane, commun à différentes oxydoréductases, a soulevé des questions concernant sa « plus-value fonctionnelle » vis-à-vis de complexes interagissant directement avec la membrane. Au regard de sa topologie inhabituelle, ForE pourrait optimiser le processus de respiration *via* les stratégies discutées plus haut. Également, la question de l'interchangeabilité des sous-unités partenaires a permis d'identifier de nouveaux partenaires potentiels par l'utilisation d'outils computationnels, ouvrant de nouvelle perspectives sur l'importance de ce module dans le métabolisme microbien. (4)(5) Enfin, la caractérisation des enzymes ForCEs comme déshydrogénases primaires de la chaine respiratoire place le formiate dans la liste des substrats utilisés par *B. subtilis* pour produire de l'énergie. Jusqu'à présent, le métabolisme du formiate n'avait pas été exploré chez cette bactérie, et la présence de deux copies de l'opéron *forCE* sur le chromosome suggère qu'il pourrait être plus vaste que ce qu'on le pense. ForCE1 et ForCE2 n'étant visiblement pas destinées à intervenir dans les mêmes conditions physiologiques, la compréhension de leurs rôles respectifs au sien de la cellule apportera sans doute une meilleure compréhension du métabolisme du formiate chez *Bacillus subtilis.*

REFERENCES

Adam, Panagiotis S., Guillaume Borrel, et Simonetta Gribaldo. 2019. « An Archaeal Origin of the Wood–Ljungdahl H4MPT Branch and the Emergence of Bacterial Methylotrophy ». *Nature Microbiology* 4 (12): 2155-63. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0534-2.

Alekseeva, A A, S S Savin, et V I Tishkov. 2011. « NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase from Plants ». *Acta Naturae* 3 (4): 38-54. https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-4-38-54.

Almendra, Maria J., Carlos D. Brondino, Olga Gavel, Alice S. Pereira, Pedro Tavares, Sergey Bursakov, Rui Duarte, Jorge Caldeira, Jose J. G. Moura, et Isabel Moura. 1999. « Purification and Characterization of a Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from *Desulfovibrio Gigas* ». *Biochemistry* 38 (49): 16366-72. https://doi.org/10.1021/bi990069n.

Altuvia, S. 1998. « The Escherichia Coli OxyS Regulatory RNA Represses fhlA Translation by Blocking Ribosome Binding ». *The EMBO Journal* 17 (20): 6069-75. https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6069.

Anand, Ruchi, Pieter C. Dorrestein, Cynthia Kinsland, Tadhg P. Begley, et Steven E. Ealick. 2002. « Structure of Oxalate Decarboxylase from *Bacillus Subtilis* at 1.75 Å Resolution ' ». *Biochemistry* 41 (24): 7659-69. https://doi.org/10.1021/bi0200965.

Anbar, Ariel D. 2008. « Elements and Evolution ». *Science* 322 (5907): 1481-83. https://doi.org/10.1126/science.1163100.

Andorfer, Mary C., Lindsey R.F. Backman, Phoebe L. Li, Emily C. Ulrich, et Catherine L. Drennan. 2021. « Rescuing Activity of Oxygen-Damaged Pyruvate Formate-Lyase by a Spare Part Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 297 (6): 101423. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101423.

Arias-Cartín, Rodrigo, Alexandre Uzel, Farida Seduk, Guillaume Gerbaud, Fabien Pierrel, Marianne Broc, Régine Lebrun, et al. 2022. « Identification and Characterization of a Noncanonical Menaquinone-Linked Formate Dehydrogenase ». *Journal of Biological Chemistry* 298 (2): 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

Arnoux, Pascal, Christian Ruppelt, Flore Oudouhou, Jérôme Lavergne, Marina I. Siponen, René Toci, Ralf R. Mendel, et al. 2015. « Sulphur Shuttling across a Chaperone during Molybdenum Cofactor Maturation ». *Nature Communications* 6 (1): 6148. https://doi.org/10.1038/ncomms7148.

Arnoux, Pascal, Monique Sabaty, Jean Alric, Bettina Frangioni, Bruno Guigliarelli, Jean-Marc Adriano, et David Pignol. 2003. « Structural and Redox Plasticity in the Heterodimeric Periplasmic Nitrate Reductase ». *Nature Structural Biology* 10 (11): 928-34. https://doi.org/10.1038/nsb994.

Azeredo, Denise R.P., Verônica Alvarenga, Anderson S. Sant'Ana, et Armando U.O. Sabaa Srur. 2016. « An Overview of Microorganisms and Factors Contributing for the Microbial Stability of Carbonated Soft Drinks ». *Food Research International* 82 (avril): 136-44. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.024.

Barber, Michael J., Hal D. May, et James G. Ferry. 1986. « Inactivation of Formate Dehydrogenase from Methanobacterium Formicicum by Cyanide ». *Biochemistry* 25 (25): 8150-55. https://doi.org/10.1021/bi00373a004.

Baymann, Frauke, Evelyne Lebrun, Myriam Brugna, Barbara Schoepp–Cothenet, Marie–Thérèse Giudici–Orticoni, et Wolfgang Nitschke. 2003. « The Redox Protein Construction Kit: Pre-Last Universal Common Ancestor Evolution of Energy-Conserving Enzymes ». Édité par J. F. Allen et J. A. Raven. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358 (1429): 267-74. https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1184.

Baymann, Frauke, Barbara Schoepp-Cothenet, Simon Duval, Marianne Guiral, Myriam Brugna, Carole Baffert, Michael J. Russell, et Wolfgang Nitschke. 2018. « On the Natural History of Flavin-Based Electron Bifurcation ». *Frontiers in Microbiology* 9 (juillet): 1357. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01357.

Beales, N. 2004. « Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3 (1): 1-20. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x.

Beek, Alex Ter, Bart J. F. Keijser, Andre Boorsma, Anna Zakrzewska, Rick Orij, Gertien J. Smits, et Stanley Brul. 2008. « Transcriptome Analysis of Sorbic Acid-Stressed *Bacillus Subtilis* Reveals a Nutrient Limitation Response and Indicates Plasma Membrane Remodeling ». *Journal of Bacteriology* 190 (5): 1751-61. https://doi.org/10.1128/JB.01516-07.

Beinert, Helmut, et Graham Palmer. 1965. « Contributions of EPR Spectroscopy to Our Knowledge of Oxidative Enzymes ». In *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, édité par F. F. Nord, 1re éd., 27:105-98. Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470122723.ch3.

Beyer, Lydia, Claudia Doberenz, Dörte Falke, Doreen Hunger, Bernhard Suppmann, et R. Gary Sawers. 2013. « Coordination of FocA and Pyruvate Formate-Lyase Synthesis in Escherichia Coli Demonstrates Preferential Translocation of Formate over Other Mixed-Acid Fermentation Products ». *Journal of Bacteriology* 195 (7): 1428-35. https://doi.org/10.1128/JB.02166-12.

Bierbaumer, Sarah, Maren Nattermann, Luca Schulz, Reinhard Zschoche, Tobias J. Erb, Christoph K. Winkler, Matthias Tinzl, et Silvia M. Glueck. 2023. « Enzymatic Conversion of CO_2 : From Natural to Artificial Utilization ». *Chemical Reviews* 123 (9): 5702-54. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00581.

Birmingham, Marion K., et K. A. C. Elliott. 1952. « APPLICATIONS OF THE HENDERSON-HASSELBALCH EQUATION TO SINGLE AND MIXED BUFFER SOLUTIONS: WITH A NOTE ON CONSTANTS FOR BICARBONATE BUFFER AND EXAMPLES OF APPLICATIONS TO WARBURG MANOMETRIC STUDIES ». *Canadian Journal of Medical Sciences* 30 (5): 403-16. https://doi.org/10.1139/cjms52-051.

Böhmer, Nadine, Tobias Hartmann, et Silke Leimkühler. 2014. « The Chaperone FdsC for *Rhodobacter Capsulatus* Formate Dehydrogenase Binds the Bis-molybdopterin Guanine Dinucleotide Cofactor ». *FEBS Letters* 588 (4): 531-37. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.033.

Booth, I. R., et M. Stratford. 2003. « Acidulants and Low pH ». In *Food Preservatives*, édité par N. J. Russell et Grahame W. Gould, 25-47. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_3.

Borrel, Guillaume, Panagiotis S. Adam, et Simonetta Gribaldo. 2016. « Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association ». *Genome Biology and Evolution* 8 (6): 1706-11. https://doi.org/10.1093/gbe/evw114.

Boyington, Jeffrey C., Vadim N. Gladyshev, Sergei V. Khangulov, Thressa C. Stadtman, et Peter D. Sun. 1997. « Crystal Structure of Formate Dehydrogenase H: Catalysis Involving Mo, Molybdopterin, Selenocysteine, and an Fe $_4$ S $_4$ Cluster ». *Science* 275 (5304): 1305-8. https://doi.org/10.1126/science.275.5304.1305.

Brameyer, Sophie, Kilian Schumacher, Sonja Kuppermann, et Kirsten Jung. 2022. « Division of Labor and Collective Functionality in Escherichia Coli under Acid Stress ». *Communications Biology* 5 (1): 327. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03281-4.

Brito, José A., Filipa L. Sousa, Meike Stelter, Tiago M. Bandeiras, Clemens Vonrhein, Miguel Teixeira, Manuela M. Pereira, et Margarida Archer. 2009. « Structural and Functional Insights into Sulfide:Quinone Oxidoreductase ' ». *Biochemistry* 48 (24): 5613-22. https://doi.org/10.1021/bi9003827.

Britt, R. David, Guodong Rao, et Lizhi Tao. 2020. « Bioassembly of Complex Iron–Sulfur Enzymes: Hydrogenases and Nitrogenases ». *Nature Reviews Chemistry* 4 (10): 542-49. https://doi.org/10.1038/s41570-020-0208-x.

Broderick, Joan B., Amanda S. Byer, Kaitlin S. Duschene, Benjamin R. Duffus, Jeremiah N. Betz, Eric M. Shepard, et John W. Peters. 2014. « H-Cluster Assembly during Maturation of the [FeFe]-Hydrogenase ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19 (6): 747-57. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1168-8.

Buckel, Wolfgang, et Rudolf K. Thauer. 2018. « Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD+ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mars): 401. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00401.

Butler, Clive S., John M. Charnock, Brian Bennett, Heather J. Sears, Ann J. Reilly, Stuart J. Ferguson, C. David Garner, et al. 1999. « Models for Molybdenum Coordination during the Catalytic Cycle of Periplasmic Nitrate Reductase from *Paracoccus Denitrificans* Derived from EPR and EXAFS Spectroscopy ». *Biochemistry* 38 (28): 9000-9012. https://doi.org/10.1021/bi990402n.

Butler, Clive S, John M Charnock, C David Garner, Andrew J Thomson, Stuart J Ferguson, Ben C Berks, et David J Richardson. 2000. « Thiocyanate Binding to the Molybdenum Centre of the Periplasmic Nitrate Reductase from Paracoccus Pantotrophus », 6.

Catling, David C., et Kevin J. Zahnle. 2020. « The Archean Atmosphere ». *Science Advances* 6 (9): eaax1420. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1420.

Cerqueira, Nuno M. F. S. A., Pedro A. Fernandes, Pablo J. Gonzalez, José J. G. Moura, et Maria J. Ramos. 2013. « The Sulfur Shift: An Activation Mechanism for Periplasmic Nitrate Reductase and Formate Dehydrogenase ». *Inorganic Chemistry* 52 (19): 10766-72. https://doi.org/10.1021/ic3028034.

Chang, Ying-Ying, et John E. Cronan. 1999. « Membrane Cyclopropane Fatty Acid Content Is a Major Factor in Acid Resistance of *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 33 (2): 249-59. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01456.x.

Chazarreta-Cifre, Lorena, Leticia Martiarena, Diego De Mendoza, et Silvia G. Altabe. 2011. « Role of Ferredoxin and Flavodoxins in Bacillus Subtilis Fatty Acid Desaturation ». *Journal of Bacteriology* 193 (16): 4043-48. https://doi.org/10.1128/JB.05103-11.

Cherney, Maia M., Yanfei Zhang, Matthew Solomonson, Joel H. Weiner, et Michael N.G. James. 2010. « Crystal Structure of Sulfide:Quinone Oxidoreductase from Acidithiobacillus Ferrooxidans: Insights into Sulfidotrophic Respiration and Detoxification ». *Journal of Molecular Biology* 398 (2): 292-305. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.018.

Clegg, Stephanie, Feng Yu, Lesley Griffiths, et Jeffrey A. Cole. 2002. « The Roles of the Polytopic Membrane Proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia Coli* K-12: Two Nitrate and Three Nitrite Transporters ». *Molecular Microbiology* 44 (1): 143-55. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02858.x.

Conter, Carolina, Elisa Oppici, Mirco Dindo, Luigia Rossi, Mauro Magnani, et Barbara Cellini. 2019. « Biochemical Properties and Oxalate-degrading Activity of Oxalate Decarboxylase from Bacillus Subtilis at Neutral pH ». *IUBMB Life* 71 (7): 917-27. https://doi.org/10.1002/iub.2027.

Cosgriff, Sarah, Kiran Chintakayala, Ya Tsz A. Chim, Xinyong Chen, Stephanie Allen, Andrew L. Lovering, et David C. Grainger. 2010. « Dimerization and DNA-Dependent Aggregation of the Escherichia Coli Nucleoid Protein and Chaperone CbpA: Interactions of the CbpA Protein ». *Molecular Microbiology* 77 (5): 1289-1300. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07292.x.

Costa, Cristina, Miguel Teixeira, Jean LeGall, José J. G. Moura, et I. Moura. 1997. « Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774: Isolation and Spectroscopic Characterization of the Active Sites (Heme, Iron-Sulfur Centers and Molybdenum) ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2 (2): 198-208. https://doi.org/10.1007/s007750050125.

Costa, Kyle C., Phoebe M. Wong, Tiansong Wang, Thomas J. Lie, Jeremy A. Dodsworth, Ingrid Swanson, June A. Burn, Murray Hackett, et John A. Leigh. 2010. « Protein Complexing in a Methanogen Suggests Electron Bifurcation and Electron Delivery from Formate to Heterodisulfide Reductase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (24): 11050-55. https://doi.org/10.1073/pnas.1003653107.

Costa, Teresa, Leif Steil, Lígia O. Martins, Uwe Völker, et Adriano O. Henriques. 2004. « Assembly of an Oxalate Decarboxylase Produced under σ^{K} Control into the *Bacillus Subtilis* Spore Coat ». *Journal of Bacteriology* 186 (5): 1462-74. https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1462-1474.2004.

Cui, Shixiu, Hongzhi Xia, Taichi Chen, Yang Gu, Xueqin Lv, Yanfeng Liu, Jianghua Li, Guocheng Du, et Long Liu. 2020. « Cell Membrane and Electron Transfer Engineering for Improved Synthesis of Menaquinone-7 in Bacillus Subtilis ». *iScience* 23 (3): 100918. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100918.

Czyzewski, Bryan K., et Da-Neng Wang. 2012. « Identification and Characterization of a Bacterial Hydrosulphide Ion Channel ». *Nature* 483 (7390): 494-97. https://doi.org/10.1038/nature10881.

Da Silva, Sofia Marques, Isabel Pacheco, et Inês A. Cardoso Pereira. 2012. « Electron Transfer between Periplasmic Formate Dehydrogenase and Cytochromes c in Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774 ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17 (5): 831-38. https://doi.org/10.1007/s00775-012-0900-5.

De Bok, Frank A. M., Maurice L. G. C. Luijten, et Alfons J. M. Stams. 2002. « Biochemical Evidence for Formate Transfer in Syntrophic Propionate-Oxidizing Cocultures of *Syntrophobacter Fumaroxidans* and *Methanospirillum Hungatei* ». *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9): 4247-52. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4247-4252.2002.

De La Haba, Rafael R., André Antunes, et Brian P. Hedlund. 2022. « Editorial: Extremophiles: Microbial Genomics and Taxogenomics ». *Frontiers in Microbiology* 13 (août): 984632. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.984632.

Dementin, Sébastien, Pascal Arnoux, Bettina Frangioni, Sandrine Grosse, Christophe Léger, Bénédicte Burlat, Bruno Guigliarelli, Monique Sabaty, et David Pignol. 2007. « Access to the Active Site of Periplasmic Nitrate Reductase: Insights from Site-Directed Mutagenesis and Zinc Inhibition Studies ». *Biochemistry* 46 (34): 9713-21. https://doi.org/10.1021/bi700928m.

Dergham, Yasmine, Dominique Le Coq, Pierre Nicolas, Elena Bidnenko, Sandra Dérozier, Maxime Deforet, Eugénie Huillet, et al. 2023. « Direct Comparison of Spatial Transcriptional Heterogeneity across Diverse Bacillus Subtilis Biofilm Communities ». *Nature Communications* 14 (1): 7546. https://doi.org/10.1038/s41467-023-43386-w.

Doberenz, Claudia, Michael Zorn, Dörte Falke, David Nannemann, Doreen Hunger, Lydia Beyer, Christian H. Ihling, Jens Meiler, Andrea Sinz, et R. Gary Sawers. 2014. « Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation ». *Journal of Molecular Biology* 426 (15): 2827-39. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.023.

Drew, David, Rachel A. North, Kumar Nagarathinam, et Mikio Tanabe. 2021. « Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS) ». *Chemical Reviews* 121 (9): 5289-5335. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983.

Ducluzeau, Anne-Lise, Barbara Schoepp-Cothenet, Frauke Baymann, Michael J. Russell, et Wolfgang Nitschke. 2014. « Free Energy Conversion in the LUCA: Quo Vadis? » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837 (7): 982-88. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.12.005.

Duffus, Benjamin R., Peer Schrapers, Nils Schuth, Stefan Mebs, Holger Dau, Silke Leimkühler, et Michael Haumann. 2020. « Anion Binding and Oxidative Modification at the Molybdenum Cofactor of Formate Dehydrogenase from *Rhodobacter Capsulatus* Studied by X-Ray Absorption Spectroscopy ». *Inorganic Chemistry* 59 (1): 214-25. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01613.

Elferink, Marieke G.L., Janny G. De Wit, Arnold J.M. Driessen, et Wil N. Konings. 1994. « Stability and Proton-Permeability of Liposomes Composed of Archaeal Tetraether Lipids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1193 (2): 247-54. https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90160-0.

Facey, Sandra J., et Andreas Kuhn. 2010. « Biogenesis of Bacterial Inner-Membrane Proteins ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (14): 2343-62. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0303-0.

Fleury, Benjamin, Nathalie Carrasco, Maëva Millan, Ludovic Vettier, et Cyril Szopa. 2017. « Organic Chemistry in a CO2 Rich Early Earth Atmosphere ». *Earth and Planetary Science Letters* 479 (décembre): 34-42. https://doi.org/10.1016/j.epsl.2017.09.026.

Fourmond, Vincent, Nicolas Plumeré, et Christophe Léger. 2021. « Reversible Catalysis ». *Nature Reviews Chemistry* 5 (5): 348-60. https://doi.org/10.1038/s41570-021-00268-3.

Fuchs, Georg. 2011. « Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? » *Annual Review of Microbiology* 65 (1): 631-58. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102801.

Fujimoto, Takushi, Kenji Inaba, et Hiroshi Kadokura. 2019. « Methods to Identify the Substrates of Thiol-disulfide Oxidoreductases ». *Protein Science* 28 (1): 30-40. https://doi.org/10.1002/pro.3530.

Gabba, Matteo, Jacopo Frallicciardi, Joury Van 'T Klooster, Ryan Henderson, Łukasz Syga, Robert Mans, Antonius J.A. Van Maris, et Bert Poolman. 2020. « Weak Acid Permeation in Synthetic Lipid Vesicles and Across the Yeast Plasma Membrane ». *Biophysical Journal* 118 (2): 422-34. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.3384.

Galmés, Jeroni, Sebastià Capó-Bauçà, Ülo Niinemets, et Concepción Iñiguez. 2019. « Potential Improvement of Photosynthetic CO2 Assimilation in Crops by Exploiting the Natural Variation in the Temperature Response of Rubisco Catalytic Traits ». *Current Opinion in Plant Biology* 49 (juin): 60-67. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.05.002.

Gangeswaran, R, D J Lowe, et R R Eady. 1993. « Purification and Characterization of the Assimilatory Nitrate Reductase of Azotobacter Vinelandii ». *Biochemical Journal* 289 (2): 335-42. https://doi.org/10.1042/bj2890335.

George, Graham N., James Hilton, Carrie Temple, Roger C. Prince, et K. V. Rajagopalan. 1999. « Structure of the Molybdenum Site of Dimethyl Sulfoxide Reductase ». *Journal of the American Chemical Society* 121 (6): 1256-66. https://doi.org/10.1021/ja982843k.

Glaser, P, A Danchin, F Kunst, P Zuber, et M M Nakano. 1995. « Identification and Isolation of a Gene Required for Nitrate Assimilation and Anaerobic Growth of Bacillus Subtilis ». *Journal of Bacteriology* 177 (4): 1112-15. https://doi.org/10.1128/jb.177.4.1112-1115.1995.

Graham, Joel E., Dimitri Niks, Grant M. Zane, Qin Gui, Kellie Hom, Russ Hille, Judy D. Wall, et C. S. Raman. 2022. « How a Formate Dehydrogenase Responds to Oxygen: Unexpected O_2 Insensitivity of an Enzyme Harboring Tungstopterin, Selenocysteine, and [4Fe–4S] Clusters ». *ACS Catalysis* 12 (16): 10449-71. https://doi.org/10.1021/acscatal.2c00316.

Green, Amanda J., Andrew W. Munro, Myles R. Cheesman, Graeme A. Reid, Claes Von Wachenfeldt, et Stephen K. Chapman. 2003. « Expression, Purification and Characterisation of a Bacillus Subtilis Ferredoxin: A Potential Electron Transfer Donor to Cytochrome P450 BioI ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 93 (1-2): 92-99. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00456-7.

Grimaldi, Stéphane, Barbara Schoepp-Cothenet, Pierre Ceccaldi, Bruno Guigliarelli, et Axel Magalon. 2013. « The Prokaryotic Mo/W-bisPGD Enzymes Family: A Catalytic Workhorse in Bioenergetic ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827 (8-9): 1048-85. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.01.011.

Gu, Zhenglong, Dan Nicolae, Henry H-S. Lu, et Wen-Hsiung Li. 2002. « Rapid Divergence in Expression between Duplicate Genes Inferred from Microarray Data ». *Trends in Genetics* 18 (12): 609-13. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02837-8.

Guan, Ningzi, et Long Liu. 2020. « Microbial Response to Acid Stress: Mechanisms and Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (1): 51-65. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1.

Gumerov, Vadim M, et Igor B Zhulin. 2020. « TREND: a platform for exploring protein function in prokaryotes based on phylogenetic, domain architecture and gene neighborhood analyses ». *Nucleic Acids Research* 48 (W1): W72-76. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa243.

Hakopian, Sheron, Dimitri Niks, et Russ Hille. 2022. « The Air-Inactivation of Formate Dehydrogenase FdsDABG from Cupriavidus Necator ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 231 (juin): 111788. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111788.

Hartmann, Tobias, et Silke Leimkühler. 2013. « The Oxygen-tolerant and NAD^+-dependent Formate Dehydrogenase from *Rhodobacter Capsulatus* Is Able to Catalyze the Reduction of CO_2 to Formate ». *The FEBS Journal* 280 (23): 6083-96. https://doi.org/10.1111/febs.12528.

Hartmann, Tobias, Peer Schrapers, Tillmann Utesch, Manfred Nimtz, Yvonne Rippers, Holger Dau, Maria Andrea Mroginski, Michael Haumann, et Silke Leimkühler. 2016. « The Molybdenum Active Site of Formate Dehydrogenase Is Capable of Catalyzing C–H Bond Cleavage and Oxygen Atom Transfer Reactions ». *Biochemistry* 55 (16): 2381-89. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00002.

Hattori, Satoshi, Hongwei Luo, I Hirofumi Shoun, et YOICHI KAMAGATAl. s. d. « Involvement of Formate as an Interspecies Electron Carrier in a Syntrophic Acetate-Oxidizing Anaerobic Microorganism in Coculture with Methanogens ».

Hecker, Michael, Jan Pané-Farré, et Völker Uwe. 2007. « SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus Subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria ». *Annual Review of Microbiology* 61 (1): 215-36. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093445.

Hervé, Nicolas. 2023. « Synthèse du sixième rapport de synthèse du GIEC ».

Hietala, Jukka, Antti Vuori, Pekka Johnsson, Ilkka Pollari, Werner Reutemann, et Heinz Kieczka. 2016. « Formic Acid ». In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, édité par Wiley-VCH, 1re éd., 1-22. Wiley. https://doi.org/10.1002/14356007.a12_013.pub3.

Hille, Russ. 2002. « Molybdenum and Tungsten in Biology ». TRENDS in Biochemical Sciences. Vol.27 No.7, July 2002. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02107-2.

Hong, Weizhe, Ye E. Wu, Xinmiao Fu, et Zengyi Chang. 2012. « Chaperone-Dependent Mechanisms for Acid Resistance in Enteric Bacteria ». *Trends in Microbiology* 20 (7): 328-35. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.001.

Hopper, S, I Korsa, et A Böck. 1996. « The Nucleotide Concentration Determines the Specificity of in Vitro Transcription Activation by the Sigma 54-Dependent Activator FhlA ». *Journal of Bacteriology* 178 (1): 199-203. https://doi.org/10.1128/jb.178.1.199-203.1996.

Huang, Yanyan, Mitsu Suyemoto, Cherilyn D. Garner, Kellie M. Cicconi, et Craig Altier. 2008. « Formate Acts as a Diffusible Signal To Induce *Salmonella* Invasion ». *Journal of Bacteriology* 190 (12): 4233-41. https://doi.org/10.1128/JB.00205-08.

Iuchi, S., et E. C. C. Lin. 1993. « Adaptation of *Escherichia Coli* to Redox Environments by Gene Expression ». *Molecular Microbiology* 9 (1): 9-15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01664.x.

Iyalomhe, Osigbemhe, Chandra M. Khantwal, et Di Cody Kang. 2015. « The Structure and Function of OxlT, the Oxalate Transporter of Oxalobacter Formigenes ». *The Journal of Membrane Biology* 248 (4): 641-50. https://doi.org/10.1007/s00232-014-9728-y.

Jaunet-Lahary, Titouan, Tatsuro Shimamura, Masahiro Hayashi, Norimichi Nomura, Kouta Hirasawa, Tetsuya Shimizu, Masao Yamashita, et al. 2023. « Structure and Mechanism of Oxalate Transporter OxlT in an Oxalate-Degrading Bacterium in the Gut Microbiota ». *Nature Communications* 14 (1): 1730. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36883-5.

Jeong, Kwang Cheol, Kai Foong Hung, David J Baumler, Jeffrey J Byrd, et Charles W Kaspar. 2008. « Acid Stress Damage of DNA Is Prevented by Dps Binding in Escherichia coliO157:H7 ». *BMC Microbiology* 8 (1): 181. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-181.

Jepson, Brian J.N., Lee J. Anderson, Luis M. Rubio, Clare J. Taylor, Clive S. Butler, Enrique Flores, Antonia Herrero, Julea N. Butt, et David J. Richardson. 2004. « Tuning a Nitrate Reductase for Function ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32212-18. https://doi.org/10.1074/jbc.M402669200.

Jepson, Brian J.N., Sudesh Mohan, Thomas A. Clarke, Andrew J. Gates, Jeffrey A. Cole, Clive S. Butler, Julea N. Butt, Andrew M. Hemmings, et David J. Richardson. 2007. « Spectropotentiometric and Structural Analysis of the Periplasmic Nitrate Reductase from Escherichia Coli ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6425-37. https://doi.org/10.1074/jbc.M607353200.

Joly, Nicolas, Alex Böhm, Winfried Boos, et Evelyne Richet. 2004. « MalK, the ATP-Binding Cassette Component of the Escherichia Coli Maltodextrin Transporter, Inhibits the Transcriptional Activator MalT by Antagonizing Inducer Binding ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 33123-30. https://doi.org/10.1074/jbc.M403615200.

Jormakka, Mika, Susanna Törnroth, Bernadette Byrne, et So Iwata. 2002. « Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N ». *Science* 295 (5561): 1863-68. https://doi.org/10.1126/science.1068186.

Kammel, Michelle, Doreen Hunger, et Robert Gary Sawers. 2021. « The Soluble Cytoplasmic N-terminal Domain of the FocA Channel Gates Bidirectional Formate Translocation ». *Molecular Microbiology* 115 (4): 758-73. https://doi.org/10.1111/mmi.14641.

Kammel, Michelle, Constanze Pinske, et R. Gary Sawers. 2022. « FocA and Its Central Role in Fine-Tuning pH Homeostasis of Enterobacterial Formate Metabolism ». *Microbiology* 168 (10). https://doi.org/10.1099/mic.0.001253.

Kammel, Michelle, et R. Gary Sawers. 2022. « The FocA Channel Functions to Maintain Intracellular Formate Homeostasis during Escherichia Coli Fermentation ». *Microbiology* 168 (4). https://doi.org/10.1099/mic.0.001168.

Kammel, Michelle, Oliver Trebbin, Constanze Pinske, et R. Gary Sawers. 2022. « A Single Amino Acid Exchange Converts FocA into a Unidirectional Efflux Channel for Formate ». *Microbiology* 168 (1). https://doi.org/10.1099/mic.0.001132.

Kammel, Michelle, Oliver Trebbin, et Robert Gary Sawers. 2022. « Interplay between the Conserved Pore Residues Thr-91 and His-209 Controls Formate Translocation through the FocA Channel ». *Microbial Physiology* 32 (3-4): 95-107. https://doi.org/10.1159/000524454.

Kim, Bae Hoon, Seungki Kim, Hyeon Guk Kim, Jin Lee, In Soo Lee, et Yong Keun Park. 2005. « The Formation of Cyclopropane Fatty Acids in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium ». *Microbiology* 151 (1): 209-18. https://doi.org/10.1099/mic.0.27265-0.

Kitko, Ryan D., Rebecca L. Cleeton, Erin I. Armentrout, Grace E. Lee, Ken Noguchi, Melanie B. Berkmen, Brian D. Jones, et Joan L. Slonczewski. 2009. « Cytoplasmic Acidification and the Benzoate Transcriptome in Bacillus Subtilis ». Édité par Malcolm James Horsburgh. *PLoS ONE* 4 (12): e8255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008255.

Konkol, M. A., K. M. Blair, et D. B. Kearns. 2013. « Plasmid-Encoded ComI Inhibits Competence in the Ancestral 3610 Strain of Bacillus Subtilis ». *Journal of Bacteriology* 195 (18): 4085-93. https://doi.org/10.1128/JB.00696-13.

KovÃ¡cs, TamÃ¡s, Attila Hargitai, KornÃ©l L KovÃ¡cs, et Imre MÃ©cs. 1998. « pH-Dependent Activation of the Alternative Transcriptional Factor σ ^{B} in *Bacillus Subtilis* ». *FEMS Microbiology Letters* 165 (2): 323-28. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13164.x.

Kuwazaki, Seigo, Naoki Takaya, Akira Nakamura, et Hirofumi Shoun. 2003. « Formate-Forming Fungal Catabolic Pathway to Supply Electrons to Nitrate Respiration ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (4): 937-39. https://doi.org/10.1271/bbb.67.937.

Lang, Susan Q., Gretchen L. Früh-Green, Stefano M. Bernasconi, William J. Brazelton, Matthew O. Schrenk, et Julia M. McGonigle. 2018. « Deeply-Sourced Formate Fuels Sulfate Reducers but Not Methanogens at Lost City Hydrothermal Field ». *Scientific Reports* 8 (1): 755. https://doi.org/10.1038/s41598-017-19002-5.

Larsson, Jonas T., Annika Rogstam, et Claes Von Wachenfeldt. 2005. « Coordinated Patterns of Cytochrome Bd and Lactate Dehydrogenase Expression in Bacillus Subtilis ». *Microbiology* 151 (10): 3323-35. https://doi.org/10.1099/mic.0.28124-0.

Le, Chi (Chip), Minwoo Bae, Sina Kiamehr, et Emily P. Balskus. 2022. « Emerging Chemical Diversity and Potential Applications of Enzymes in the DMSO Reductase Superfamily ». *Annual Review of Biochemistry* 91 (1): 475-504. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-110804.

Lee, Hyeonsik, Jiyun Bae, Sangrak Jin, Seulgi Kang, et Byung-Kwan Cho. 2022. « Engineering Acetogenic Bacteria for Efficient One-Carbon Utilization ». *Frontiers in Microbiology* 13 (mai): 865168. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.865168.

Leibig, Martina, Manuel Liebeke, Diana Mader, Michael Lalk, Andreas Peschel, et Friedrich Götz. 2011. « Pyruvate Formate Lyase Acts as a Formate Supplier for Metabolic Processes during Anaerobiosis in *Staphylococcus Aureus* ». *Journal of Bacteriology* 193 (4): 952-62. https://doi.org/10.1128/JB.01161-10.

Leimkühler, Silke. 2023. « Metal-Containing Formate Dehydrogenases, a Personal View ». *Molecules* 28 (14): 5338. https://doi.org/10.3390/molecules28145338.

Lemieux, M. Joanne. 2008. « A Perspective on the Structural Studies of Inner Membrane Electrochemical Potential-Driven Transporters ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (9): 1805-13. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.01.009.

Leonhartsberger, Susanne, Armin Ehrenreich, et August Böck. 2000. « Analysis of the Domain Structure and the DNA Binding Site of the Transcriptional Activator FhlA ». *European Journal of Biochemistry* 267 (12): 3672-84. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01399.x.

Letunic, Ivica, et Peer Bork. 2021. « Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation ». *Nucleic Acids Research* 49 (W1): W293-96. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301.

Liu, Yuping, Hongzhi Tang, Zhanglin Lin, et Ping Xu. 2015. « Mechanisms of Acid Tolerance in Bacteria and Prospects in Biotechnology and Bioremediation ». *Biotechnology Advances* 33 (7): 1484-92. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.001.

Lü, Wei, Juan Du, Nikola J. Schwarzer, Elke Gerbig-Smentek, Oliver Einsle, et Susana L. A. Andrade. 2012. « The Formate Channel FocA Exports the Products of Mixed-Acid Fermentation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (33): 13254-59. https://doi.org/10.1073/pnas.1204201109.

Lü, Wei, Juan Du, Nikola J. Schwarzer, Tobias Wacker, Susana L.A. Andrade, et Oliver Einsle. 2013. « The Formate/Nitrite Transporter Family of Anion Channels ». *Bchm* 394 (6): 715-27. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0339.

Lü, Wei, Juan Du, Tobias Wacker, Elke Gerbig-Smentek, Susana L. A. Andrade, et Oliver Einsle. 2011. « pH-Dependent Gating in a FocA Formate Channel ». *Science* 332 (6027): 352-54. https://doi.org/10.1126/science.1199098.

Lü, Wei, Nikola J. Schwarzer, Juan Du, Elke Gerbig-Smentek, Susana L. A. Andrade, et Oliver Einsle. 2012. « Structural and Functional Characterization of the Nitrite Channel NirC from *Salmonella Typhimurium* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (45): 18395-400. https://doi.org/10.1073/pnas.1210793109.

Lund, Peter A., Daniela De Biase, Oded Liran, Ott Scheler, Nuno Pereira Mira, Zeynep Cetecioglu, Estefanía Noriega Fernández, et al. 2020. « Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation ». *Frontiers in Microbiology* 11 (septembre): 556140. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140.

Lund, Peter, Angela Tramonti, et Daniela De Biase. 2014. « Coping with Low pH: Molecular Strategies in Neutralophilic Bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 38 (6): 1091-1125. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076.

MacLellan, Shawn R., John D. Helmann, et Haike Antelmann. 2009. « The Yvrl Alternative σ Factor Is Essential for Acid Stress Induction of Oxalate Decarboxylase in *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 191 (3): 931-39. https://doi.org/10.1128/JB.01435-08.

Magalon, Axel. 2023. « History of Maturation of Prokaryotic Molybdoenzymes—A Personal View ». *Molecules* 28 (20): 7195. https://doi.org/10.3390/molecules28207195.

Magalon, Axel, et François Alberge. 2016. « Distribution and Dynamics of OXPHOS Complexes in the Bacterial Cytoplasmic Membrane ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857 (3): 198-213. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.10.015.

Magalon, Axel, Pierre Ceccaldi, et Barbara Schoepp-Cothenet. 2016. « CHAPTER 5. The Prokaryotic Mo/W-bisPGD Enzymes Family ». In *Metallobiology*, édité par Russ Hille, Carola Schulzke, et Martin L Kirk, 143-91. Cambridge: Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781782623915-00143.

Magalon, Axel, Chantal Frixon, Jeanine Pommier, Gérard Giordano, et Francis Blasco. 2002. « In VivoInteractions between Gene Products Involved in the Final Stages of Molybdenum Cofactor Biosynthesis inEscherichia Coli ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48199-204. https://doi.org/10.1074/jbc.M205806200.

Magalon, Axel, et Ralf R. Mendel. 2015. « Biosynthesis and Insertion of the Molybdenum Cofactor ». Édité par Valley Stewart. *EcoSal Plus* 6 (2): ecosalplus.ESP-0006-2013. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013.

Maia, Luisa B., Luis Fonseca, Isabel Moura, et José J. G. Moura. 2016. « Reduction of Carbon Dioxide by a Molybdenum-Containing Formate Dehydrogenase: A Kinetic and Mechanistic Study ». *Journal of the American Chemical Society* 138 (28): 8834-46. https://doi.org/10.1021/jacs.6b03941.

Maia, Luisa B., José J. G. Moura, et Isabel Moura. 2015. « Molybdenum and Tungsten-Dependent Formate Dehydrogenases ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20 (2): 287-309. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1218-2.

Maini Rekdal, Vayu, Paola Nol Bernadino, Michael U Luescher, Sina Kiamehr, Chip Le, Jordan E Bisanz, Peter J Turnbaugh, Elizabeth N Bess, et Emily P Balskus. 2020. « A Widely Distributed Metalloenzyme Class Enables Gut Microbial Metabolism of Host- and Diet-Derived Catechols ». *eLife* 9 (février): e50845. https://doi.org/10.7554/eLife.50845.

Marreiros, Bruno C., Filipa V. Sena, Filipe M. Sousa, A. Sofia F. Oliveira, Cláudio M. Soares, Ana P. Batista, et Manuela M. Pereira. 2017. « Structural and Functional Insights into the Catalytic Mechanism of the Type II NADH:Quinone Oxidoreductase Family ». *Scientific Reports* 7 (1): 42303. https://doi.org/10.1038/srep42303.

Martin, William, Madeline Weiss, Sinje Neukirchen, Shijulal Nelson-Sathi, et Filipa Sousa. 2016. « Physiology, Phylogeny, and LUCA ». *Microbial Cell* 3 (12): 582-87. https://doi.org/10.15698/mic2016.12.545.

Martinez, Keith A., Ryan D. Kitko, J. Patrick Mershon, Haley E. Adcox, Kotiba A. Malek, Melanie B. Berkmen, et Joan L. Slonczewski. 2012. « Cytoplasmic pH Response to Acid Stress in Individual Cells of Escherichia Coli and Bacillus Subtilis Observed by Fluorescence Ratio Imaging Microscopy ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (10): 3706-14. https://doi.org/10.1128/AEM.00354-12.

McDaniel, Elizabeth A, Matthew Scarborough, Daniel Girma Mulat, Xuan Lin, Pranav S Sampara, Heather M Olson, Robert P Young, et al. 2023. « Diverse Electron Carriers Drive Syntrophic Interactions in an Enriched Anaerobic Acetate-Oxidizing Consortium ». *The ISME Journal* 17 (12): 2326-39. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01542-6.

Meneghello, Marta, Alexandre Uzel, Marianne Broc, Rita R. Manuel, Axel Magalon, Christophe Léger, Inês A. C. Pereira, Anne Walburger, et Vincent Fourmond. 2023. « Electrochemical Kinetics Support a Second Coordination Sphere Mechanism in Metal-Based Formate Dehydrogenase ». *Angewandte Chemie* 135 (6): e202212224. https://doi.org/10.1002/ange.202212224.

Metcalfe, George D., Thomas W. Smith, et Michael Hippler. 2020. « On-Line Analysis and in Situ pH Monitoring of Mixed Acid Fermentation by Escherichia Coli Using Combined FTIR and Raman Techniques ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (26): 7307-19. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02865-5.

Mielnik, Anne, Michael Link, James Mattila, S. Ryan Fulgham, et Delphine K. Farmer. 2018. « Emission of Formic and Acetic Acids from Two Colorado Soils ». *Environmental Science: Processes & Impacts* 20 (11): 1537-45. https://doi.org/10.1039/C8EM00356D.

Miralles-Robledillo, Jose María, Javier Torregrosa-Crespo, Rosa María Martínez-Espinosa, et Carmen Pire. 2019. « DMSO Reductase Family: Phylogenetics and Applications of Extremophiles ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (13): 3349. https://doi.org/10.3390/ijms20133349.

Mollapour, Mehdi, Andy Shepherd, et Peter W. Piper. 2008. « Novel Stress Responses Facilitate *Saccharomyces Cerevisiae* Growth in the Presence of the Monocarboxylate Preservatives ». *Yeast* 25 (3): 169-77. https://doi.org/10.1002/yea.1576.

Mols, Maarten, et Tjakko Abee. 2011. « *Bacillus Cereus* Responses to Acid Stress ». *Environmental Microbiology* 13 (11): 2835-43. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02490.x.

Moon, Jimyung, Anja Schubert, Lara M Waschinger, et Volker Müller. 2023. « Reprogramming the Metabolism of an Acetogenic Bacterium to Homoformatogenesis ». *The ISME Journal* 17 (7): 984-92. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01411-2.

Moro, Camila Brombilla, Jéssica Gonçalves Lemos, Alessandra Marcon Gasperini, Andrieli Stefanello, Marcelo Valle Garcia, et Marina Venturini Copetti. 2022. « Efficacy of Weak Acid Preservatives on Spoilage Fungi of Bakery Products ». *International Journal of Food Microbiology* 374 (août): 109723. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109723.

Mota, Cristiano S., Maria G. Rivas, Carlos D. Brondino, Isabel Moura, José J. G. Moura, Pablo J. González, et Nuno M. F. S. A. Cerqueira. 2011. « The Mechanism of Formate Oxidation by Metal-Dependent Formate Dehydrogenases ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16 (8): 1255-68. https://doi.org/10.1007/s00775-011-0813-8.

Mukherjee, Debapriya, et Dipshikha Chakravortty. 2024. « Critical Concentration of Formate Governs the Expression of the Flagellar and the Pathogenicity Island-1 Genes in *Salmonella* Typhimurium ». https://doi.org/10.1101/2024.01.30.577997.

Mukherjee, Mishtu, Manu Vajpai, et Ramasubbu Sankararamakrishnan. 2017. « Anion-Selective Formate/Nitrite Transporters: Taxonomic Distribution, Phylogenetic Analysis and Subfamily-

Specific Conservation Pattern in Prokaryotes ». *BMC Genomics* 18 (1): 560. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3947-4.

Murgia, Irene, Gianpiero Vigani, Dario Di Silvestre, Pierluigi Mauri, Rossana Rossi, Andrea Bergamaschi, Miriam Frisella, et Piero Morandini. 2020. « Formate Dehydrogenase Takes Part in Molybdenum and Iron Homeostasis and Affects Dark-Induced Senescence in Plants ». *Journal of Plant Interactions* 15 (1): 386-97. https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1836273.

Nadezhdin, Eugene, Niall Murphy, Neil Dalchau, Andrew Phillips, et James C. W. Locke. 2020. « Stochastic Pulsing of Gene Expression Enables the Generation of Spatial Patterns in Bacillus Subtilis Biofilms ». *Nature Communications* 11 (1): 950. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14431-9.

Najmudin, Shabir, Pablo J. González, José Trincão, Catarina Coelho, Abhik Mukhopadhyay, Nuno M. F. S. A. Cerqueira, Carlos C. Romão, et al. 2008. « Periplasmic Nitrate Reductase Revisited: A Sulfur Atom Completes the Sixth Coordination of the Catalytic Molybdenum ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13 (5): 737-53. https://doi.org/10.1007/s00775-008-0359-6.

Nicolas, Pierre, Ulrike Mäder, Etienne Dervyn, Tatiana Rochat, Aurélie Leduc, Nathalie Pigeonneau, Elena Bidnenko, et al. 2012. « Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus Subtilis* ». *Science* 335 (6072): 1103-6. https://doi.org/10.1126/science.1206848.

Nielsen, Christian Førgaard, Lene Lange, et Anne S. Meyer. 2019. « Classification and Enzyme Kinetics of Formate Dehydrogenases for Biomanufacturing via CO2 Utilization ». *Biotechnology Advances* 37 (7): 107408. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.007.

Niks, Dimitri, Jayant Duvvuru, Miguel Escalona, et Russ Hille. 2016. « Spectroscopic and Kinetic Properties of the Molybdenum-Containing, NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase from Ralstonia Eutropha ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (3): 1162-74. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688457.

Nitschke, Wolfgang. 2018. « Carbon Fixation: "Let Things Flow Naturally Forward in Whatever Way They Like" ». *Current Biology* 28 (3): R110-12. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.039.

Nitschke, Wolfgang, et Michael J. Russell. 2009. « Hydrothermal Focusing of Chemical and Chemiosmotic Energy, Supported by Delivery of Catalytic Fe, Ni, Mo/W, Co, S and Se, Forced Life to Emerge ». *Journal of Molecular Evolution* 69 (5): 481-96. https://doi.org/10.1007/s00239-009-9289-3.

Noda-Garcia, Lianet, Maria Luisa Romero Romero, Liam M Longo, Ilana Kolodkin-Gal, et Dan S Tawfik. 2017. « *Bacilli* Glutamate Dehydrogenases Diverged via Coevolution of Transcription and Enzyme Regulation ». *EMBO Reports* 18 (7): 1139-49. https://doi.org/10.15252/embr.201743990.

Oliveira, Ana Rita, Cristiano Mota, Cláudia Mourato, Renato M. Domingos, Marino F. A. Santos, Diana Gesto, Bruno Guigliarelli, Teresa Santos-Silva, Maria João Romão, et Inês A. Cardoso Pereira. 2020. « Toward the Mechanistic Understanding of Enzymatic CO_2 Reduction ». *ACS Catalysis* 10 (6): 3844-56. https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00086.

Oliveira, Ana Rita, Cristiano Mota, Guilherme Vilela-Alves, Rita Rebelo Manuel, Neide Pedrosa, Vincent Fourmond, Kateryna Klymanska, et al. 2024. « An Allosteric Redox Switch Involved in Oxygen Protection in a CO2 Reductase ». *Nature Chemical Biology* 20 (1): 111-19. https://doi.org/10.1038/s41589-023-01484-2.

Özkan, Melek, Hilal Yılmaz, Pınar Ergenekon, Esra Meşe Erdoğan, et Mustafa Erbakan. 2024. « Microbial Membrane Transport Proteins and Their Biotechnological Applications ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40 (2): 71. https://doi.org/10.1007/s11274-024-03891-6.

Pandey, Rachna, Norbert O. E. Vischer, Jan P. P. M. Smelt, Johan W. A. Van Beilen, Alexander Ter Beek, Winnok H. De Vos, Stanley Brul, et Erik M. M. Manders. 2016. « Intracellular pH Response to Weak Acid Stress in Individual Vegetative Bacillus Subtilis Cells ». Édité par D. W. Schaffner. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (21): 6463-71. https://doi.org/10.1128/AEM.02063-16.

Peters, Katharina, et Frank Sargent. 2023. « Formate Hydrogenlyase, Formic Acid Translocation and Hydrogen Production: Dynamic Membrane Biology during Fermentation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1864 (1): 148919. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2022.148919.

Petersohn, Anja, Matthias Brigulla, Stefan Haas, Jörg D. Hoheisel, Uwe Völker, et Michael Hecker. 2001. « Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 183 (19): 5617-31. https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001.

Pietzke, Matthias, Johannes Meiser, et Alexei Vazquez. 2020. « Formate Metabolism in Health and Disease ». *Molecular Metabolism* 33 (mars): 23-37. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.012.

Pinske, Constanze, et R. Gary Sawers. 2016. « Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism ». Édité par Valley Stewart. *EcoSal Plus* 7 (1): ecosalplus.ESP-0011-2016. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2016.

Piper, P. 1998. « The Pdr12 ABC Transporter Is Required for the Development of Weak Organic Acid Resistance in Yeast ». *The EMBO Journal* 17 (15): 4257-65. https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4257.

Popov, Vladimir, et Victor Lamzin. 1994. « NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase ». Biochemical journal 301 (625-643). doi: 10.1042/bj3010625.

Prisner, Thomas, Sevdalina Lyubenova, Yener Atabay, Fraser MacMillan, Achim Kröger, et Oliver Klimmek. 2003. « Multifrequency Cw-EPR Investigation of the Catalytic Molybdenum Cofactor of Polysulfide Reductase from Wolinella Succinogenes ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8 (4): 419-26. https://doi.org/10.1007/s00775-002-0432-5.

Raaijmakers, Hans C. A., et Maria João Romão. 2006. « Formate-Reduced E. Coli Formate Dehydrogenase H: The Reinterpretation of the Crystal Structure Suggests a New Reaction Mechanism ». *JBIC*

Journal of Biological Inorganic Chemistry 11 (7): 849-54. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0129-2.

Raaijmakers, Hans, Sofia Macieira, João M Dias, Susana Teixeira, Sergey Bursakov, Robert Huber, José J.G Moura, Isabel Moura, et Maria J Romão. 2002. « Gene Sequence and the 1.8 Å Crystal Structure of the Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Gigas ». *Structure* 10 (9): 1261-72. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00826-2.

Radon, Christin, Gerd Mittelstädt, Benjamin R. Duffus, Jörg Bürger, Tobias Hartmann, Thorsten Mielke, Christian Teutloff, Silke Leimkühler, et Petra Wendler. 2020. « Cryo-EM Structures Reveal Intricate Fe-S Cluster Arrangement and Charging in Rhodobacter Capsulatus Formate Dehydrogenase ». *Nature Communications* 11 (1): 1912. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15614-0.

Rasmussen, Simon, Henrik Bjørn Nielsen, et Hanne Jarmer. 2009. « The Transcriptionally Active Regions in the Genome of *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 73 (6): 1043-57. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06830.x.

Reinhardt, Laurie A., Drazenka Svedruzic, Christopher H. Chang, W. Wallace Cleland, et Nigel G. J. Richards. 2003. « Heavy Atom Isotope Effects on the Reaction Catalyzed by the Oxalate Decarboxylase from *Bacillus s Ubtilis* ». *Journal of the American Chemical Society* 125 (5): 1244-52. https://doi.org/10.1021/ja0286977.

Rivas, María G., Pablo J. González, Carlos D. Brondino, José J. G. Moura, et Isabel Moura. 2007. « EPR Characterization of the Molybdenum(V) Forms of Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774 upon Formate Reduction ». *Journal of Inorganic Biochemistry*, Special Issue in Memory of Edward I. Stiefel, 101 (11): 1617-22. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.04.011.

Rodriguez Ayala, Facundo, Marco Bartolini, et Roberto Grau. 2020. « The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of Bacillus Subtilis and Its Relatives: An Old Friend With New Functions ». *Frontiers in Microbiology* 11 (septembre): 1761. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01761.

Rodríguez Del Río, Álvaro, Joaquín Giner-Lamia, Carlos P. Cantalapiedra, Jorge Botas, Ziqi Deng, Ana Hernández-Plaza, Martí Munar-Palmer, et al. 2024. « Functional and Evolutionary Significance of Unknown Genes from Uncultivated Taxa ». *Nature* 626 (7998): 377-84. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06955-z.

Roger, Magali, Fraser Brown, William Gabrielli, et Frank Sargent. 2018. « Efficient Hydrogen-Dependent Carbon Dioxide Reduction by Escherichia Coli ». *Current Biology* 28 (1): 140-145.e2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.050.

Saier, Milton H, Vamsee S Reddy, Gabriel Moreno-Hagelsieb, Kevin J Hendargo, Yichi Zhang, Vasu Iddamsetty, Katie Jing Kay Lam, et al. 2021. « The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 Update ». *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D461-67. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1004.

Saier, Milton H., Vamsee S. Reddy, Brian V. Tsu, Muhammad Saad Ahmed, Chun Li, et Gabriel Moreno-Hagelsieb. 2016. « The Transporter Classification Database (TCDB): Recent Advances ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D372-79. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1103.

Sawers, Gary. 1993. « Specific Transcriptional Requirements for Positive Regulation of the Anaerobically Inducible *Pfl* Operon by ArcA and FNR ». *Molecular Microbiology* 10 (4): 737-47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00944.x.

Sawers, Gary, et Gregory Watson. 1998. « A Glycyl Radical Solution: Oxygen-dependent Interconversion of Pyruvate Formate-lyase ». *Molecular Microbiology* 29 (4): 945-54. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00941.x.

Sawers, R. Gary. 2005. « Evidence for Novel Processing of the Anaerobically Inducible Dicistronic *focA-pfl* mRNA Transcript in *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 58 (5): 1441-53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04915.x.

Sawers, R.G. 2005. « Formate and Its Role in Hydrogen Production in *Escherichia Coli* ». *Biochemical Society Transactions* 33 (1): 42-46. https://doi.org/10.1042/BST0330042.

Sazanov, Leonid A., et Philip Hinchliffe. 2006. « Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus Thermophilus* ». *Science* 311 (5766): 1430-36. https://doi.org/10.1126/science.1123809.

Schoepp-Cothenet, Barbara, Robert Van Lis, Pascal Philippot, Axel Magalon, Michael J. Russell, et Wolfgang Nitschke. 2012. « The Ineluctable Requirement for the Trans-Iron Elements Molybdenum and/or Tungsten in the Origin of Life ». *Scientific Reports* 2 (1): 263. https://doi.org/10.1038/srep00263.

Schuchmann, K., et V. Müller. 2013. « Direct and Reversible Hydrogenation of CO_2 to Formate by a Bacterial Carbon Dioxide Reductase ». *Science* 342 (6164): 1382-85. https://doi.org/10.1126/science.1244758.

Schut, Gerrit J., Dominik K. Haja, Xiang Feng, Farris L. Poole, Huilin Li, et Michael W. W. Adams. 2022. « An Abundant and Diverse New Family of Electron Bifurcating Enzymes With a Non-Canonical Catalytic Mechanism ». *Frontiers in Microbiology* 13 (juillet): 946711. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.946711.

Schwarz, Fabian M., Kai Schuchmann, et Volker Müller. 2018. « Hydrogenation of CO2 at Ambient Pressure Catalyzed by a Highly Active Thermostable Biocatalyst ». *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 237. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1236-3.

Senouci-Rezkallah, Khadidja, Philippe Schmitt, et Michel P. Jobin. 2011. « Amino Acids Improve Acid Tolerance and Internal pH Maintenance in Bacillus Cereus ATCC14579 Strain ». *Food Microbiology* 28 (3): 364-72. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.003.

Sharma, Ranjana, Prakrati Garg, Pradeep Kumar, Shashi Kant Bhatia, et Saurabh Kulshrestha. 2020. « Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods ». *Fermentation* 6 (4): 106. https://doi.org/10.3390/fermentation6040106.

Shepard, Eric M., et Joan B. Broderick. 2010. « S-Adenosylmethionine and Iron–Sulfur Clusters in Biological Radical Reactions: The Radical SAM Superfamily ». In *Comprehensive Natural Products II*, 625-61. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00176-3.

Shimazono, Hirao, et Osamu Hayaishi. 1957. « ENZYMATIC DECARBOXYLATION OF OXALIC ACID ». *Journal of Biological Chemistry* 227 (1): 151-59. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70803-X.

Simpson, Philippa J.L., Audra A. McKinzie, et Rachel Codd. 2010. « Resolution of Two Native Monomeric 90kDa Nitrate Reductase Active Proteins from Shewanella Gelidimarina and the Sequence of Two napA Genes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398 (1): 13-18. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.002.

Sohlenkamp, Christian, et Otto Geiger. 2016. « Bacterial Membrane Lipids: Diversity in Structures and Pathways ». Édité par Franz Narberhaus. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (1): 133-59. https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008.

Steinhilper, Ralf, Gabriele Höff, Johann Heider, et Bonnie J. Murphy. 2022. « Structure of the Membrane-Bound Formate Hydrogenlyase Complex from Escherichia Coli ». *Nature Communications* 13 (1): 5395. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32831-x.

Stewart, Colin S, Sylvia H Duncan, et David R Cave. 2004. « Oxalobacter Formigenes and Its Role in Oxalate Metabolism in the Human Gut ». *FEMS Microbiology Letters* 230 (1): 1-7. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00864-4.

Strobel, Bjarne W. 2001. « Influence of Vegetation on Low-Molecular-Weight Carboxylic Acids in Soil Solution—a Review ». *Geoderma* 99 (3-4): 169-98. https://doi.org/10.1016/S0016-7061(00)00102-6.

Sun, Yirong, Toshihiko Fukamachi, Hiromi Saito, et Hiroshi Kobayashi. 2012. « Respiration and the F1Fo-ATPase Enhance Survival under Acidic Conditions in Escherichia Coli ». Édité par Vishal Shah. *PLoS ONE* 7 (12): e52577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052577.

Suppmann, Bernhard, et Gary Sawers. 1994. « Isolation and Characterization of Hypophosphite-resistant Mutants of *Escherichia Coli*: Identification of the FocA Protein, Encoded by the *Pfl* Operon, as a Putative Formate Transporter ». *Molecular Microbiology* 11 (5): 965-82. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00375.x.

Svedružić, Draženka, Stefán Jónsson, Cory G. Toyota, Laurie A. Reinhardt, Stefano Ricagno, Ylva Lindqvist, et Nigel G.J. Richards. 2005. « The Enzymes of Oxalate Metabolism: Unexpected Structures and Mechanisms ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433 (1): 176-92. https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.032.

Svedružić, Draženka, Yong Liu, Laurie A. Reinhardt, Ewa Wroclawska, W. Wallace Cleland, et Nigel G.J. Richards. 2007. « Investigating the Roles of Putative Active Site Residues in the Oxalate Decarboxylase from Bacillus Subtilis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464 (1): 36-47. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.016.

Tanner, Adam, Laura Bowater, Shirley A. Fairhurst, et Stephen Bornemann. 2001. « Oxalate Decarboxylase Requires Manganese and Dioxygen for Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 43627-34. https://doi.org/10.1074/jbc.M107202200.

Ter Beek, Alexander, Janneke G.E. Wijman, Anna Zakrzewska, Rick Orij, Gertien J. Smits, et Stanley Brul. 2015. « Comparative Physiological and Transcriptional Analysis of Weak Organic Acid Stress in Bacillus Subtilis ». *Food Microbiology* 45 (février): 71-82. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.013.

Thomé, Rémi, Alexander Gust, René Toci, Ralf Mendel, Florian Bittner, Axel Magalon, et Anne Walburger. 2012. « A Sulfurtransferase Is Essential for Activity of Formate Dehydrogenases in Escherichia Coli ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (7): 4671-78. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327122.

Tong, Hu, Zhu, et Dong. 2019. « Prokaryotic Aquaporins ». *Cells* 8 (11): 1316. https://doi.org/10.3390/cells8111316.

Trischler, Raphael, Jennifer Roth, Matthew T. Sorbara, Xenia Schlegel, et Volker Müller. 2022. « A Functional WOOD–LJUNGDAHL Pathway Devoid of a Formate Dehydrogenase in the Gut Acetogens *Blautia Wexlerae* , *Blautia Luti* and Beyond ». *Environmental Microbiology* 24 (7): 3111-23. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16029.

Tu, Zhiwei, Henk L. Dekker, Winfried Roseboom, Bhagyashree N. Swarge, Peter Setlow, Stanley Brul, et Gertjan Kramer. 2021. « High Resolution Analysis of Proteome Dynamics during Bacillus Subtilis Sporulation ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (17): 9345. https://doi.org/10.3390/ijms22179345.

Unden, Gottfried, Philipp Aloysius Steinmetz, et Pia Degreif-Dünnwald. 2014. « The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia Coli* and *Salmonella Enterica*: Enzymes and Energetics ». Édité par Valley Stewart. *EcoSal Plus* 6 (1): 10.1128/ecosalplus.ESP-0005-2013. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0005-2013.

Van Beilen, J. W. A., M. J. Teixeira De Mattos, K. J. Hellingwerf, et S. Brul. 2014. « Distinct Effects of Sorbic Acid and Acetic Acid on the Electrophysiology and Metabolism of Bacillus Subtilis ». Édité par C. A. Elkins. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (19): 5918-26. https://doi.org/10.1128/AEM.01391-14.

Vivijs, Bram, Leticia U. Haberbeck, Victor Baiye Mfortaw Mbong, Kristel Bernaerts, Annemie H. Geeraerd, Abram Aertsen, et Chris W. Michiels. 2015. « Formate Hydrogen Lyase Mediates Stationary-Phase Deacidification and Increases Survival during Sugar Fermentation in Acetoin-Producing Enterobacteria ». *Frontiers in Microbiology* 6 (février). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00150.

Vlasov, Alexey V., Stepan D. Osipov, Nikolay A. Bondarev, Vladimir N. Uversky, Valentin I. Borshchevskiy, Mikhail F. Yanyushin, Ilya V. Manukhov, et al. 2022. « ATP Synthase FOF1 Structure, Function, and Structure-Based Drug Design ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 79 (3): 179. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04153-0.

Wagner, Tristan, Ulrich Ermler, et Seigo Shima. 2016. « The Methanogenic CO_2 Reducing-and-Fixing Enzyme Is Bifunctional and Contains 46 [4Fe-4S] Clusters ». *Science* 354 (6308): 114-17. https://doi.org/10.1126/science.aaf9284.

Wagner, Tristan, Ulrich Ermler, et Seigo Shima. 2018. « Formyl-Methanofuran Dehydrogenase ». In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, édité par Robert A. Scott, 2e éd., 1-18. Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc2621.

Waight, Andrew B, James Love, et Da-Neng Wang. 2010. « Structure and Mechanism of a Pentameric Formate Channel ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1): 31-37. https://doi.org/10.1038/nsmb.1740.

Wang, Henian, et Robert P. Gunsalus. 2003. « Coordinate Regulation of the *Escherichia Coli* Formate Dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* Genes in Response to Nitrate, Nitrite, and Formate: Roles for NarL and NarP ». *Journal of Bacteriology* 185 (17): 5076-85. https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5076-5085.2003.

Wang, Shuning, Haiyan Huang, Jörg Kahnt, Alexander P. Mueller, Michael Köpke, et Rudolf K. Thauer. 2013. « NADP-Specific Electron-Bifurcating [FeFe]-Hydrogenase in a Functional Complex with Formate Dehydrogenase in Clostridium Autoethanogenum Grown on CO ». *Journal of Bacteriology* 195 (19): 4373-86. https://doi.org/10.1128/JB.00678-13.

Wang, Steven C., Pauldeen Davejan, Kevin J. Hendargo, Ida Javadi-Razaz, Amy Chou, Daniel C. Yee, Faezeh Ghazi, et al. 2020. « Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to Include Novel Transporters as Well as Transmembrane-Acting Enzymes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (9): 183277. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183277.

Wang, Yi, Yongjian Huang, Jiawei Wang, Chao Cheng, Weijiao Huang, Peilong Lu, Ya-Nan Xu, Pengye Wang, Nieng Yan, et Yigong Shi. 2009. « Structure of the Formate Transporter FocA Reveals a Pentameric Aquaporin-like Channel ». *Nature* 462 (7272): 467-72. https://doi.org/10.1038/nature08610.

Weiss, Madeline C., Filipa L. Sousa, Natalia Mrnjavac, Sinje Neukirchen, Mayo Roettger, Shijulal Nelson-Sathi, et William F. Martin. 2016. « The Physiology and Habitat of the Last Universal Common Ancestor ». *Nature Microbiology* 1 (9): 16116. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116.

Wells, Michael, Minjae Kim, Denise M. Akob, Partha Basu, et John F. Stolz. 2023. « Impact of the Dimethyl Sulfoxide Reductase Superfamily on the Evolution of Biogeochemical Cycles ». Édité par Noha H. Youssef. *Microbiology Spectrum* 11 (2): e04145-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.04145-22.

White, W B, et J G Ferry. 1992. « Identification of Formate Dehydrogenase-Specific mRNA Species and Nucleotide Sequence of the fdhC Gene of Methanobacterium Formicicum ». *Journal of Bacteriology* 174 (15): 4997-5004. https://doi.org/10.1128/jb.174.15.4997-5004.1992.

Wilks, Jessica C., Ryan D. Kitko, Sarah H. Cleeton, Grace E. Lee, Chinagozi S. Ugwu, Brian D. Jones, Sandra S. BonDurant, et Joan L. Slonczewski. 2009. « Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in *Bacillus Subtilis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (4): 981-90. https://doi.org/10.1128/AEM.01652-08.

Yang, Nicole J., et Marlon J. Hinner. 2015. « Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins ». In *Site-Specific Protein Labeling*, édité par Arnaud Gautier et Marlon J. Hinner, 1266:29-53. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3.

Yilmazer, Berin, Michail N. Isupov, Simone A. De Rose, Huri Bulut, Jens C. Benninghoff, Barış Binay, et Jennifer A. Littlechild. 2020. « Structural Insights into the NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase Mechanism Revealed from the NADH Complex and the Formate NAD+ Ternary Complex of the Chaetomium Thermophilum Enzyme ». *Journal of Structural Biology* 212 (3): 107657. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107657.

Yishai, Oren, Steffen N Lindner, Jorge Gonzalez De La Cruz, Hezi Tenenboim, et Arren Bar-Even. 2016. « The Formate Bio-Economy ». *Current Opinion in Chemical Biology* 35 (décembre): 1-9. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.07.005.

Yoshikawa, Tatsushi, Fumiaki Makino, Tomoko Miyata, Yohei Suzuki, Hideaki Tanaka, Keiichi Namba, Kenji Kano, Keisei Sowa, Yuki Kitazumi, et Osamu Shirai. 2022. « Multiple Electron Transfer Pathways of Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase in Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis ». *Chemical Communications* 58 (45): 6478-81. https://doi.org/10.1039/D2CC01541B.

Yu, Dingquan, Grzegorz Chojnowski, Maria Rosenthal, et Jan Kosinski. 2023. « AlphaPulldown—a Python Package for Protein–Protein Interaction Screens Using AlphaFold-Multimer ». Édité par Lenore Cowen. *Bioinformatics* 39 (1): btac749. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac749.

Zhang, Meng, Shixian Lin, Xinwen Song, Jun Liu, Ye Fu, Xi Ge, Xinmiao Fu, Zengyi Chang, et Peng R Chen. 2011. « A Genetically Incorporated Crosslinker Reveals Chaperone Cooperation in Acid Resistance ». *Nature Chemical Biology* 7 (10): 671-77. https://doi.org/10.1038/nchembio.644.

Zharova, Tatyana V., Vera G. Grivennikova, et Vitaliy B. Borisov. 2023. « F1·Fo ATP Synthase/ATPase: Contemporary View on Unidirectional Catalysis ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (6): 5417. https://doi.org/10.3390/ijms24065417.

Zheng, Dao-Qiong, Xue-Chang Wu, Pin-Mei Wang, Xiao-Qin Chi, Xiang-Lin Tao, Ping Li, Xin-Hang Jiang, et Yu-Hua Zhao. 2011. « Drug Resistance Marker-Aided Genome Shuffling to Improve Acetic Acid Tolerance in Saccharomyces Cerevisiae ». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (3): 415-22. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0784-8.

Zhou, J., L. Liu, et J. Chen. 2011. « Improved ATP Supply Enhances Acid Tolerance of Candida Glabrata during Pyruvic Acid Production: Enhanced ATP Supply Enhances Acid Tolerance ». *Journal of Applied Microbiology* 110 (1): 44-53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04865.x.

Zhu, J., et K. Shimizu. 2004. « The Effect of Pfl Gene Knockout on the Metabolism for Optically Pure D-Lactate Production by Escherichia Coli ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (3): 367-75. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1499-9.

Zuchan, Kilian, Frauke Baymann, Carole Baffert, Myriam Brugna, et Wolfgang Nitschke. 2021. « The Dyad of the Y-Junction- and a Flavin Module Unites Diverse Redox Enzymes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1862 (6): 148401. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2021.148401.

ANNEXES

Check for updates

Metalloenzymes Hot Paper

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202212224
Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202212224
Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202212224

Electrochemical Kinetics Support a Second Coordination Sphere Mechanism in Metal-Based Formate Dehydrogenase

*Marta Meneghello, Alexandre Uzel, Marianne Broc, Rita R. Manuel, Axel Magalon, Christophe Léger, Inês A. C. Pereira, Anne Walburger, and Vincent Fourmond**

Abstract: Metal-based formate dehydrogenases are molybdenum or tungsten-dependent enzymes that catalyze the interconversion between formate and CO_2. According to the current consensus, the metal ion of the catalytic center in its active form is coordinated by 6S (or 5S and 1Se) atoms, leaving no free coordination sites to which formate could bind to the metal. Some authors have proposed that one of the active site ligands decoordinates during turnover to allow formate binding. Another proposal is that the oxidation of formate takes place in the second coordination sphere of the metal. Here, we have used electrochemical steady-state kinetics to elucidate the order of the steps in the catalytic cycle of two formate dehydrogenases. Our results strongly support the "second coordination sphere" hypothesis.

Metal-based formate dehydrogenases (FDHs) are enzymes of the Mo/W-bis-PGD family[1] that catalyze the interconversion between formate and CO_2,[2] at an active site in which the metal (a W or Mo ion) is coordinated by two dithiolene ligands coming from two pyranopterin guanine dinucleotides (PGD), a cysteine or selenocysteine, and an inorganic sulfide.[3–5] Although it is now clear that the reaction catalyzed by FDHs is formally the abstraction of a hydride from formate to produce CO_2 (as opposed to the addition of an oxygen atom to produce bicarbonate),[6,7] the catalytic mechanism is still heavily debated. The main issue is that a sulfide ligand completes the coordination sphere of the metal to form a six S/Se coordination sphere, and that this ligand is required for activity.[3,5] As binding of a 7th ligand to an already saturated 6-S/Se coordination sphere seems unlikely, it is unclear how the substrate interacts with the active site.

A first series of putative mechanisms consider that the proteic ligand of the active site decoordinates so that the substrate can bind: Raaijmakers and Romao, based on a structure of *E. coli* FdhF in which the SeCys is uncoordinated, proposed that this decoordination step is part of the catalytic cycle.[8] A variation on this mechanism, proposed by Mota and co-workers using DFT computations,[9] suggests movement of the proteic ligand from the first to the second coordination sphere, via the formation of a S–Se or S–S bond, before complete decoordination in the course of catalysis. However, these mechanisms are not supported by the recent structural data obtained by some of us, which show that the SeCys ligand remains coordinated in all the redox states of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough FdhAB,[4,10] making it unlikely that decoordination is a requirement for catalysis. Another mechanism avoiding a 7-coordinated Mo/W was proposed by Niks and co-workers, who observed the formation of a 6-S Mo^V species coupled to a proton originating from formate upon exposure of FdsABG from *Cupriavidus necator* to formate. They concluded that formate does not directly bind to the active site metal, but rather stays in the second coordination sphere, and transfers a hydride to the molybdenum sulfide ligand.[11]

FDHs were first connected to electrodes by Reda and Hirst in 2008;[12] however, the number of articles describing FDHs directly wired to electrodes has only significantly increased in the past few years,[13] focusing either on mechanistic studies[7,14] or on the construction of biotechnological devices.[15] Here, we present kinetic data obtained using protein film electrochemistry with two FDHs, the recently characterized *Bacillus subtilis* (*Bs*) ForCE1[16] and *Desulfovibrio vulgaris* (*Dv*) FdhAB,[4] which allow us to clarify the sequence of the steps of formate binding and proton release during catalytic formate oxidation. Our data strongly support the "second coordination sphere" mechanism, without direct coordination of formate to the metal ion.

We immobilized *Bs* ForCE1 and *Dv* FdhAB onto pyrolytic graphite edge rotating-disc electrodes, in configurations that allow direct electron transfer. This makes it possible to measure the catalytic activity of the enzyme, recorded as an electrical current, as a function of various experimental parameters. This approach is called Protein

[*] M. Meneghello, A. Uzel, C. Léger, V. Fourmond
CNRS, Aix Marseille Université, BIP, IMM, IM2B
31 Chemin J. Aiguier, 13009 Marseille (France)
E-mail: vincent.fourmond@imm.cnrs.fr

A. Uzel, M. Broc, A. Magalon, A. Walburger
Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR7283), IMM, IM2B
31 Chemin J. Aiguier, 13009 Marseille (France)

R. R. Manuel, I. A. C. Pereira
Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica Antonio Xavier (ITQB NOVA), Universidade Nova de Lisboa
Oeiras (Portugal)

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

Film Electrochemistry.[17,18] Figure 1A shows a series of cyclic voltammograms (obtained by sweeping the electrode potential between two values and plotting the current as a function of potential) measured at various concentrations of formate with a film of *Bs* ForCE1. The electrode was spun at a high rate to prevent substrate depletion. The current traces of the forward and backward scans are just offset by the capacitive current of the electrode (dashed black curve in Figure 1A), showing that the catalytic response is under steady-state. Figure 1B shows the baseline-subtracted voltammograms. The shape of each response is simple, with a sigmoidal increase in an intermediate potential range, and the linear increase at high potential that reveals a distribution of enzyme orientation.[19,20] Upon increasing the concentration of formate, the amplitude of the signal increases and its position shifts to lower potentials.

To quantitatively characterize the effect of the concentration of formate, we fitted a simple model[21] to the baseline-subtracted voltammograms. In this model, we assume that the enzyme active site cycles between three redox states (IV, V and VI), and that the substrate-bound VI state reacts in an irreversible manner to produce the IV state and release the product. The model reproduces the data with excellent accuracy (gray dashed lines in Figure 1B). Figure 1C shows that the same model can also be satisfactorily fitted to the data obtained with *Dv* FdhAB (see Supporting Information Figure S1 for a plot including the raw data obtained with *Dv* FdhAB and the residuals for both enzymes).

Each fit returns 5 parameters: two reduction potentials: $E_{6/5}$ (the potential of the VI to V redox couple) and $E_{5/4}$ (V to IV), the corresponding rates of electron transfer ($k_0^{6/5}$ and $k_0^{5/4}$, not discussed here), and a $i_{lim}/\beta d_0$ parameter that is proportional to the limiting current, therefore to the catalytic rate at infinite driving force.[19,21] Next, we analyzed how these parameters change as a function of the experimental conditions (formate concentration and pH) to determine how substrate binding and deprotonation events are coupled to electron transfer steps.

We first considered the influence of formate concentration on the fit parameters. Figure 2 shows the variation of the redox potentials (panel A) and of the current (blue circles in panel C) as a function of substrate concentration obtained from the *Bs* ForCE1 data shown in Figure 1B. Figure 2A shows that the V/IV potential ($E_{5/4}$, red circles) decreases by 60 mV per decade of substrate concentration at high substrate concentration, indicating that the oxidation from IV to V is coupled to substrate binding. The VI/V potential ($E_{6/5}$, green squares) is independent of substrate concentration, which indicates that the energetics of the V to VI oxidation are independent of the presence of

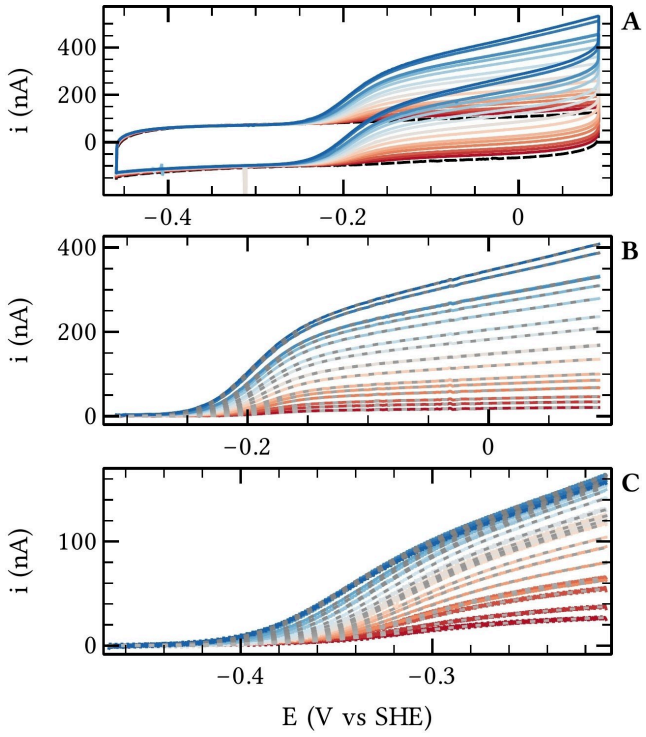


Figure 1. Cyclic voltammograms of films of (A– B) *Bs* ForCE1 and (C) *Dv* FdhAB, with increasing concentrations of formate (from red to blue). A) Raw voltammograms (the black dashed curve is the blank). B) and C) Baseline-subtracted data (solid colored lines), together with their fits (gray dotted lines, see text). Conditions: 20 mV s^{-1}, pH 7, T = (A–B) 40 °C, (C) 25 °C. See full conditions in Supporting Information. The raw data for *Dv* FdhAB and the residuals are shown in supplementary Figure S1.

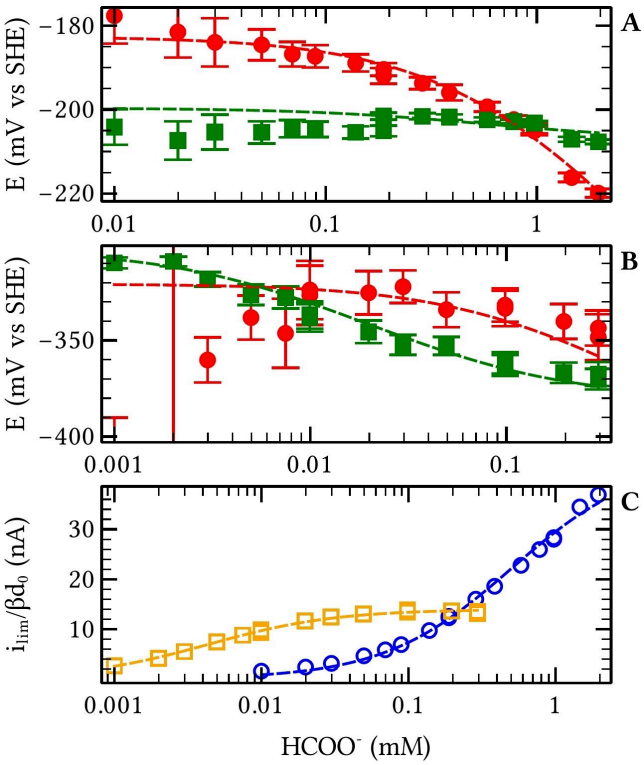


Figure 2. Parameters of the fits to the data shown in Figure 1. In panels A (*Bs* ForCE1) and B (*Dv* FdhAB) the red circles correspond to $E_{5/4}$, the green squares to $E_{6/5}$. Panel C shows the values of $i_{lim}/\beta d_0$ for ForCE1 (blue circles) and FdhAB (orange squares). The dashed lines are the fits of Equations (1), (2) and (3) to the data. The error bars correspond to the 95% confidence intervals of the fits of Figure 1.

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 6, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202212224 by Cochrane France, Wiley Online Library on [07/02/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

substrate, so that the energetics of binding are identical for the V or VI states. In summary, formate binds with equal affinity to the two most oxidized states of the active site (V and VI) [cf. Eq. (2) below], but not to Mo^{IV} [Eq. (1)], resulting in the catalytic cycle depicted in scheme 1.

Scheme 1 predicts the following relations between the potentials of the V/IV and of the VI/V couples ($E_{5/4}$ and $E_{6/5}$), the potentials of the substrate-free V/IV and VI/V couples ($E_{5/4}^{free}$ and $E_{6/5}^{free}$) and the binding constants of the substrate to the V and VI states (K_5 and K_6)[22] (see full derivation in Supporting Information):

$$E_{5/4} = E_{5/4}^{\mathrm{free}} - \frac{RT}{F}\ln\left(1+\frac{[S]}{K_5}\right) \quad (1)$$

$$E_{6/5} = E_{6/5}^{\mathrm{free}} + \frac{RT}{F}\ln\frac{1+[S]/K_5}{1+[S]/K_6} \quad (2)$$

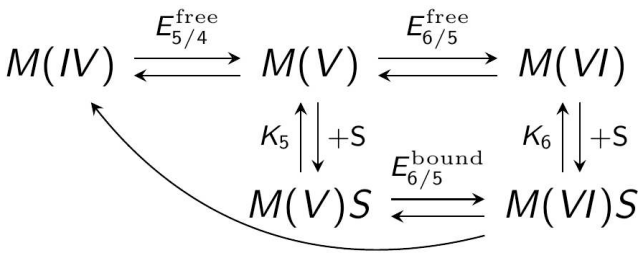
where [S] is the substrate concentration (the $E_{6/5}^{bound}$ potential of the substrate-bound active site is not a parameter of the fit since its value can be deduced from the other parameters using thermodynamic constraints). The limiting current is given by:

$$i_{\mathrm{lim}}/\beta d_0 = i_{\mathrm{lim}}^{\mathrm{max}}/\beta d_0 \times \frac{1}{1+K_6/[S]} \quad (3)$$

where $i_{lim}^{max}/\beta d_0$ is the value of $i_{lim}/\beta d_0$ under saturating conditions. The Michaelis constant at infinite driving force is therefore the equilibrium constant for binding to the VI state of the active site (K_6).

By fitting these equations to the data in Figure 2, we determined the binding constants and the potentials of the active site transitions without substrate. In the case of *Bs* ForCE1, the results of the fit confirm that the equilibrium constants for substrate binding to the active site are similar for both the V and the VI states: $K_5 = 0.66$ mM and $K_6 = 0.5$ mM for the data shown in Figure 2. The value of K_6 is consistent with the published value of K_m of 5 mM determined under different conditions (pH 10, $T = 25\,^{\circ}C$[16]).

This model can also be successfully fitted to the data obtained by analyzing the *Dv* FdhAB voltammograms (Figure 1C), shown in Figure 2 (panel B and orange squares in panel C). The main difference with ForCE1 is the existence of a range of concentration in which the potential of the VI/V couple decreases slightly, reflecting weaker binding to the V state than to the VI state. Fitting Equations (1)–(3) to the data in Figure 2 gives $K_5 = 90$ μM and $K_6 = 5$ μM. These values are also consistent with the published values of K_m of 17 μM at pH 7.6.[4] The deviation between the model and the fitted values of $E_{5/4}$ (red circles in Figure 2) at low formate concentrations arise from the fact that they are much less accurately determined than the values of $E_{6/5}$, and hence they were given less weight in the fit of Equations (1)–(3) to the six data sets in Figure 2.



Scheme 1. Kinetic scheme used for modeling the dependence of the potentials on substrate concentration. M is either Mo or W depending on the enzyme.

To learn about proton transfers, we repeated experiments such as those shown in Figure 1 with the two enzymes at different pH values, and we repeated the analysis described in Figure 2 for each of those. The results are shown in Figure 3. The parameters obtained for each pH are the two potentials of the free enzyme, and the two equilibrium constants for the binding of formate to the two most oxidized states. In the case of *Bs* ForCE1, the two equilibrium constants have the same magnitude and hardly change with pH (Figure 3C). $E_{6/5}^{free}$ is independent of pH, whereas the dependence of $E_{5/4}^{free}$ is −60 mV/pH (Figure 3A). Together with the data in Figure 2A, this demonstrates that the Mo^{IV} to Mo^{V} oxidation step is coupled to a deprotonation and to formate binding.

The determination of the *Dv* FdhAB potentials is less accurate (because the signal was smaller, and baseline correction harder), but the pH dependences of $E_{5/4}^{free}$ and $E_{6/5}^{free}$ shown in Figure 3B (−30 mV/pH in average) are consistent with the two-electron oxidation of W^{IV} being coupled to the abstraction of a single proton (as in *Bs* ForCE1). The two pH dependencies are best explained by assuming a pK_a of 6.5 for the W^{V} state (the dashed lines in Figure 3B are calculated under this assumption). For both enzymes, deprotonation and substrate binding occur in the same step. In the case of *Bs* ForCE1, they occur when Mo^{IV} is oxidized to Mo^{V}, whereas in the case of *Dv* FdhAB, they are coupled to either the W^{IV}-to-W^{V} or the W^{V}-to-W^{VI} oxidation, depending on pH. Note that the data of Figure 3B are consistent with the results of a recent EPR titration of *Dv* FdhAB.[10]

The data we obtained by modeling the dependence of the catalytic wave shape on formate concentration and pH strongly constrain the possible mechanisms of catalytic formate oxidation. We observed that the two-electron oxidation of the active site is coupled to one deprotonation (as expected from the stoichiometry of the overall catalytic reaction), which occurs in the (IV) to (V) step independently of pH in the case of *Bs* ForCE1, and in one redox step or the other depending on pH in the case of *Dv* FdhAB. In its fully reduced state (IV), the active site does not bind formate in the concentration range we studied, but formate binding and deprotonation are coupled to the same redox step. Therefore, substrate binding is dependent on the deprotonation of the active site. Furthermore, formate binds to the (V) or (VI) states with about the same affinity, which argues against the hypothesis that formate directly coordinates the metal. Similar or even complementary information

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 6, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202212224 by Cochrane France, Wiley Online Library on [07/02/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

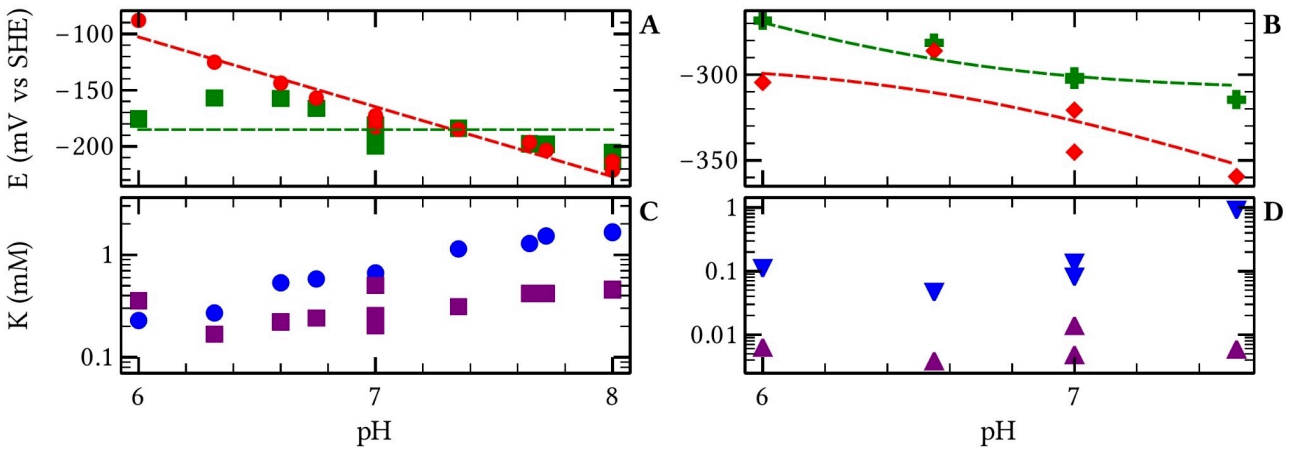


Figure 3. Results of the fits of a series of voltammograms recorded at different pHs for (A, C) *Bs* ForCE1 and (B, D) *Dv* FdhAB . A) and B) Potentials of the substrate-free enzyme: $E_{5/4}^{free}$ (red circles) and $E_{6/5}^{free}$ (green squares). The red line in panel A corresponds to a $1H^+/1e^-$ coupled transfer. The curves in panel B correspond to the prediction of a $1H^+/2e^-$ scheme[23] with a pK_a of 6.5 for the W^V state. C) and D) Binding constants: K_5 in blue, K_6 in purple. Duplicate points at pH 7 correspond to distinct experiments.

could probably be obtained by monitoring the CO_2 reduction current. However, we focused here on formate oxidation since it is far harder to change the concentrations of dissolved CO_2 than formate, and the CO_2 reduction currents we observed are smaller than those of formate oxidation.

It is remarkable that the potentials of the active site of *Bs* ForCE1 are significantly above those of *Dv* FdhAB, consistent with the shift of the waves towards low potentials for FdhAB visible in Figure 1. The high potentials of the VI/V transition is consistent with values of about −160 mV found for the Mo FDH from *Desulfovibrio desulfuricans*.[24] The increase in potential for the Mo enzymes is reminiscent of the observations that substituting Mo by W in the case of the DMSO reductase led to a decrease of about 200 mV in the reduction potentials of the active site[25].

Our observations support a slight modification of the "second coordination sphere catalysis" mechanism proposed by Niks and co-workers[11] that is shown in Figure 4. For *Bs* ForCE1, upon starting the cycle from the $Mo^{VI}S$ state, formate is in the active site pocket with its single proton close to the catalytic sulfide. Then, the concerted transfer of the proton to the sulfide and of two electrons to the metal center produces a CO_2 molecule, which diffuses away, and brings the active site in a protonated Mo^{IV} state. Formate cannot productively approach the active site in this state as long as the proton is bound to the sulfide ligand. Oxidation to Mo^V, coupled to deprotonation, allows formate to bind in a configuration in which proton transfer to the sulfide is possible. Catalysis proceeds with formate binding and another one-electron oxidation, which may occur in any order (formate binding first or oxidation first).

This mechanism also applies to *Dv* FdhAB (replacing Mo by W), with one small modification: the pK_a of the W^V species is high enough that deprotonation is not necessarily coupled to oxidation to W^V, but, depending on pH, can also occur only during the oxidation to W^{VI}. Only then can the substrate bind. This observation is compatible with the observation by Niks et al. of a formate-derived proton coupled to a Mo^V signal[11] in the case of *Cupriavidus necator* FdsAB. It is also in line with the lower affinity of the W^V state for the substrate, and suggests that substrate binding may shift the deprotonation equilibrium.

In recent years, various data have been published in favor of the "second coordination sphere" mechanism, such as evidence for the lack of decoordination in all redox states of *Dv* FdhAB,[4,10] the formation of a 6-S Mo^V species coupled to a formate-derived proton after exposure of *Cupriavidus necator* FdsAB, but also a number of theoretical works suggesting that direct binding of formate to Mo is prohibitively endergonic.[26,27] Robinson and co-workers proposed that the decoordination of the SeCys corresponds to a reductive activation step observed in electrochemistry;[14] however, the closely related periplasmic nitrate reductase also undergoes a reductive activation[28] that was shown to arise from a change in the pterin cofactor rather than a change in metal coordination.[29] Other evidences of decoordination were obtained with *Rhodobacter capsulatus* FDH. The cysteine ligand to Mo was shown to be alkylated, but only in the presence of nitrate.[30] It was further shown by X-ray absorption spectroscopy to change active site ligands upon exposure to formate.[31] However, recent IR data show that the competitive inhibitor azide binds to the second coordination sphere,[32] which is compatible with the mechanistic proposal of Figure 4. Here, the observation that the binding constants for formate from the (V) and (VI) states are almost identical is a strong argument against the direct coordination of formate to the metal.

The mechanism shown in Figure 4 is strikingly reminiscent of that of metal-free formate dehydrogenases, which transfer a hydride from formate to NAD^+.[33] However, it is not appropriate to think of the Mo/W active site as a "substitute" for NAD^+: as emphasized by Yang and co-workers, the FDH reaction is not a hydride transfer, but rather the concomitant transfer of a proton and two

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 6, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202212224 by Cochrane France, Wiley Online Library on [07/02/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

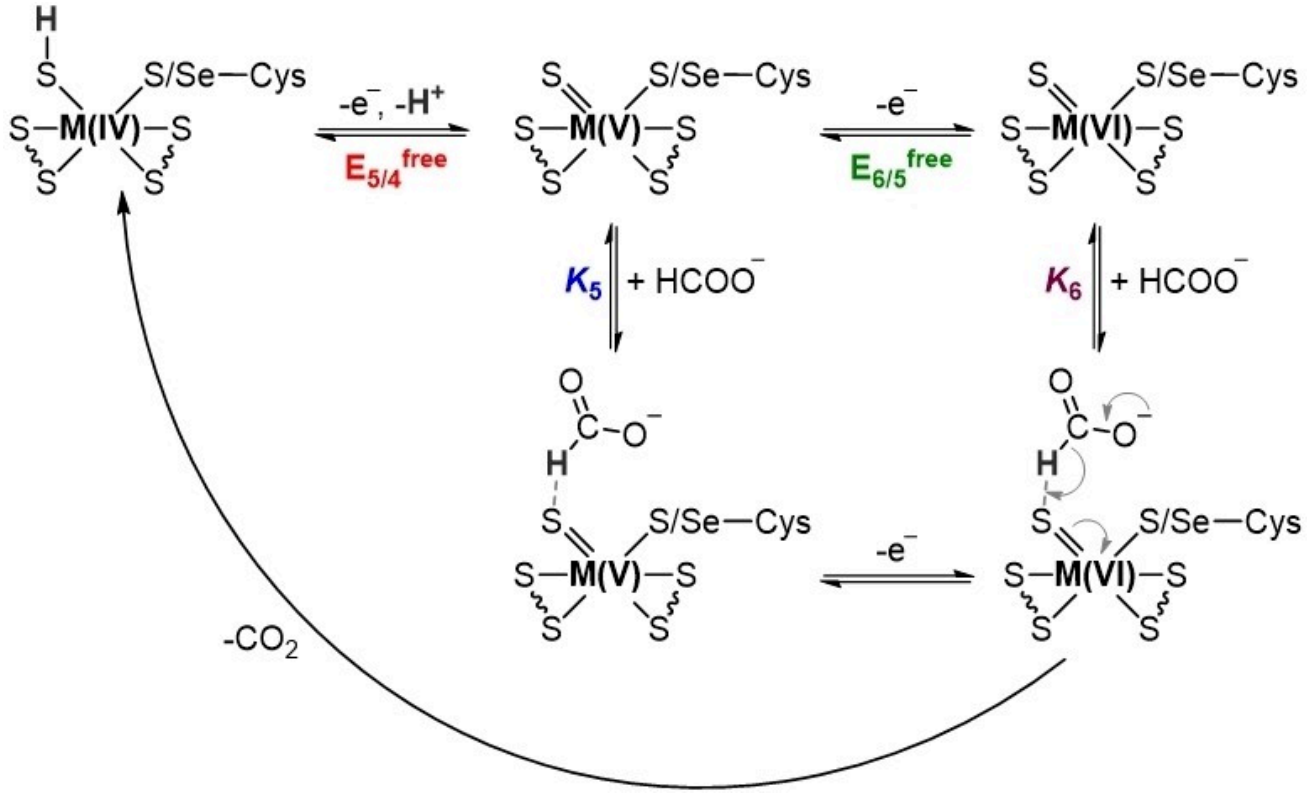


Figure 4. Proposed catalytic mechanism. M can either be Mo or W.

electrons, with two different targets.[34] This separation is necessary because metal hydrides with sufficient hydricity to reduce CO_2 can unfortunately only be reduced at potentials incompatible with the catalytic reversibility[35] of FDH.

Supporting Information

Procedures for protein purification, experimental conditions, derivations of Equations (1)–(3) and Supporting Information Figure S1.

Acknowledgements

The authors acknowledge support from CNRS, Agence Nationale de la Recherche (grants ANR-14-CE05-0010, ANR-15-CE05-0020, ANR-17-CE11-0027, ANR-18-CE05-0029), and Region PACA, . The project leading to this publication has received funding from Excellence Initiative of Aix-Marseille University—A*Midex, a French "Investissements d'Avenir" program. M.M., C.L., and V.F. are members of the French Bioinorganic Chemistry group (http://frenchbic.cnrs.fr). We also acknowledge support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (grant PTDC/BII-BBF/2050/2020 and fellowship DFA/BD/7897/2020), MOSTMICRO-ITQB unit (UIDB/04612/2020 and UIDP/04612/2020) and Associated Laboratory LS4FUTURE (LA/P/0087/2020), and support from the MOSBRI project, which has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement N° 101004806.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: Metalloenzymes · Enzyme catalysis · Electrochemistry · Mo/W formate dehydrogenase · Second coordination sphere

[1] S. Grimaldi, B. Schoepp-Cothenet, P. Ceccaldi, B. Guigliarelli, A. Magalon, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, *1827*, 1048–1085.
[2] L. B. Maia, J. J. G. Moura, I. Moura, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 287–309.
[3] R. Thomé, A. Gust, R. Toci, R. Mendel, F. Bittner, A. Magalon, A. Walburger, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4671–4678.
[4] A. R. Oliveira, C. Mota, C. Mourato, R. M. Domingos, M. F. A. Santos, D. Gesto, B. Guigliarelli, T. Santos-Silva,

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 6, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202212224 by Cochrane France, Wiley Online Library on [07/02/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

M. J. Romão, I. A. Cardoso Pereira, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 3844–3856.
[5] P. Schrapers, T. Hartmann, R. Kositzki, H. Dau, S. Reschke, C. Schulzke, S. Leimkühler, M. Haumann, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 3260–3271.
[6] S. V. Khangulov, V. N. Gladyshev, G. C. Dismukes, T. C. Stadtman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3518–3528.
[7] M. Meneghello, A. R. Oliveira, A. Jacq-Bailly, I. A. C. Pereira, C. Léger, V. Fourmond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9964–9967; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 10052–10055.
[8] H. C. A. Raaijmakers, M. J. Romão, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 849–854.
[9] C. S. Mota, M. G. Rivas, C. D. Brondino, I. Moura, J. J. G. Moura, P. J. González, N. M. F. S. A. Cerqueira, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 1255–1268.
[10] A. R. Oliveira, C. Mota, K. Klymanska, F. Biaso, M. J. Romão, B. Guigliarelli, I. C. Pereira, *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 1901–1909.
[11] D. Niks, J. Duvvuru, M. Escalona, R. Hille, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 1162–1174.
[12] T. Reda, C. M. Plugge, N. J. Abram, J. Hirst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10654–10658.
[13] M. Meneghello, C. Léger, V. Fourmond, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 17542–17553.
[14] W. E. Robinson, A. Bassegoda, E. Reisner, J. Hirst, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9927–9936.
[15] M. Miller, W. E. Robinson, A. R. Oliveira, N. Heidary, N. Kornienko, J. Warnan, I. A. C. Pereira, E. Reisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 4601–4605; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 4649–4653.
[16] R. Arias-Cartín, A. Uzel, F. Seduk, G. Gerbaud, F. Pierrel, M. Broc, R. Lebrun, B. Guigliarelli, A. Magalon, S. Grimaldi, A. Walburger, *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101384.
[17] C. Léger, P. Bertrand, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2379–2438.
[18] M. Del Barrio, M. Sensi, C. Orain, C. Baffert, S. Dementin, V. Fourmond, C. Léger, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 769–777.
[19] C. Léger, A. K. Jones, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 13058–13063.
[20] V. Fourmond, C. Baffert, K. Sybirna, T. Lautier, A. Abou Hamdan, S. Dementin, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, H. Bottin, C. Léger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3926–3938.
[21] V. Fourmond, C. Léger, *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *1*, 110–120.
[22] C. Léger, K. Heffron, H. R. Pershad, E. Maklashina, C. Luna-Chavez, G. Cecchini, B. A. Ackrell, F. A. Armstrong, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11234–11245.
[23] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, *146*, 1–13.
[24] C. Costa, M. Teixeira, J. LeGall, J. J. G. Moura, I. Moura, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 198–208.
[25] P. L. Hagedoorn, W. R. Hagen, L. J. Stewart, A. Docrat, S. Bailey, C. D. Garner, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 606–610.
[26] G. Dong, U. Ryde, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 1243–1254.
[27] P. E. M. Siegbahn, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 1728–1733.
[28] V. Fourmond, B. Burlat, S. Dementin, P. Arnoux, M. Sabaty, S. Boiry, B. Guigliarelli, P. Bertrand, D. Pignol, C. Léger, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 15478–15486.
[29] J. G. J. Jacques, V. Fourmond, P. Arnoux, M. Sabaty, E. Etienne, S. Grosse, F. Biaso, P. Bertrand, D. Pignol, C. Léger, B. Guigliarelli, B. Burlat, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2014**, *1837*, 277–286.
[30] T. Hartmann, P. Schrapers, T. Utesch, M. Nimtz, Y. Rippers, H. Dau, M. A. Mroginski, M. Haumann, S. Leimkühler, *Biochemistry* **2016**, *55*, 2381–2389.
[31] B. R. Duffus, P. Schrapers, N. Schuth, S. Mebs, H. Dau, S. Leimkühler, M. Haumann, *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 214–225.
[32] K. Laun, B. Duffus, S. M. Wahlefeld, S. Katz, D. Belger, P. Hildebrandt, M. A. Mroginski, S. Leimkühler, I. Zebger, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202201091.
[33] V. O. Popov, V. S. Lamzin, *Biochem. J.* **1994**, *301(Pt3)*, 625–643.
[34] J. Y. Yang, T. A. Kerr, X. S. Wang, J. M. Barlow, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 19438–19445.
[35] V. Fourmond, N. Plumeré, C. Léger, *Nat. Chem. Rev.* **2021**, *5*, 348–360.

Manuscript received: August 18, 2022
Accepted manuscript online: December 5, 2022
Version of record online: January 3, 2023

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie published by Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 6, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202212224 by Cochrane France, Wiley Online Library on [07/02/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Angewandte Chemie
Eine Zeitschrift der Gesellschaft Deutscher Chemiker

Supporting Information

Electrochemical Kinetics Support a Second Coordination Sphere Mechanism in Metal-Based Formate Dehydrogenase

*M. Meneghello, A. Uzel, M. Broc, R. R. Manuel, A. Magalon, C. Léger, I. A. C. Pereira, A. Walburger, V. Fourmond**

Supporting information

Sample preparation

Bacillus subtilis ForCE1

ForCE1 was overproduced and purified using an optimized method already described[1]. Briefly, overproduction of ForCE1 harboring a 6-histidines tag in its N-terminus, was performed in *B. subtilis* 168 4088 (*amy*E::pSHP1-6his*yjg*CD) grown in Luria Broth medium supplemented at the early-exponential phase with 0.8% xylose for 3 hours at 37°C. After cell lysis, *Bs* ForCE1 was loadedonto a 15 mL Ni-NTA affinity column (GE Healthcare) and eluted with 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 50 mM Na_2SO_4 and 500 mM imidazole. The enzyme was washed and concentrated in 50 mM MES, pH 6, 50 mM Na_2SO_4, 5% glycerol, and 10 mM KNO_3 and stored at -80°C until use.

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough FdhAB

FdhAB was expressed and purified as an optimized method already described[2]. Samples were stored in 20 mM Tris-HCl buffer with 10% glycerol and 10 mM $NaNO_3$.

Electrochemical measurements

Bs ForCE1 was used as purified (75 µM in 50 mM MES, pH 6, 50 mM Na_2SO_4, 5% glycerol and 10 mM KNO_3), without any further activation or treatment. *Dv* FdhAB was first activated by mixing 1 µL of enzyme stock solution (40 µM in 20 mM Tris-HCl with 10% glycerol and 10 mM $NaNO_3$, pH 7.6) with 1 µL of 20 mM dithiothreitol (DTT, from Sigma). After 30 min, 8 µL of pH 7 mixed buffer (containing 0.1 M NaCl and 5 mM each of sodium acetate, MES, HEPES, TAPS and CHES) were

added to dilute the enzyme 1:10. Both enzymes, *Bs* ForCE1 and the activated *Dv* FdhAB, were stored in the fridge of the glove box (at 4 °C) during the day of the experiments.
Electroactive films of *Bs* ForCE1 were prepared by depositing 0.5 µL of enzyme solution onto a pyrolytic graphite edge rotating disc electrode (PGE-RDE, 2.5 mm diameter) and letting it dry for 1-2 min. The films of *Bs* ForCE1 prepared in this way were extremely stable, with very little (almost insignificant) film loss during the time of the experiment.
Electroactive films of *Dv* FdhAB were prepared by using polymyxin B sulfate (from Sigma) as co-adsorbant, as described previously[3]. Briefly, 0.5 µL of polymyxin solution (6 mg/mL) were deposited onto a PGE-RDE and let dry, then 0.5 µL of the activated FdhAB solution were added on the electrode.

All electrochemical measurements with *Bs* ForCE1 and *Dv* FdhAB-modified electrodes were performed in a standard three-electrode cell placed inside a Jacomex glove box filled with N_2 (O_2 < 4 ppm). A platinum wire was used as the counter electrode, and a saturated calomel electrode (SCE, from Radiometer Analytical, France) was the reference electrode. All electrode potentials are reported with respect to the standard hydrogen electrode (SHE). The electrodes were connected to an Autolab PGSTAT128N potentiostat (Metrohm, The Netherlands), controlled through the software GPES. The working electrode was rotated using an OrigaTrod electrode rotator (Origalys, France). All experiments were carried out by rotating the working electrode at 3000 rpm to minimize depletion of the substrate at the electrode surface. The temperature of the water-jacket surrounding the electrochemical cell was kept constant during the experiments, at values of 40 °C for *Bs* ForCE1 and 25 °C for *Dv* FdhAB.

All experiments were performed by cyclic voltammetry at 20 mV/s in mixed buffers at different pH. Three different buffers were prepared: a pH 6, a pH 7 and a pH 8 mixed buffer, all containing 5 mM each of sodium acetate, MES, HEPES, TAPS and CHES. In addition to these five salts, the buffers contained 0.1 M Na_2SO_4 for experiments with *Bs* ForCE1, or 0.1 M NaCl for experiments with *Dv* FdhAB. The three buffers were used as prepared or mixed between each other in different percentages to obtain several pH values between 6 and 8. The electrochemical cell was always filled with 2 mL of the buffer of choice. After each experiment, the pH of the solution in the electrochemical cell was determined using an inoLab pH-meter (Weilheim, Germany) to know the exact pH of the measurement.
During the cyclic voltammetry, different aliquots of formate were injected in the cell (from stock solutions containing 1 mM, 10 mM, 100 mM or 1 M formate) in order to change the concentration of formate at each cycle. In general, around 20 different formate concentrations were used for each experiment, in the range between 2 µM and 20 mM for *Bs* ForCE1, or between 0.5 and 300 µM for *Dv* FdhAB.

Data analysis

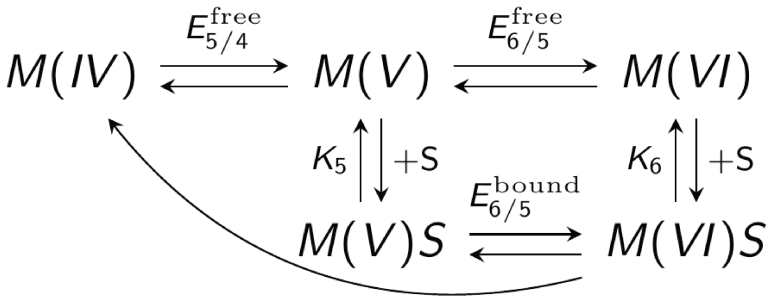
Fitting of the voltammograms

The voltammograms were baseline subtracted and fitted to the EECi model[4], using the following QSoas[5] command:

```
QSoas> fit-eeci-wave
```

Derivation of the equations used in text

From the following scheme (also the one in the text), we derive the substrate concentration-dependent potentials for overall V/IV and VI/V transitions.



The overall $E_{5/4}$ potential is defined by the Nernst equation thus:

$$\exp\frac{F(E-E_{5/4})}{RT}=\frac{[M(V)]+[M(V)S]}{[M(IV)]} \qquad (S1)$$

The equilibrium of binding of the substrate to the V state implies:

$$\frac{[M(V)S]}{[M(V)]}=\frac{S}{K_5}$$

The Nernst equation for the free V/IV species reads:

$$\exp\frac{F(E-E_{5/4}^{free})}{RT}=\frac{[M(V)]}{[M(IV)]}$$

Substituting it into the previous expression yields:

$$\exp\frac{F(E-E_{5/4})}{RT}=\frac{[M(V)]\,(1+S/K_5)}{[M(IV)]}=\exp\frac{F(E-E_{5/4}^{free})}{RT}\times(1+S/K_5)$$

Identification from equation S1 yields:

$$E_{5/4}=E_{5/4}^{free}-\frac{RT}{F}\ln\left(1+S/K_5\right)$$

Similarly, the $E_{6/5}$ potential is defined:

$$\exp\frac{F(E-E_{6/5})}{RT}=\frac{[M(VI)]+[M(VI)S]}{[M(V)]+[M(V)S]}$$

The equilibrium of binding to the VI state implies:

$$\frac{[M(VI)S]}{[M(VI)]}=\frac{S}{K_6}$$

Substitution of this relation in into the expression of the $E_{6/5}$ potential gives:

$$\exp\frac{F(E-E_{6/5})}{RT}=\frac{[M(VI)]\,(1+S/K_6)}{[M(V)]\,(1+S/K_5)}=\exp\frac{F(E-E_{6/5}^{free})}{RT}\times\frac{1+S/K_6}{1+S/K_5}$$

This finally gives an apparent potential of:

$$E_{6/5}=E_{6/5}^{free}+\frac{RT}{F}\ln\left(\frac{1+S/K_5}{1+S/K_6}\right)$$

The fact that the Michaelis constant at extreme driving force is K_6 comes from the simple fact that, at high driving force, the free enzyme is only under the M(VI) state, and thus the binding will only involve the equilibrium to the M(VI) state, whose constant is K_6.

Supplementary figures

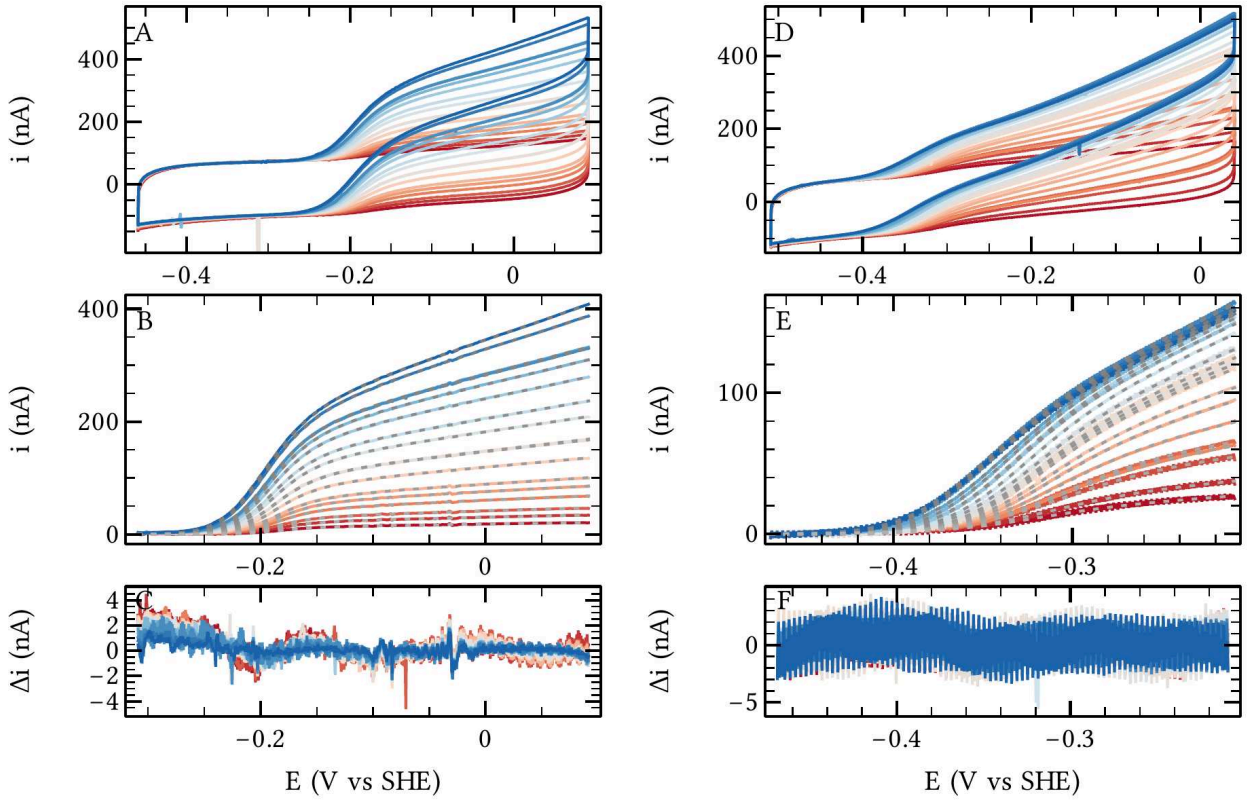


Figure S1: Raw voltammograms (A and D), baseline-subtracted data along with the fits (B and E) and the corresponding residuals (C and F) for the data in Figure 1 of text. Panels A-C are the data for *Bs* ForCE1, and panels D-F are for *Dv* FdhAB.

[1] R. Arias-Cartín, A. Uzel, F. Seduk, G. Gerbaud, F. Pierrel, M. Broc, R. Lebrun, B. Guigliarelli, A. Magalon, S. Grimaldi, A. Walburger, *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101384.

[2] A. R. Oliveira, C. Mota, C. Mourato, R. M. Domingos, M. F. A. Santos, D. Gesto, B. Guigliarelli, T. Santos-Silva, M. J. Romão, I. A. Cardoso Pereira, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 3844–3856.

[3] M. Meneghello, A. R. Oliveira, A. Jacq-Bailly, I. A. C. Pereira, C. Léger, V. Fourmond, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2021**, *60*, 9964–9967.

[4] V. Fourmond, C. Léger, *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *1*, 110–120.

[5] V. Fourmond, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 5050–5052.