

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Présentée par

Anne-France PROUVOST

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Rôle du périplasme dans la perception par la bactérie de son environnement :

- Utilisation des β -galactanes par *Erwinia chrysanthemi*
- Voie de signalisation du système Rcs dans la virulence
d'*Erwinia chrysanthemi*

Soutenue le 22 octobre 2008, devant la commission d'examen composée de :

Président :	Jean-Claude MICHALSKI
Rapporteurs :	Alain FILLoux
	Jean-Claude LAZZARONI
Examineurs :	Jean-Marie LACROIX
	Anthony PUGSLEY
Directeur de Thèse :	Jean-Pierre BOHIN

Sommaire

. Sommaire

. Remerciements	7
. Introduction	9
A. L'enveloppe des protéobactéries	9
1. L'enveloppe des bactéries	9
a) La membrane interne.....	9
• La double couche lipidique	9
• Les protéines de la membrane interne.....	10
b) La membrane externe	11
• La double couche lipidique	11
• Les protéines de la membrane externe	12
c) Le périplasme	14
• Le peptidoglycane	14
• Les glucanes périplasmiques osmorégulés.....	15
• Les protéines périplasmiques	15
d) Structures associées à l'enveloppe	16
• La capsule.....	16
• Les flagelles.....	17
• Les pilis	17
e) Structures traversant l'enveloppe : les systèmes de transport.....	18
• Le système Sec	18
• Le système TAT	19
• Le système de type I : système de type ABC (ATP Binding Cassette).....	20
• Le système de type II	21
• Le système de type III	21
• Le système de type IV	21
• Le système de type V	21
• Le système de type VI.....	22
2. Pouvoir pathogène, facteurs de virulence, facteurs d'antivirulence.....	22
a) L'acquisition de gènes de virulence.	22
b) L'élimination de gènes d'antivirulence.....	23
B. Les glucanes périplasmiques osmorégulés : les OPG	25
1. Les OPG : structure des familles.....	25
a) La famille I.....	25
b) La famille II.....	26
c) La famille III	26
d) La famille IV	26
2. Synthèse des OPG chez <i>E. coli</i> et <i>E. chrysanthemi</i> et leur régulation	28
3. Rôle et impact sur la virulence	31
C. Les systèmes à deux composants et les phosphorelais.....	34
1. Structure	34
a) Le capteur	34

b) Le régulateur	34
c) Les phosphorelais	35
2. La perception du signal	36
3. Le paradigme EnvZ-OmpR	37
4. Une réponse graduée	38
5. Rôle dans la virulence	40
D. Le phosphorelais : RcsCDB	45
1. RcsCDB	45
a) RcsC	45
b) RcsD	45
c) RcsB	45
d) RcsA	47
2. Protéines interagissant avec le phosphorelais Rcs	47
a) RcsF	47
b) IgaA	47
c) DjlA	49
3. Autres éléments interagissant avec le phosphorelais Rcs	49
4. Les gènes cibles du système Rcs	50
5. La mutation suppressive <i>rcsC2</i>	51
E. Le modèle d'étude : <i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	53
1. Structure de la paroi de la plante hôte	53
2. Mécanismes de virulence	55
. Objectifs	60
. Partie I – Contribution à la caractérisation du locus <i>gan</i> impliqué dans l'utilisation des galactanes chez <i>Erwinia chrysanthemi</i>.	61
A. Caractérisation du locus <i>gan</i> chez <i>Erwinia chrysanthemi</i>	61
1. Identification du locus	61
2. Caractérisation du locus : utilisation des galactanes et de leurs dérivés	64
a) Caractérisation des activités galactanases	64
• GanA : l'endo-1,4- β -galactanase	64
• GanB : l'exo-1,4- β -galactanase	67
b) Caractérisation du système de transport des galactanes	68
B. Régulation des gènes <i>gan</i>	69
1. Effet de la source de carbone sur l'expression des gènes <i>gan</i>	69
a) Effet des conditions de culture sur l'expression des fusions transcriptionnelles	69
b) Effet des conditions de culture sur l'activité endo-1,4- β -galactanase	75
• Effet sur l'activité de GanA	75
• Effet sur la fusion transcriptionnelle <i>ganA::uidA</i>	75
c) Effet des conditions de culture sur l'activité exo-1,4- β -galactanase	75
2. Effet de la phase stationnaire sur l'expression des gènes <i>gan</i>	76
3. Effet de GanR sur l'expression des gènes <i>gan</i>	78
4. Rôle du locus <i>gan</i> dans l'infection de l'hôte	79
a) Impact sur la virulence	79
b) Expression du locus lors de l'infection	79

C.	Relation entre le locus <i>gan</i> , les OPG et le système RcsCDB.....	81
D.	Conclusion et discussion	82
. Partie II - Rôle du système à deux composants RcsCDB dans le pouvoir pathogène d'<i>Erwinia chrysanthemi</i> et lien existant entre les OPG et le système RcsCDB.....		
A.	Impact du système RcsCBD sur le pouvoir pathogène d' <i>Erwinia chrysanthemi</i>	87
1.	Effet des mutations dans le système Rcs (<i>rcsC2</i> , <i>rcsC</i> , <i>rcsD</i> , <i>rcsB</i> , <i>ΔrcsCBD</i> et <i>rcsF</i>) dans les contextes sauvage et <i>opgG</i>	87
a)	Effet des mutations sur la mucosité.....	89
b)	Effet des mutations sur la motilité.....	89
c)	Effet des mutations sur l'activité pectinase.....	90
d)	Effet des mutations sur la résistance aux sels biliaires.....	90
e)	Effet des mutations sur la virulence	91
f)	Bilan des mutations	92
2.	Caractérisation de la mutation <i>rcsC2</i>	94
a)	Effets des mutations sur les fusions transcriptionnelles.....	94
•	Fusion <i>flhD-uidA</i>	94
•	Fusion <i>ftsA-uidA</i>	96
b)	La souche <i>rcsC2 opgG</i> ne perçoit plus le choc osmotique	97
c)	Dominance de la mutation <i>rcsC2</i>	99
•	Clonage du locus <i>rcsCBD</i>	99
•	Phénotype du mérodipléide : <i>opgG</i> , <i>rcsC2</i> , miniTn5 <i>rcsCBD</i>	99
•	Test de motilité.....	100
•	Virulence du mérodipléide.....	100
3.	Expression d'une version soluble de la lipoprotéine RcsF : TAT-RcsF	101
a)	Construction de la version soluble : TAT-RcsF	101
b)	Caractérisation de la structure de la protéine : mutations des cystéines	103
c)	Détermination par délétion de la partie active de RcsF.....	105
d)	Impact des mutations et des délétions dans TAT-rcsF sur l'expression de la fusion <i>cpsB-lacZ</i>	106
e)	Surexpression transitoire par le plasmide pNFW177 (contenant <i>TAT-rcsF</i>) chez <i>E. chrysanthemi</i>	108
4.	Effet de la surexpression des gènes <i>TAT-rcsF</i> , <i>igaA</i> , <i>djlA</i>	109
a)	Surexpression chez <i>E. coli</i>	109
b)	Surexpression chez <i>E. chrysanthemi</i> : phénotypes sur boîte.....	109
•	La mucosité	110
•	La motilité	111
c)	Surexpression chez <i>E. chrysanthemi</i> : dosage de la fusion <i>ftsA-uidA</i>	112
d)	Virulence	113
•	Test de virulence sur les tubercules de pomme de terre.....	113
•	Test de virulence sur les feuilles d'endive.	115
e)	Bilan des surexpressions	116
B.	Relation entre les OPG et le système Rcs	117
1.	Construction de <i>p_{araBAD} opgGH</i>	117
2.	Effet de la variation de la quantité des OPG	118
a)	Sur un des gènes cibles du système Rcs : la fusion <i>ftsA-uidA</i>	118
b)	Sur la fusion <i>opgG-uidA</i>	121

C.	Conclusion et Discussion	122
.	Discussion globale	133
.	Matériels et méthodes	137
A.	Souches et milieux	137
1.	Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries	137
2.	Génotypes des souches utilisées.....	138
3.	Plasmides utilisés	141
B.	Techniques génétiques	144
1.	Transduction.....	144
2.	Conjugaison (pUT et pOK).....	144
3.	Transformation	144
4.	Electroporation	144
C.	Techniques de biologie moléculaire.....	145
1.	Extraction et purification d'ADN : plasmide, bande, ADNg.....	145
2.	Enzymes de restriction et de modification	145
3.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR et PCR inverse)	146
4.	Séquençage.....	147
D.	Clonage moléculaire : Etude du système Gan.....	148
1.	Construction des mutants <i>ganA</i>	148
2.	Construction des mutants <i>ganB</i>	149
3.	Construction du mutant <i>ganL</i>	149
4.	Construction du mutant <i>ganE</i>	149
5.	Construction du mutant <i>ganK</i>	149
6.	Construction des mutants <i>ganR</i>	149
7.	La mutation <i>crp</i>	150
E.	Clonage moléculaire : Etude du système Rcs	150
1.	Clonage du locus <i>rscCBD</i>	150
2.	Constructions des mutants (<i>rscC</i> , <i>rscD</i> , Δ <i>rscCBD</i> , <i>rscB</i> , <i>rscF</i>).....	151
a)	Construction des mutants <i>rscC</i> et <i>rscD</i>	151
b)	Délétion du locus <i>rscCBD</i> : Δ <i>rscCBD</i>	152
c)	Construction du mutant <i>rscB</i>	152
d)	Construction du mutant <i>rscF</i>	153
3.	Construction des fusions transcriptionnelles.....	153
a)	Construction de la fusion <i>ftsA-uidA</i>	153
b)	Construction de la fusion <i>flhD-uidA</i>	154
c)	Construction de la fusion <i>cpsB-uidA</i>	154
4.	Clonage de <i>TAT-rscF</i> , <i>djlA</i> , <i>igaA</i>	155
a)	Clonage de <i>TAT-rscF</i>	155
b)	Clonage de <i>djlA</i>	156
c)	Clonage de <i>igaA</i>	156
5.	Les mutations dans <i>TAT-rscF</i>	157
a)	Mutant <i>TAT-rscF C75S</i>	157
b)	Mutant <i>TAT-rscF C110S</i>	157

c) Mutant <i>TAT-rcsF C119S</i>	157
d) Mutant <i>TAT-rcsF C125S</i>	157
F. Techniques de biochimie.....	157
1. Dosage des protéines	157
2. Dosage des activités β -galactosidase, β -glucuronidase et β -glucuronidase	158
3. Test phénotypiques : pectinase, cellulase, protéase et galactanase	158
G. Test de virulence	159
. Références	160

•

Remerciements

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR8576 CNRS) de l'université des Sciences et Technologies de Lille dans l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes sous la direction de Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bohin.

Je tiens à remercier Monsieur Alain Filloux et Monsieur Jean-Claude Lazzaroni d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, Monsieur Jean-Marie Lacroix et Monsieur Anthony Pugsley d'examiner ma thèse et Monsieur Jean-Claude Michalski de présider le jury.

Je remercie Jean-Pierre Bohin de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir encadrée pendant cette thèse et d'avoir partagé son savoir. Merci d'avoir attendu la fin de ma thèse pour partir en retraite...

Merci à Carmen Ödberg-Ferragut pour notre travail en collaboration, pour toutes ces discussions et notre quête de la mucosité. Merci à Aurélie Delangle et Nicole Hugouvieux Cotte-Pattat pour le travail en collaboration sur le « sujet gan ». Merci à Gilles Boussemart pour le travail en équipe sur le sujet « Et si on faisait varier la quantité d'OPG ? ».

Un grand merci à tous ceux qui font partie ou qui sont passés par l'équipe de génétique des enveloppes bactériennes : Jean-Marie Lacroix, notre nouveau chef, pour toutes nos discussions scientifiques et gastronomiques, Virginie Cogez pour m'avoir encadrée en Master recherche et pour sa bonne humeur et Olivier Vidal pour son intarissable sens de la conversation. Merci aux étudiants du labo : Franck Bouchart, Eglantine « Titoune » Rollet, Aurélie Delangle, Gilles Boussemart et Gaëlle Ezeque pour tous les bons moments passés au labo. Enfin Merci à Jacqueline Dondeyne de s'occuper de nous et à Peggy Gruau pour son amitié, tu vas devoir me supporter l'année prochaine...

Merci à tous les membres du C9 pour leur accueil, leur aide et leur sympathie. Un merci tout particulier à Brigitte Delrue, pour son soutien, ses conseils et son accompagnement dans notre insertion dans la vie professionnelle.

Merci à mes amis de m'avoir encouragée et « supportée » pendant cette thèse : Lolotte, la bibi de mon chéri (si si Aline...), Vivi et Gaby (Une petite belote ??), Maion et Fab, Xav et Julie, Aurore et tous les autres... Un gros bisou à mes « fous » de Paris : Caro et Virz, Nath, Cyrille, Lolo et Vanou, on n'a pas pu se voir autant que j'aurai voulu mais la BAC est & sera toujours au taquet...

Merci à mes parents, Gaët et Lulu, Mathias et Tinca et toute la famille pour vos encouragements, votre soutien et pour tout le reste. Vive les voyages en famille, Do Brasil... On remet ça quand ? Un bisou et une pensée pour mes grands parents, merci pour tous vos gènes scientifiques. Merci aussi à la famille Boussebart pour leur soutien et leur accueil dans la famille.

Le meilleur pour la fin, merci Gilles pour ton soutien, tes petits plats et ton amour ! L'année prochaine c'est ton tour, j'espère pouvoir te soutenir autant que tu m'as soutenue.

Introduction

. Introduction

A. L'enveloppe des protéobactéries

1. L'enveloppe des bactéries

L'enveloppe des protéobactéries est composée de deux membranes : la membrane interne et la membrane externe permettant la délimitation d'un compartiment à part entière : le périplasme (figure 1). L'enveloppe des protéobactéries est essentielle puisqu'elle est un lieu d'échanges et de communication avec le milieu extérieur. C'est au sein de cette enveloppe que la bactérie présente de nombreux éléments lui permettant de s'adapter à l'environnement.

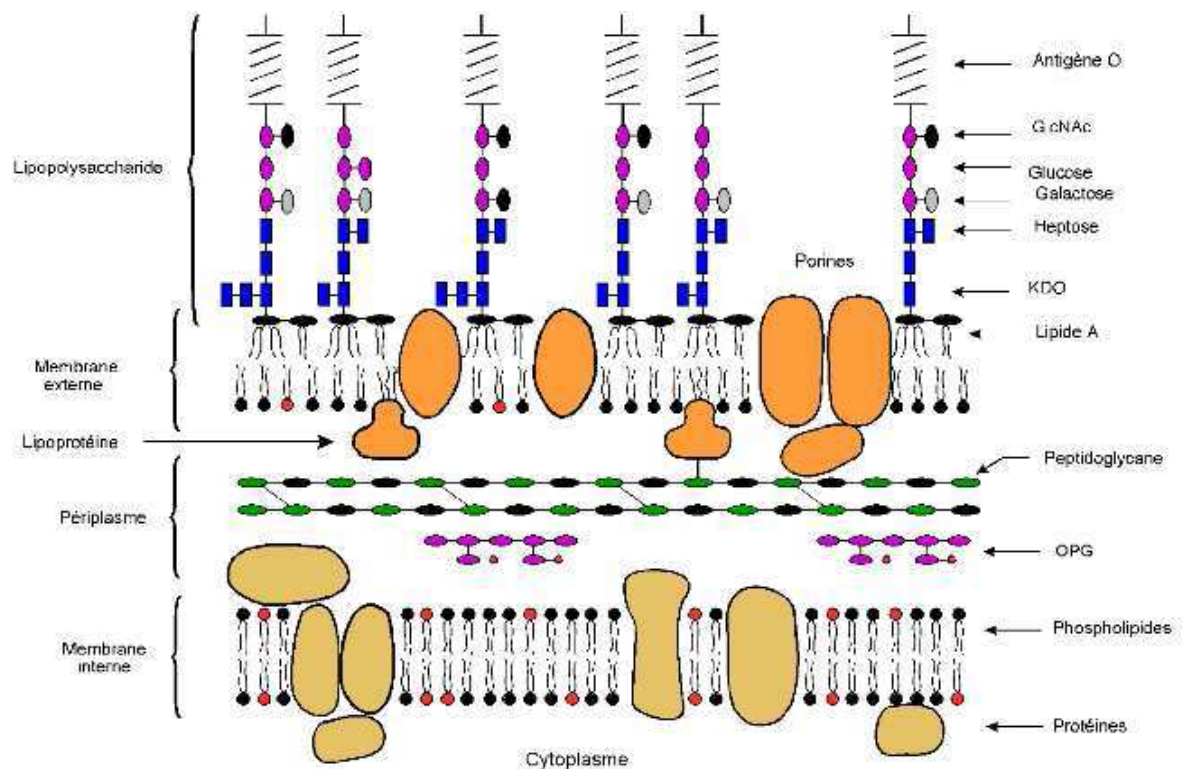


Figure 1: Schéma de l'enveloppe chez les Protéobactéries, d'après Raetz (1986).

a) La membrane interne

- La double couche lipidique

La membrane interne ou cytoplasmique sépare le cytoplasme de l'environnement, c'est une barrière hydrophobe sélective empêchant un passage des molécules polaires et permettant ainsi une accumulation de métabolites et de protéines. Sa structure, sa composition et le rôle

des protéines sont proches de ceux des eucaryotes. Elle est composée à 50% d'une double couche lipidique et à 50% de protéines aux fonctions diverses. La double couche lipidique se compose de 3 espèces majeures de phospholipides : environ 75% de phosphatidylethanolamine (PE), environ 20% de phosphatidylglycérol (PG) et environ 5% de cardiolipides (CL) (Boom et Cronan, 1989). Leur proportion varie selon la souche et son état physiologique. Ils sont constitués de glycérol-3-phosphate estérifié par 2 acides gras (position 1 et 2). Les acides gras sont essentiellement de l'acide palmitique, de l'acide palmitoléique, de l'acide myristique et de l'acide cis-vaccénique. La longueur et la saturation de ces acides gras varient avec les conditions environnementales comme la température, la phase de croissance, la composition du milieu de croissance etc. (Kadner, 1996). La composition en phospholipides de la membrane interne influence de nombreux systèmes comme la translocation des protéines, la réplication du chromosome, la résistance aux antibiotiques (Kadner, 1996). Ces phospholipides servent également des précurseurs d'autres éléments. En effet, les OPG (Cf. le chapitre B : Les glucanes périplasmiques osmorégulés : les OPG) présentent des substitutions par le phosphoethanolamine (PE) et le phosphoglycerol (PG) provenant de la double couche lipidique (Van Golde et *coll.*, 1973) ou encore le transfert de phosphoethanolamine sur le lipopolysaccharide.

- **Les protéines de la membrane interne**

Elles sont plus d'une centaine au niveau de la membrane interne. Leur nombre et leur quantité varient en fonction de la phase de croissance et les conditions environnementales, permettant ainsi une adaptation aux changements environnementaux (Sato et *coll.*, 1977).

La membrane interne intervient dans un grand nombre de fonctions dont la production d'énergie, le transport de métabolites, la translocation des macromolécules de l'enveloppe ou encore dans la réplication et la ségrégation des chromosomes. Cette membrane est le siège de nombreuses synthèses comme celle du lipopolysaccharide, du peptidoglycane, des phospholipides, des exopolysaccharides (EPS) et des OPG.

Parmi les protéines de la membrane interne, on retrouve également des protéines impliquées dans la transduction des signaux environnementaux, tels que la présence de nutriments, l'osmolarité etc. Les signaux captés par l'enveloppe sont transmis au cytoplasme par l'intermédiaire de systèmes à deux composants (comprenant un capteur transmembranaire et un régulateur cytoplasmique) permettant une adaptation aux variations environnementales.

Nous développerons ces systèmes ultérieurement (Cf. le chapitre C : Les systèmes à deux composants).

b) La membrane externe

La membrane externe permet de protéger les bactéries contre des agressions du milieu extérieur comme les antibiotiques, les détergents, les molécules de défense de la cellule infectée, une variation de température ou un choc osmotique. De petits composés hydrophiles peuvent passer cette membrane grâce à des transporteurs (spécifique ou non).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif comprend 2 feuillets avec des compositions totalement différentes et des protéines.

• La double couche lipidique

Le feuillet interne est constitué de phospholipides similaires à ceux retrouvés dans la membrane interne (PE, PG et CL).

Le feuillet externe est composé de lipopolysaccharide (LPS) (figure 1 et 2). Le LPS est constitué de 3 parties (Raetz, 1986):

↳ une partie hydrophobe : le lipide A. Le lipide A est formé de 2 résidus de glucosamine phosphate substitués par des résidus d'acides gras (saturés pour la plupart).

↳ une partie hydrophile oligosaccharidique centrale : le noyau. Il est composé par 2 sucres spécifiques : l'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique (le KDO) et un heptose (le L-glycero-D-manno-heptose), puis d'autres sucres qui peuvent varier selon l'espèce (le glucose, le galactose et la N-acétyl-D-glucosamine).

↳ une partie hydrophile polysaccharidique distale : l'antigène O. Il est composé d'unités répétées de glucides (3 à 5 résidus selon les souches) et n'est pas toujours présent.

Le LPS joue donc un rôle structural important pour l'enveloppe ainsi qu'un rôle important dans la relation hôte-bactérie.

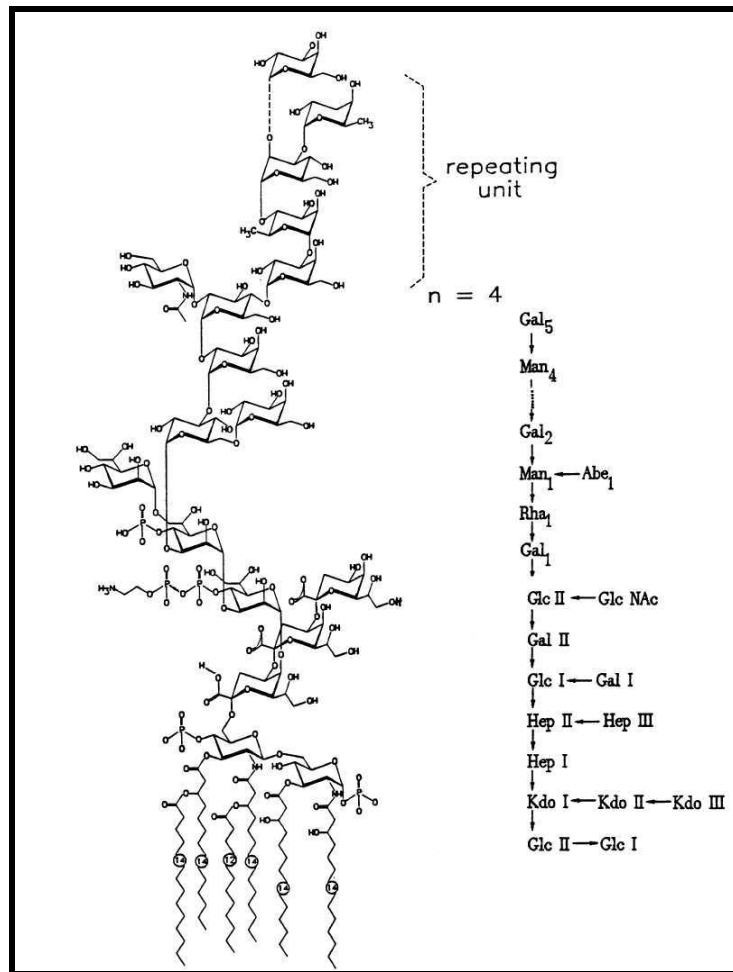


Figure 2: Modèle structural du lipopolysaccharide chez les entérobactéries (Kastowsky et coll., 1992).

- **Les protéines de la membrane externe**

La membrane externe, bien que très épaisse, est très perméable grâce à la présence de nombreuses protéines : les OMP (Outer Membrane Proteins). Elles sont différentes de celles de la membrane interne et comportent plusieurs types :

↳ Les porines sont les protéines majoritaires de la membrane externe. Elles forment des pores relativement peu spécifiques permettant le passage de molécules hydrophiles à travers la membrane externe. Les plus répandues sont les porines OmpF, OmpC et PhoE. Elles s'organisent en homotrimères. Les porines OmpF et OmpC sont toujours produites mais en quantité variable en fonction des conditions environnementales comme l'osmolarité et la température. En effet, les gènes *ompF* et *ompC* sont régulés principalement par un système à deux composants OmpR-EnvZ (Hall and Silhavy, 1981). Cette régulation sera développée dans la partie sur les systèmes à deux composants puisque le système OmpR-EnvZ en est le paradigme. Il existe également des porines sélectives impliquées dans la diffusion de sucres

ou de métaux comme LamB, porine impliquée dans le transport des maltodextrines et du maltose chez *E. coli* ou encore KdgM qui permet l'entrée d'oligogalacturonates (produits de dégradation de la pectine) à travers la membrane d'*E. chrysanthemi* (Blot et coll., 2002). Ces porines peuvent servir de récepteur à des phages (ex : LamB chez *E. coli*, est le récepteur du phage lambda).

↳ La protéine OmpA est une protéine majeure de la membrane externe. Elle est monomérique et aurait une fonction structurale. En effet, elle possède un domaine N-terminal ancré dans la membrane externe et un domaine C-terminal localisé dans le périplasme qui pourrait interagir avec le peptidoglycane (Mot & Vanderleyden, 1994). Elle permettrait l'intégrité de la membrane externe.

↳ On trouve également des protéines mineures dont la synthèse est inductible. Elles regroupent notamment les protéines impliquées dans les systèmes de sécrétion. Nous développerons ce point par la suite (Cf. e. Structure traversant l'enveloppe : les systèmes de transport). Il existe également des récepteurs à haute affinité qui sont capables de capter des molécules présentes dans le milieu extérieur à une faible concentration, par exemple la protéine BtuB chez *E. coli*, le récepteur de la vitamine B12.

↳ Les lipoprotéines sont majoritairement ancrées dans le feuillet interne de la membrane externe par un lipide en N-terminal (un résidu cystéine en position N-terminale est substitué par des acides gras permettant l'ancrage), d'autres peuvent être localisées dans la membrane interne (figure 3). La mise en place des lipoprotéines fait intervenir plusieurs étapes. La modification de la lipoprotéine intervient après la translocation du cytoplasme à la membrane interne (feuillet périplasmique) de la lipoprotéine précurseur par l'intermédiaire du système Sec. Cette étape permet d'avoir l'ancrage dans la membrane de la lipoprotéine par un lipide en position N-terminal et le clivage de la séquence signal. Une fois ancrée dans la membrane interne, elles peuvent être transportées dans le feuillet interne de la membrane externe. Sur les 90 lipoprotéines prédites chez *E. coli*, seule une dizaine sont prédites pour être localisées dans la membrane interne (Narita & Tokuda, 2006). Le transport de la lipoprotéine vers la membrane externe fait intervenir un système de transport de type ABC : le système Lol (figure 3). Les lipoprotéines sont détachées de la membrane interne par le transporteur LolCDE en présence de la protéine périplasmique LolA. Le complexe LolA-lipoprotéine va interagir avec la lipoprotéine LolB (localisée dans la membrane externe). La lipoprotéine va être transférée à la lipoprotéine LolB, qui va permettre l'incorporation de la lipoprotéine dans le feuillet interne de la membrane externe. La plus connue est la lipoprotéine de Braun qui existe en très grand nombre de copies dans la bactérie. Près d'un tiers de cette lipoprotéine est

liée de façon covalente au peptidoglycane par son extrémité C-terminale périplasmique permettant une fois de plus la stabilité de la membrane externe (Nikaido, 1996). Une autre lipoprotéine importante est la lipoprotéine LolB impliquée dans la mise en place des lipoprotéines dans la membrane externe. Il existe également des lipoprotéines impliquées dans la signalisation des systèmes à deux composants. Nous développerons ce point avec la lipoprotéine RcsF intervenant dans la signalisation du système à deux composants RcsCDB (Cf. chapitre D : Le phosphorelais Rcs).

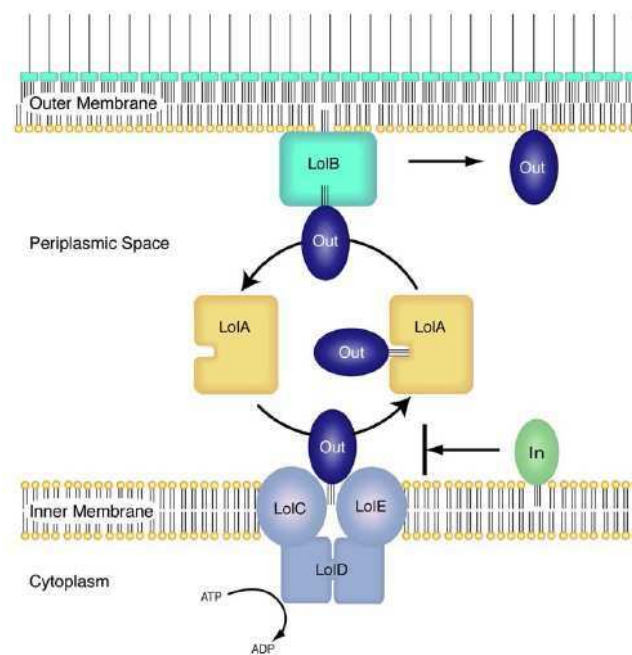


Figure 3 : Système de transport Lol permettant la localisation des lipoprotéines dans la membrane externe. « In » et « Out » représentent respectivement les lipoprotéines spécifiques de la membrane interne et spécifiques de la membrane externe (Narita & Tokuda, 2006).

c) Le périplasme

Ce compartiment est délimité par la membrane interne et la membrane externe. Il représente environ 20 à 40 % du volume cellulaire (Stock et coll., 1977). Il formerait une sorte de gel visqueux (Hobot et coll., 1984). Le périplasme contient 2 types de glucanes spécifiques des bactéries : la couche de peptidoglycane et les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Il contient également de nombreuses protéines (figure 1).

- **Le peptidoglycane**

Le peptidoglycane (figure 4), également appelé muréine, est un hétéropolymère composé de chaînes glycaniques (avec un motif disaccharidique répété de N-acétylglucosamine et d'acide

N-acétylmuramique liés en β -1,4) reliées entre elles par des peptides. Ces liaisons permettent au peptidoglycane de former un réseau dense autour de la cellule. Il permet de protéger la cellule des pressions osmotiques, détermine sa forme et sa taille puisque la cellule s'allonge et se divise uniquement si le peptidoglycane s'est élargit. Ceci contribue à l'aspect visqueux du périplasme.

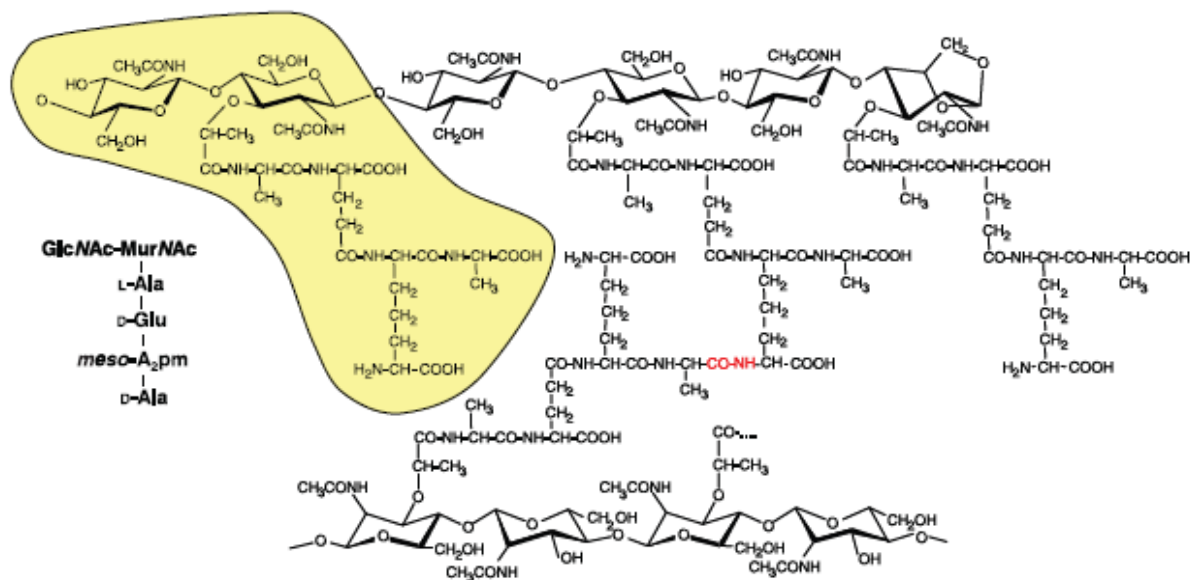


Figure 4 : Structure du peptidoglycane d'*Escherichia coli*.

Les chaînes glycaniques sont constituées d'une alternance de résidus N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique liés en β -1,4 et se terminent par un résidu d'acide N-anhydroacétylmuramique (1,6-anhydroMurNAc). La marque jaune représente une sous unité composée d'un disaccharide et d'un tétrapeptide (Vollmer et *coll.*, 2008).

- **Les glucanes périplasmiques osmorégulés**

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des oligosaccharides présents dans le périplasme des Protéobactéries. Leur quantité dépend de l'osmolarité du milieu, en effet, plus l'osmolarité est faible plus la quantité d'OPG est importante. Nous décrirons ces glucanes ultérieurement (Cf. le chapitre B : Les glucanes périplasmiques osmorégulés : les OPG).

- **Les protéines périplasmiques**

Elles peuvent être classées par groupe fonctionnel :

- dans la **synthèse** des constituants de l'enveloppe et leur assemblage, comme le peptidoglycane, le LPS, la capsule et les OPG ou encore comme le système Lol impliqué dans le transport des lipoprotéines vers la membrane externe.

- dans la mise en conformation des protéines comme DsbA, DsbC qui catalysent la formation des ponts disulfures.
- dans la **sécrétion** de protéines ou de polysaccharides extracellulaires.
- dans **mise en place** des flagelles et/ou des pilis.
- dans la **nutrition** par le transport entrant et/ou la dégradation de nutriments. Ces enzymes cataboliques vont dégrader des molécules complexes en précurseurs simples utilisables par la cellule.
- dans la **détoxication** par la dégradation et/ou le transport sortant de toxiques qui ont réussi à traverser la membrane externe (exemple : la β -lactamase).
- dans la **signalisation** par la perception et la transmission d'informations externes,
 - * pour le chimiotactisme et la motilité (en particulier par les flagelles),
 - * pour l'adaptation physiologique aux conditions de l'environnement.

d) Structures associées à l'enveloppe

Les bactéries ont plusieurs types de structures associées à l'enveloppe : la capsule, les flagelles et les pilis.

• La capsule

Elle est associée à la membrane externe et se compose d'exopolysaccharides de haut poids moléculaire. Cette structure n'est pas constante. En effet, la synthèse est conditionnelle et dépend du milieu de croissance, des conditions environnementales. Ces exopolysaccharides sont des déterminants antigéniques comme par exemple l'antigène K et l'antigène M (acide colanique) chez *E. coli*. La capsule est essentielle pour la bactérie dans son environnement, car elle est le déterminant majeur de sa capacité à coloniser une niche particulière. C'est également un élément intervenant dans la défense de la bactérie contre la phagocytose (Vimr et coll., 1995). Les bactéries présentant une capsule sont glissantes et échappent à la phagocytose. La capsule est donc un facteur de virulence. Chez *E. coli* et chez *E. chrysanthemi*, la synthèse des exopolysaccharides est gouvernée par les gènes *cps* (« capsular polysaccharide synthesis »). Les gènes *cps* sont fortement régulés selon les conditions environnementales telles que la température, l'osmolarité... Une augmentation de l'expression de ces gènes confère à une colonie un aspect muqueux. Nous aborderons une partie de la régulation des gènes *cps* par la suite.

- **Les flagelles**

Ce sont des appendices sortant de la membrane externe, au delà de la capsule. Le flagelle est l'organe de locomotion des bactéries. Le flagelle est composé de trois parties (figure 5) : un moteur appelé le corps basal, d'un crochet et d'un filament qui s'étend dans le milieu de 5 à 10µm.

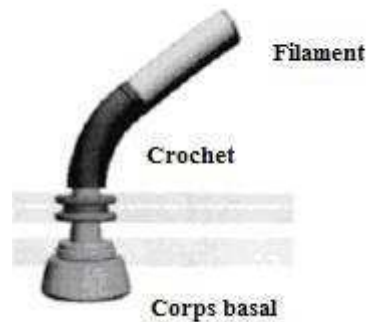


Figure 5 : schéma représentant un flagelle (d'après Aizawa & Kubori, 1998)

Les bactéries flagellées sont distinguées par le nombre et la position des flagelles, par exemple, *Pseudomonas* ne possède qu'un flagelle polaire alors qu'*E. coli* est péritriche (plusieurs flagelles réparties sur toute la surface de la bactérie). Le flagelle permet à la bactérie de se déplacer vers un lieu favorable à sa croissance ou de s'éloigner du milieu hostile. Ce filament permet alors le phénomène de nage ou un phénomène de culbute en fonction du sens de rotation du filament sur lui-même. Le changement de sens de la rotation dépend du moteur qui répond alors aux stimuli environnementaux comme le gradient de concentration d'un attractif ou d'un répulsif, c'est le chimiotactisme.

- **Les pilis**

Les pilis, également appelés fimbriae, sont le second type de structure protéique se déployant au delà de la surface bactérienne. Ce sont des organites permettant l'attachement aux surfaces constitués de protéines structurales nommées pilines. Il existe plusieurs types de pilis par exemple :

- ↳ les pilis communs de type I permettent l'attachement de la bactérie à une autre interface comme les cellules eucaryotes, et joue donc un rôle dans les interactions hôte-pathogène. Ils prennent naissance dans la membrane externe.
- ↳ Les pilis sexuels jouent un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne, puisqu'ils permettent l'attachement initial des partenaires.



e) **Structures traversant l'enveloppe : les systèmes de transport**

La bactérie a de nombreux systèmes traversant l'enveloppe. Ils sont utilisés pour le transport ou la sécrétion de protéines. Il y a 2 systèmes de transports : le système Sec (majoritaire) et un minoritaire : le système TAT (figure 6).

- **Le système Sec**

Le système Sec est le système majeur de translocation des protéines qui permet la translocation des protéines de la membrane externe et du périplasme à travers la membrane interne. Dans ces deux cas, il est nécessaire d'avoir une séquence signal en N-terminal. Ce système permet également l'adressage de protéines ayant un large domaine périplasmique dans la membrane interne

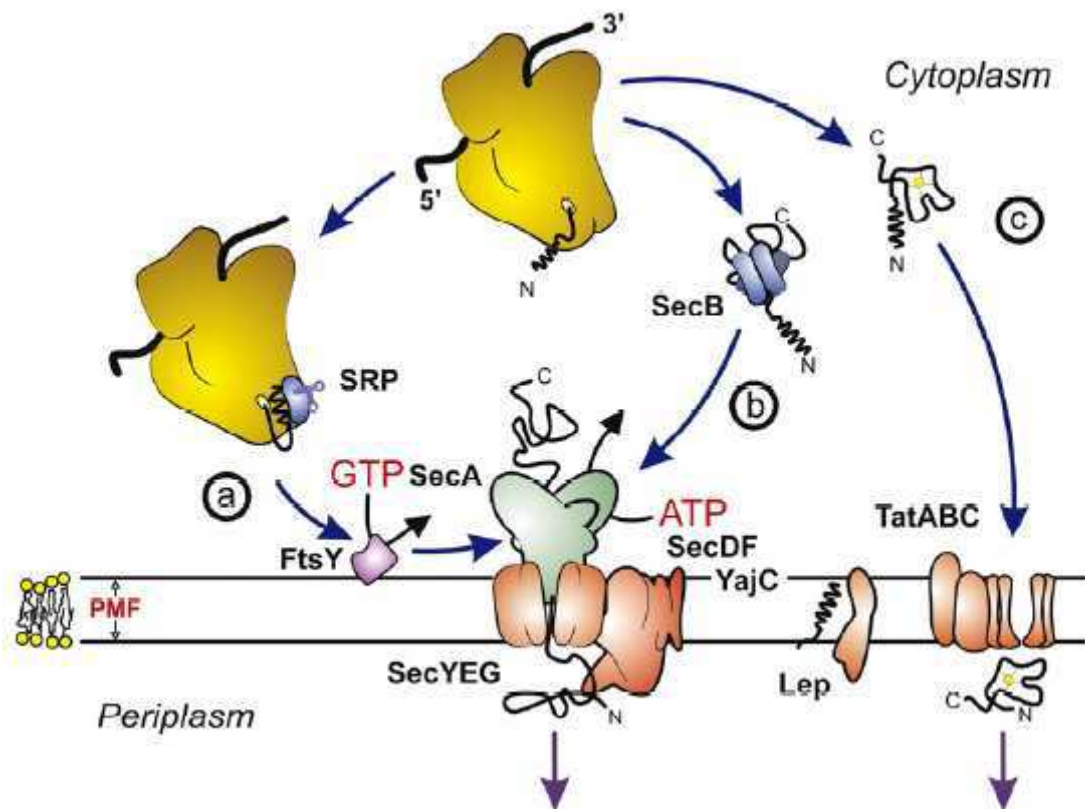


Figure 6: Schéma des systèmes de transport Sec et TAT chez *E. coli*. (a) Acheminement co-traductionnel et (b) post-traductionnel et translocation de protéines non conformées par la translocase Sec. (c) Translocation des précurseurs protéiques conformés par la translocase TAT (Natale et coll., 2007).

- **Le système TAT**

Le système de sécrétion TAT (twin arginine translocation system) est impliqué dans la sécrétion de protéines périplasmiques. Ce système permet le passage à travers la membrane de protéines déjà conformées et ayant souvent fixé un cofacteur. Le système TAT est composé de 5 protéines : TatABCDE chez *E. coli*. La reconnaissance de la protéine à transloquer s'effectue grâce à un peptide signal dit à 2 arginines localisées en N-terminal (le motif reconnu est **SRRXFLK**). Le système TAT permet notamment la sécrétion de la protéine OpgD qui joue un rôle dans la biosynthèse des OPG (cf. chapitre B : Les Glucanes Périplasmiques Osmorégulés : les OPG) (Stanley et coll., 2001).

Plusieurs systèmes permettent la sécrétion des protéines : Les systèmes de sécrétion de type I, II, III, IV, Va et Vb (figure 7).

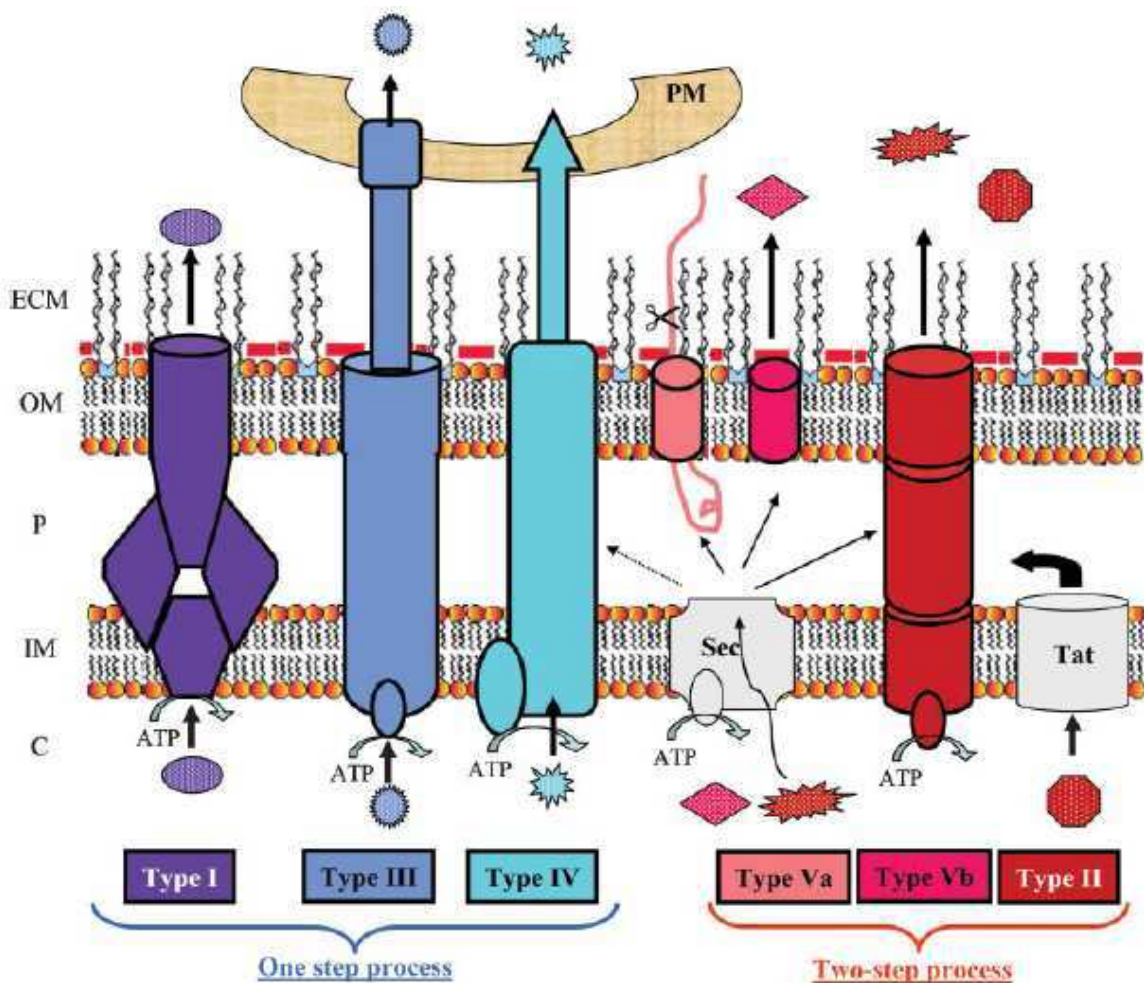


Figure 7 : Schéma représentant les principaux systèmes de sécrétion des protéines chez les protéobactéries (Filloux et coll., 2008).

- **Le système de type I : système de type ABC (ATP Binding Cassette)**
(figure 7 et 8)

Le système de sécrétion de type I permet la sécrétion de protéines vers le milieu extérieur en utilisant la force protonmotrice. C'est le cas de la sécrétion d'hémolysine (HlyA, toxine extracellulaire produite par certaines souches d'*E. coli*) qui nécessite le produit de trois gènes: *hlyD*, *hlyB*, *tolC*.

Ce type de systèmes permet également la résistance à de multiples agents antimicrobiens comme le système de transport AcrAB/TolC qui va permettre d'établir un tunnel à travers les deux membranes bactériennes, afin d'éliminer certaines drogues entrées dans le périplasma ou le cytoplasme. Chez *Erwinia amylovora*, il a été montré que lors de l'infection, la bactérie est exposée à une variété de composés antimicrobiens produits par la plante : les phytoalexines. L'existence de transporteurs d'efflux multidrogues de type AcrAB/TolC confère à *E. amylovora* la résistance à ces composés antimicrobiens (Burse et coll., 2004).

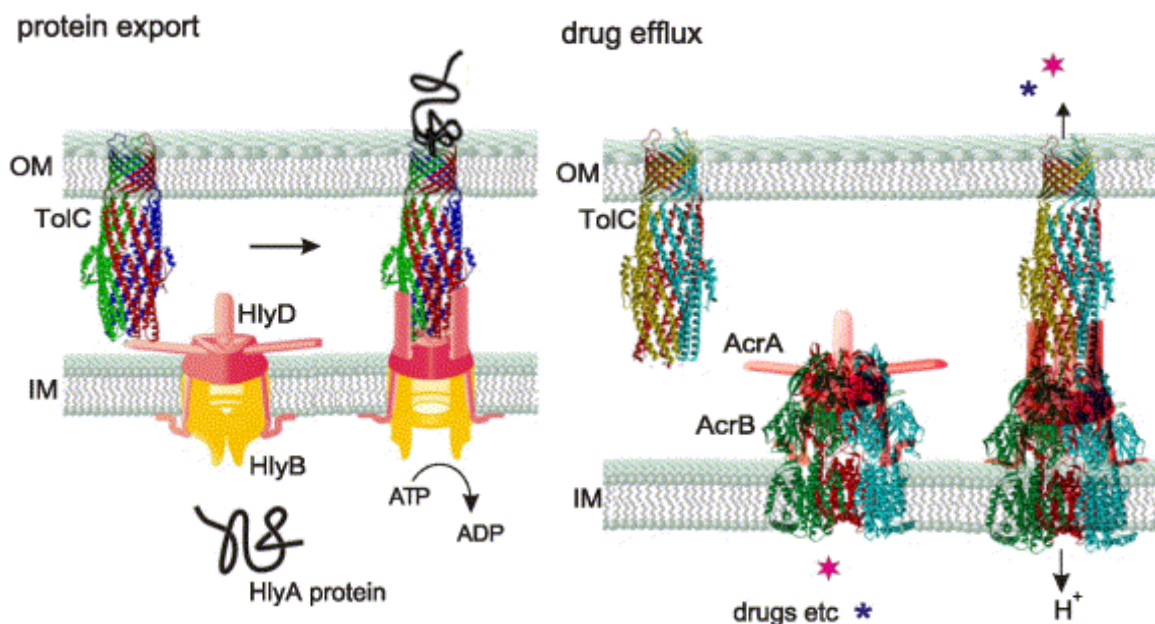


Figure 8 : (1) La toxine HlyA est exportée d'*E. coli* sans intermédiaire périplasmique par un système de sécrétion comprenant une translocase énergétique composée de deux protéines : HlyD et l'ATPase HlyB, et de la protéine TolC. (2) Les drogues sont exportées sans intermédiaire périplasmique par un système de sécrétion comprenant une translocase composée de deux protéines : AcrA et AcrB (antiport à proton) et de la protéine TolC.

- **Le système de type II (figure 7)**

Le système de sécrétion de type II nécessite une première étape de translocation à travers la membrane interne via le système Sec ou le système TAT. La deuxième étape de translocation s'effectue à travers la membrane externe et nécessite un système de transport comprenant 13 à 15 protéines différentes. Ce système est utilisé par les bactéries qui ne vont pas rentrer dans les cellules de l'hôte et permet donc de sécréter les enzymes capables d'attaquer l'hôte. Les pectinases et les cellulases d'*E. chrysanthemi* sont secrétées par ce système (système Out). Ces enzymes seront présentées dans le chapitre consacré à la virulence d'*E. chrysanthemi* (Cf. le chapitre E : le modèle d'étude : *E. chrysanthemi*).

- **Le système de type III (figure 7)**

Il est réservé aux bactéries pathogènes et permet d'injecter directement des protéines transloquées dans le cytoplasme de la cellule hôte parasitée. Il présente de grande analogie avec le flagelle. Il permet notamment l'exportation des protéines harpin-like d'*Erwinia amylovora* (Van Gijsegem et coll., 1993).

- **Le système de type IV (figure 7)**

Le système de sécrétion de type IV présente de fortes similitudes avec le système de transfert d'ADN par conjugaison. Il nécessite plus de 10 protéines. Il y a formation d'un canal entre la bactérie et la cellule hôte pour permettre un transfert de substrat d'ADN ou de protéines.

- **Le système de type V (figure 7)**

Le système de sécrétion de type Va permet la sécrétion d'une seule protéine par le système et ne requiert qu'une seule protéine. C'est la même protéine qui effectue son propre transport dans le milieu extérieur, on parle alors d'autotransporteur. Il est retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes et permet la sécrétion de protéases, de toxine et des adhésines. La protéine a alors 3 domaines d'intérêt : une séquence signal permettant le passage de la protéine dans le périplasme, la protéine mature qui sera secrétée et la partie C-terminale qui va assurer le transport de la protéine mature dans le milieu extérieur. Le système de sécrétion de type Vb permet la sécrétion d'une protéine à travers un pore de la membrane. Ils contiennent toute l'information pour la translocation à travers l'enveloppe cellulaire.

- **Le système de type VI (figure 8)**

Plus récemment un sixième système de transport a été décrit (Filloux et *coll.*, 2008). Ce système est probablement une machine de sécrétion à multiples composants, souvent impliqués dans les interactions avec l'hôte, permettrait la sécrétion des protéines Hcp et VgrG. Son rôle précis et son mode d'action restent toute fois inconnus (Filloux et *coll.*, 2008).

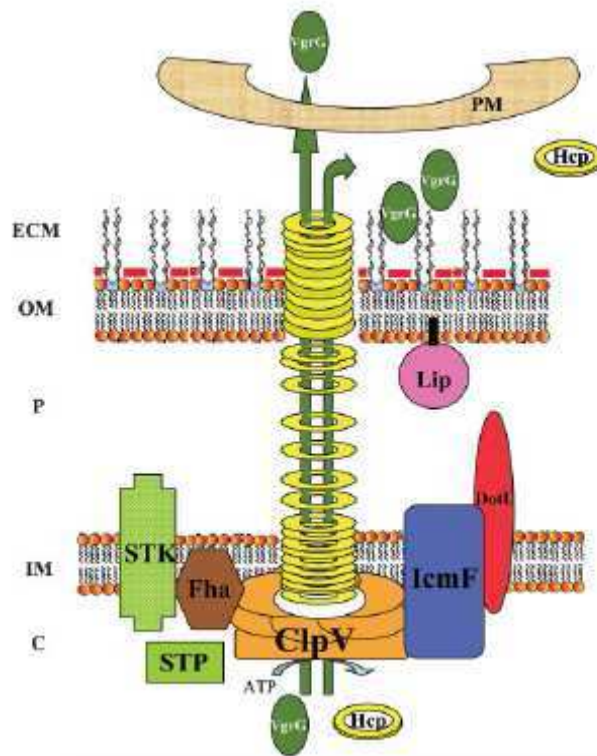


Figure 8: Représentation schématique du système de sécrétion de type VI (T6SS) (Filloux et *coll.*, 2008).

2. Pouvoir pathogène, facteurs de virulence, facteurs d'antivirulence

L'évolution des bactéries pathogènes depuis leur ancêtre non pathogène est conditionnée par 2 éléments : l'acquisition de gènes de virulence et l'élimination de gènes d'antivirulence. Ces phénomènes sont essentiels pour une bonne adaptation de la bactérie à la nouvelle niche qu'elle colonise.

a) L'acquisition de gènes de virulence.

L'acquisition de gènes de virulence va s'effectuer par des transferts horizontaux directement d'autres bactéries par conjugaison, par transduction ou par transformation. L'acquisition de

plasmide, de prophages ou d'îlots de pathogénicité a bien été étudiée. Les îlots de pathogénicité sont des groupes de gènes (10 à 200kb), présents chez une bactérie pathogène, absents chez son ancêtre non pathogène et présentant des gènes potentiellement impliqués dans la virulence de la bactérie. Dans le génome, ils sont détectables par leur pourcentage en G+C différent du reste du génome.

b) L'élimination de gènes d'antivirulence.

La contribution de la perte de gènes dans l'évolution d'une bactérie non pathogène vers une bactérie pathogène est de plus en plus étudiée. Ce processus est causé par des mutations pathoadaptatives qui sont des modifications génétiques permettant une meilleure adaptation de la bactérie à son nouvel environnement. Ces mutations peuvent être de plusieurs sortes : mutations ponctuelles, insertion et délétion. Dans certaines conditions, pour permettre une meilleure adaptation à la nouvelle niche, il y a une grande délétion dans le génome contenant les gènes d'antivirulence, on parle alors de « trou noir ». Pour qu'un gène soit appelé gène d'antivirulence, il faut que son expression soit incompatible avec la virulence de la bactérie.

Nous pouvons citer l'exemple de la bactérie *Shigella* qui a évolué d'*E. coli* par l'ajout de plasmide de virulence, de transferts latéraux d'îlots de pathogénicité (SH1 et SH2) et par la perte de gènes d'antivirulence *cadA* et *avl* (figure 9). Il a été montré que le gène *cadA* était absent de toutes les espèces de *Shigellae*, que les souches d'*E. coli* enteroinvasives ne présentaient pas non plus ce gène (alors que les souches commensales l'expriment) et que l'expression du gène *cadA* chez *Shigella* entraînait une diminution de la production d'enterotoxine. Le gène *cadA* présente donc toutes les caractéristiques du gène d'antivirulence.

Dans certains cas, les mutations pathoadaptatives permettent à la bactérie d'exprimer les gènes uniquement dans un certain contexte environnemental. Un exemple de mutations pathoadaptatives est le niveau d'expression de gènes de virulence chez *Shigella*. La bactérie pathogène a acquis des gènes de virulence (sur un plasmide) qui sont sous le contrôle d'un régulateur présent dans la souche ancestrale et dont la régulation dépend de la température (activé à 37°C et inhibé à des températures plus basses). Ainsi les gènes de virulence sont exprimés que lorsque la température s'approche de 37°C, soit la température à laquelle la bactérie est dans l'hôte. Ainsi elle n'exprime les gènes de virulence que lorsqu'elle est dans l'hôte.

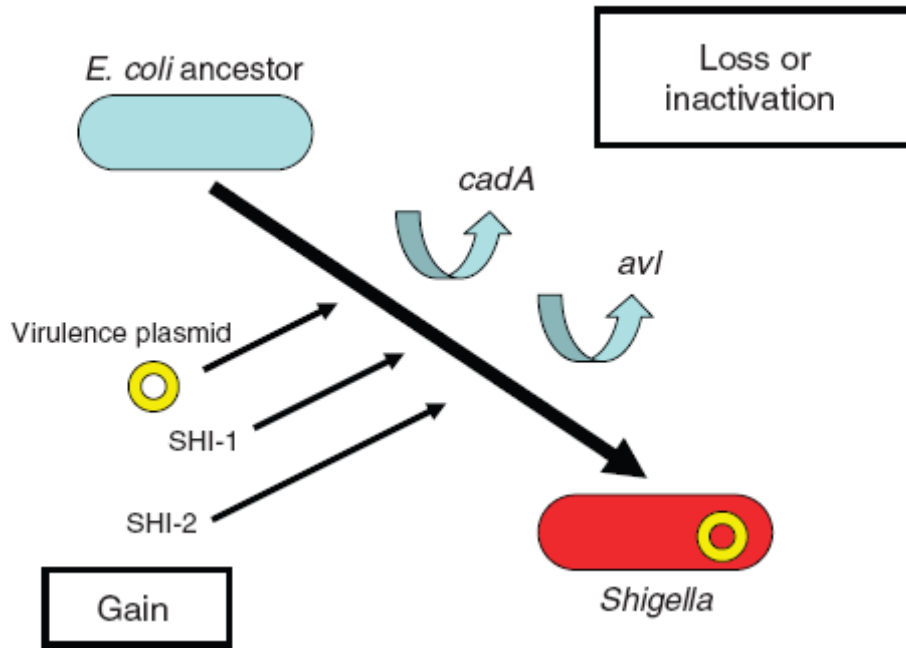


Figure 9 : Modèle d'évolution de *Shigella* depuis son ancêtre *E. coli* (Maurelli, 2007).

Des transferts de gènes horizontaux et des mutations pathoadaptatives sont représentés. SHI-1 et SHI-2 sont des îlots de pathogénicité acquis par *Shigella* et se localisent sur le chromosome. *cadA* et *avl* représente les gènes d'antivirulence codant la lysine décarboxylase et une protéine encore inconnue.

Les pathogènes évoluent donc par différentes étapes successives qui peuvent être des acquisitions de gènes de virulence par transferts horizontaux et mutations pathoadaptatives qui engendrent l'inactivation ou la perte d'expression de gènes incompatibles avec la virulence (gène d'antivirulence). La virulence est donc le résultat complexe de l'expression des gènes de virulence et de l'inhibition de l'expression des gènes d'antivirulence.

B. Les glucanes périplasmiques osmorégulés : les OPG

Les OPG sont des oligosaccharides présents chez la majorité des entérobactéries. Ils représentent de 0,5% (à haute osmolarité) à 5% (à faible osmolarité) du poids sec des bactéries. A ce jour, les OPG sont le seul élément périplasmique connu dont la synthèse est induite à faible osmolarité.

1. Les OPG : structure des familles

Les OPG sont présents chez de nombreuses espèces bactériennes, leur structure présente plusieurs points communs :

- Le seul sucre constituant les OPG est le D-glucose.
- Les unités de glucose sont majoritairement liées par des liaisons β -glycosidiques.
- Le nombre d'unité de glucose est limité : de 5 à 24 résidus
- La concentration des OPG dans le périplasma augmente en réponse à une diminution de l'osmolarité du milieu extérieur.

Le squelette glycosidique peut être décoré de différents substituants en fonction de l'espèce.

Ils appartiennent à deux classes :

- Des substituants originaires des phospholipides de la membrane comme le phosphoglycérol, la phosphoéthanolamine, ou la phosphocoline.
- Des substituants originaires du métabolisme intermédiaire comme l'acétyl, le succinyle ou le méthylmalonyl. Pour cette classe, l'acyl-coenzyme A semble devoir être la molécule donatrice.

La structure des OPG a été décrite pour plusieurs bactéries des subdivisions α , β et γ des protéobactéries. Les OPG sont ainsi divisés en 4 familles structurales dont la classification a été effectuée sur la base de l'organisation du squelette glucidique (Bohin, 2000).

a) La famille I

Les OPG de la famille I sont retrouvés chez *E. coli* (Kennedy, 1996), *Pseudomonas syringae* (Talaga et coll., 1994), *Erwinia chrysanthemi* (Cogez et coll., 2001), *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (F. Norel, V. Robbe-Saule, A. Bohin et J.-P. Bohin, résultats non publiés) et *P. aeruginosa* (Y. Lequette et coll., 2007). Les structures des OPG de ces espèces sont très similaires. Chez *E. coli*, les OPG sont hétérogènes en taille : de 5 à 12 résidus de glucose et dont les espèces les plus représentées comportent 8 ou 9 glucoses (Figure 10). Le

squelette est formé par une chaîne linéaire de glucoses liés en β -1,2 et présentant des ramifications liées en β -1,6. L'hétérogénéité des OPG est accentuée par l'hétérogénéité des substituants venant s'y greffer. En effet, les OPG d' *E. coli* sont substitués par du phosphoglycérol, de la phosphoéthanolamine et du succinate (Kennedy, 1996), ceux d'*E. chrysanthemi* sont plus faiblement substitués et uniquement par du succinate et de l'acétate (Cogez et coll., 2001) alors que ceux de *P. syringae* ne sont pas du tout substitués (Talaga et coll., 1994). Chez *S. enterica*, le succinate est le substituant majeur.

b) La famille II

Les OPG de la famille II sont retrouvés chez plusieurs membres des Rhizobiacées *abortus* (Breedveld et Miller, 1994) comme *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou encore *Brucella* (Briones et coll., 1997; Choma et Komaniecka, 2003). Ils sont cycliques et se composent de 17 à 25 résidus de glucose liés en β -1,2 (Figure 10). Ils peuvent être substitués majoritairement par du phosphoglycérol mais également par du succinate et du méthylmalonate. Le degré de substitution peut varier fortement parmi ces espèces.

c) La famille III

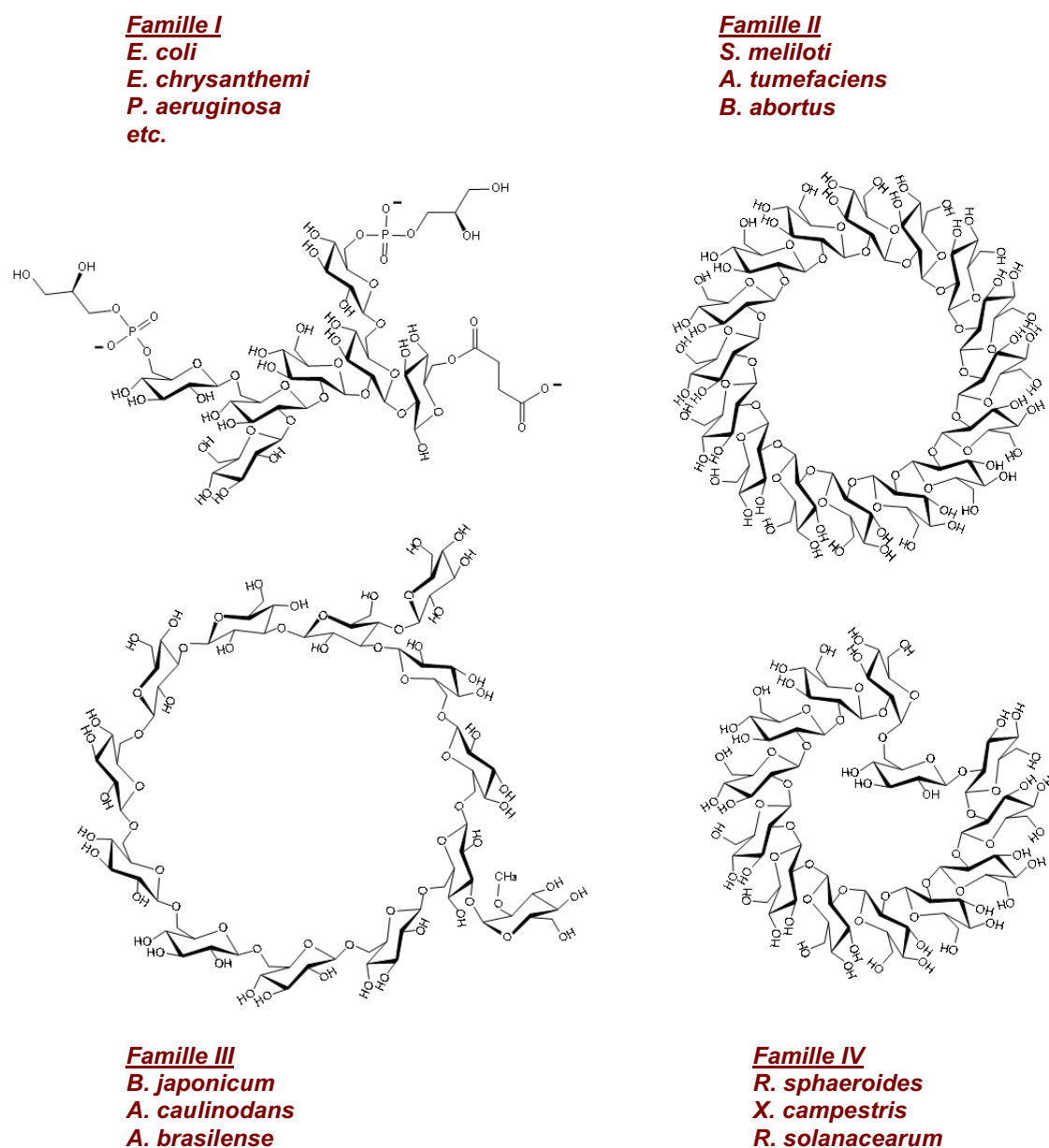
Les premiers OPG décrits pour cette famille sont ceux de *Bradyrhizobium japonicum* (appartenant à la famille des Rhizobiacées). Ils comprennent 10 à 13 glucoses et sont cycliques grâce aux liaisons β -1,6 et β -1,3 (Rolin et coll., 1992; Breedveld et Miller, 1994). Les OPG représentés sur la figure 10 sont ceux de *Azospirillum brasilense* (Altabe et coll., 1994) (Figure 10). Des OPG très similaires ont été retrouvés chez *Azorhizobium caulinodans* (Komaniecka et Choma, 2003). Les OPG de cette famille sont majoritairement non chargés mais les OPG de *Bradyrhizobium japonicum* peuvent tout de même être substitués par de la phosphocholine (Rolin et coll., 1992).

d) La famille IV

Ils sont retrouvés chez *Ralstonia solanacearum* (Talaga et coll., 1996), *Xanthomonas campestris* (York, 1995, Talaga et coll., 1996) et *Rhodobacter sphaeroides* (Talaga et coll., 2002). Ils sont cycliques et peuvent posséder 3 degrés de polymérisation selon l'espèce: 13, 16 et 18 résidus de glucose liés en β -1,2 et une liaison en α -1,6 permet de conférer aux OPG cette structure cyclique (Figure 10). Les OPG de *X. campestris* et de *R. solanacearum* ne sont

pas substitués contrairement à ceux de *R. sphaeroides* qui peuvent présenter de 1 à 7 succinyl et 1 à 2 acetyl.

Ainsi les OPG sont très hétérogènes parmi les espèces bactériennes, puisqu'ils diffèrent par leur taille, par la structure du squelette glucidique, par le nombre et la nature des substituants.



4 familles d'OPG

Figure 10 : Représentation des quatre familles d'OPG (de I à IV) (Bohin et Lacroix, 2007).

- OpgH est une protéine de 97 kDa, localisée dans la membrane interne et présentant une activité glucosyltransférase (Weissborn et Kennedy, 1984). Elle possède 8 segments transmembranaires et 3 grandes régions cytoplasmiques. Il a ainsi été postulé que ces segments transmembranaires forment un canal pour la translocation de la chaîne glucidique naissante vers le périplasma (Debarbieux et *coll.*, 1997).
- Le squelette linéaire naissant serait ensuite pris en charge par la protéine périplasmique OpgG (56 kDa). OpgG est sécrétée du cytoplasme vers le périplasma par le système Sec (Loubens et *coll.*, 1993). Il a été envisagé que cette protéine interviendrait dans la translocation des OPG vers le périplasma grâce à une interaction avec OpgH et aurait un rôle dans le branchement des OPG (Rollet, 2006).
- Chez *E. coli* (et non chez *E. chrysanthemi*), une troisième protéine OpgD est présente. *opgD* est le paralogue d'*opgG*. A la différence d'OpgG, la protéine OpgD possède une séquence signal caractéristique du système TAT (Lequette et *coll.*, 2004). Un mutant *opgD* présente des OPG avec un squelette glucidique altéré avec un degré de polymérisation plus élevé. OpgD semble donc être impliquée dans la régulation de la biosynthèse (Lequette et *coll.*, 2004).
- Chez *E. coli*, la substitution par le succinate est assurée par OpgC (Lacroix et *coll.*, 1999), la substitution par le phosphoglycerol est assurée par OpgB et OpgB' codés par le même gène (Lequette et *coll.*, 2008). Le gène de la protéine OpgE codant une phosphoethanolamine transferase (permettant la substitution par la phosphoéthanolamine) a été récemment identifié (Virginie Coge, communication personnelle).
- Chez *E. chrysanthemi*, seuls les gènes *opgG* et *opgH* sont présents. Les OPG sont substitués par des acétyles et des succinyles. Cependant aucun gène codant les protéines impliquées n'ont encore pu être identifiés, et aucun gène homologue d'*opgC* d'*E. coli* n'a pu être retrouvé dans le génome d'*E. chrysanthemi*.
- La biosynthèse des OPG est régulée par l'osmolarité chez de nombreuses protéobactéries (Bohin, 2000). En général, la quantité d'OPG augmente lorsque l'osmolarité diminue. Chez *E. coli*, ils représentent de 0,5% (à haute osmolarité) à 5% (à faible osmolarité) du poids sec des bactéries. La régulation osmotique a lieu à un niveau transcriptionnel et/ou post traductionnel. Indépendamment de l'osmorégulation, il a été observé un rétrocontrôle du produit final (Bohin et Lacroix, 2007).
- Chez *E. coli*, les gènes *opgG* et *opgH* font partie du régulon σ^E , facteur alternatif impliqué dans la réponse au stress. Cette voie est surtout activée lors de la présence

dans le périplasma de protéines de l'enveloppe mal conformées apparues suite à diverses conditions (chaleur, éthanol, surexpression de OMP...) (Raivio et Silhavy, 2001).

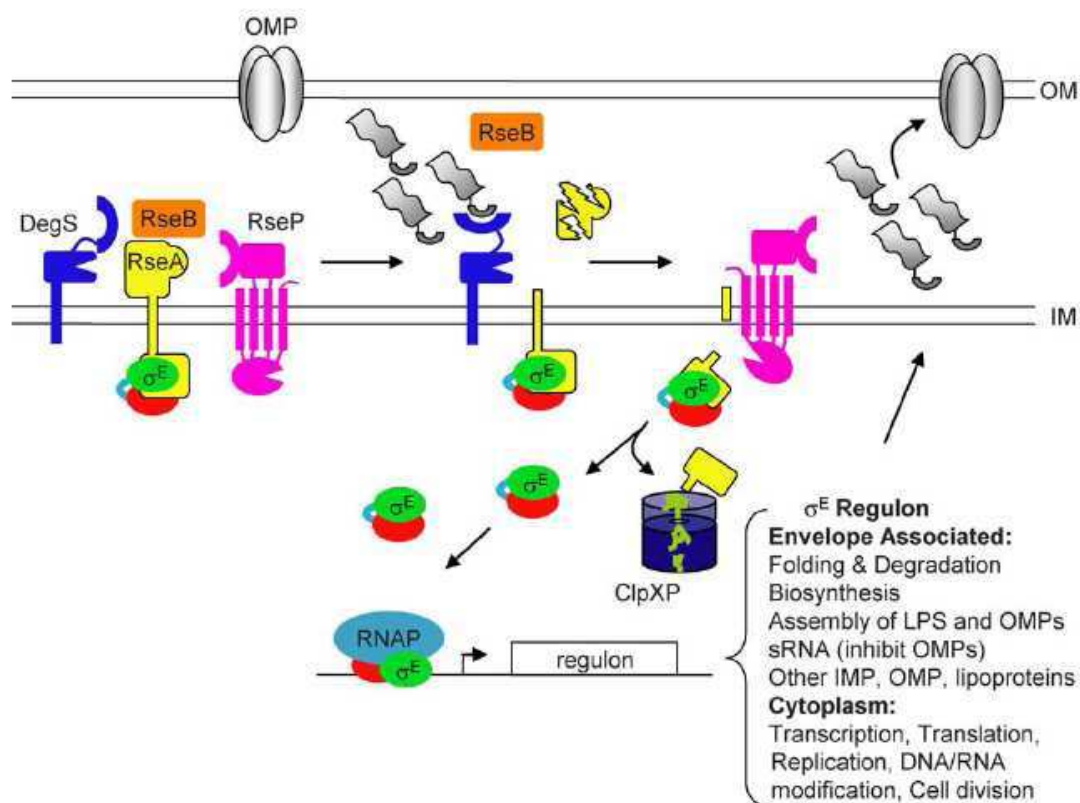


Figure 12: La réponse au stress extracytoplasmique dépendante de σ^E (Hayden et Ades, 2008).

Le facteur σ^E est contrôlé par le facteur antisigma RseA, protéine de la membrane interne avec un domaine cytoplasmique qui interagit avec σ^E et un domaine périplasmique qui interagit avec la protéine périplasmique RseB (figure 12). La séquestration de σ^E au niveau de la membrane interne par RseA le rend inactif. RseB interagit avec le domaine périplasmique de RseA pour protéger RseA de la protéolyse en absence de stress. Les OMP mal conformées vont activer la protéase DegS qui va cliver le domaine périplasmique de RseA. La protéine RseA partiellement dégradée devient le substrat de la protéase RseP qui va cliver la partie cytoplasmique de RseA, libérant un complexe composé du facteur σ^E et de la partie cytoplasmique de RseA. La partie cytoplasmique de RseA est dégradée par ClpXP permettant de libérer le facteur σ^E qui va interagir avec l'ARN polymérase pour activer la transcription de nombreux gènes. Les gènes activés par cette voie sont notamment des gènes impliqués dans la synthèse du LPS, des gènes codant des protéines chaperons (*fkpA*, *surA*, *degP*, *skp*), les gènes *rpoErseABC* codant le facteur σ^E et ses régulateurs, les gènes *opgG* et *opgH* (Dartigalongue et coll., 2001 ; Rhodius et coll., 2006 ; Hayden et Ades, 2008).

3. Rôle et impact sur la virulence

Les mutants déficients dans la synthèse des OPG ont été obtenus pendant la recherche de mutants affectés dans la virulence (présentant une virulence atténuée ou une non virulence vis-à-vis de leur plante ou animal hôte). En effet, des mutants incapables de synthétiser des OPG chez *Agrobacterium tumefaciens* (Puvanesarajah et coll., 1985), chez *Pseudomonas syringae* (Loubens et coll., 1993) et chez *Xanthomonas campestris* (Minsavage et coll., 2004) sont complètement ou sévèrement affectés dans la virulence vis-à-vis de leurs plantes hôtes. De plus, il a été montré, chez *Yersinia enterocolitica*, qu'*opgH* était requis au stade précoce de l'infection (Young et Miller, 1997). Il a également été montré que des mutants *opgH* isolés par mutagenèse aléatoire chez *Pseudomonas aeruginosa* PA14 présentent une virulence réduite chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Mahajan-Miklos et coll., 1999). Enfin, les OPG sont nécessaires à la survie de *Brucella abortus* dans les macrophages et les cellules épithéliales en empêchant la formation du phagolysosome (Arellano-Reynoso et coll., 2005). Chez *E. chrysanthemi*, une mutation *opg* se traduisant par l'absence de synthèse d'OPG entraîne un phénotype pléiotrope caractérisé par :

- la perte de la virulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive.
- la diminution de la synthèse et de la sécrétion d'exoenzymes (pectate-lyase, cellulases, protéases)
- un aspect muqueux des colonies dû à la surproduction d'exopolysaccharides engendrée par une augmentation de l'expression des gènes *eps*
- la diminution de la motilité
- une hypersensibilité aux sels biliaires

Le mutant *opg* présente également un trouble dans la division cellulaire puisque lorsqu'elles sont cultivées en bouillon de culture (LB), elles sont de plus petites tailles et plus rondes que la souche sauvage, alors qu'en milieu minimum, elles filamentent (Franck Bouchart, communication personnelle).

La perte de virulence du mutant *opg* d'*E. chrysanthemi* ne peut s'expliquer par la diminution de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes puisqu'un mutant *outS* (ne présentant plus le système de transport (type II) impliqué dans la sécrétion des exoenzymes) présente une virulence seulement diminuée. De plus, une expérience de coinoculation in planta d'une souche sauvage et d'un mutant *opg* ne permet pas le développement de la souche *opg*. Le mutant *opg* est donc incapable de croître même dans un tissu macéré (Page et coll., 2001). La membrane externe d'*E. chrysanthemi* semble relativement perméable et laisserait échapper

des OPG dans le milieu (Cogez et *coll.*, 2001). L'expérience de coinoculation démontre donc que les OPG doivent impérativement être dans le périplasme pour pouvoir jouer leur rôle. Une conclusion similaire avait été tirée lors de l'étude de mutants *opg* de la famille des *Rhizobiaceae*, puisque l'ajout d'OPG purifiés à un inoculum de mutant *opg* ne permettait pas la restauration de l'attachement, de la virulence ou de la symbiose (Bohin et Lacroix, 2007). Les OPG sont donc un composant essentiel dans l'enveloppe bactérienne requis pour la virulence ou la symbiose. Cependant le rôle exact des OPG reste à déterminer. Plusieurs hypothèses ont alors été envisagées :

- Kennedy a proposé que les OPG seraient des osmoprotecteurs du fait de leur charge en participant au maintien du potentiel de Donnan (Kennedy, 1982).
- Les phénotypes montrent que la structure de l'enveloppe semble altérée par l'absence des OPG. Il a ainsi été suggéré que les OPG joueraient un rôle structural en permettant de préserver l'intégrité de l'enveloppe bactérienne en interagissant avec le peptidoglycane et/ou les phospholipides (Banta et *coll.*, 1998).
- Les OPG pourraient également jouer un rôle informationnel en interagissant avec d'autres composants périplasmiques. En effet, il a été proposé chez *E. coli* que les OPG seraient le signal capté par les capteurs de systèmes à deux composants présent dans la membrane interne : EnvZ (Fiedler et Rotering, 1988) et RcsC (Ebel et *coll.*, 1997). Chez *E. chrysanthemi*, les phénotypes observés chez le mutant *opg* (aspect muqueux, défaut de motilité, problème de division cellulaire) pourraient résulter d'une activation du système à deux composants RcsCDB (voir le chapitre D : le phosphorelais Rcs).

Afin de caractériser le rôle des OPG, deux approches ont été effectuées au sein du laboratoire : une première approche protéomique et une approche génétique.

- L'approche protéomique (Bouchart et *coll.*, 2007) a permis la comparaison du protéome soluble du mutant *opg* avec celui de la souche sauvage. En plus des phénotypes décrits, le mutant *opg* présente une forte perturbation du métabolisme général de la bactérie avec une augmentation du catabolisme traduisant un besoin accru en énergie. Cela a déjà été observé chez des bactéries lors de divers stress tels que le stress osmotique (Prasad et *coll.*, 2003). Une surexpression de protéines impliquées dans la mise en conformation et la dégradation des protéines a également été montrée. Ainsi cette approche a donc permis de montrer que la bactérie *opg* induit une réponse au stress et que la perte de virulence pourrait résulter de la combinaison des changements de structure de l'enveloppe et des modifications du métabolisme cellulaire.

- L'approche génétique a consisté en la recherche de mutations permettant la suppression du phénotype *opg*. Pour cela, une mutagenèse à la N-méthyl N'nitro N-nitrosoguanidine (NTG) de la souche *opgG* a été effectuée. Franck Bouchart a recherché des bactéries ayant une restauration de la motilité. Après avoir isolé des clones, il a ensuite analysé les autres phénotypes testés pour le mutant *opgG*. Il s'est intéressé particulièrement à un clone dont la mutation permettait de restaurer la quasi-totalité des phénotypes sauvages : restauration de la motilité, absence de mucosité, restauration partielle de la résistance aux sels biliaries, restauration de la sécrétion des exoenzymes, restauration de la virulence sur tubercules de pomme de terre mais pas sur feuilles d'endive. La mutation a ensuite été localisée dans le gène *rscC* : *rscC2*. Le gène *rscC* est un gène présent dans un locus de 3 gènes : *rscC-rscBD*. Ce locus code un système à deux composants.

C. Les systèmes à deux composants et les phosphorelais

Les systèmes à deux composants sont également appelés les systèmes capteurs-régulateurs. Ils permettent la transduction d'une information (stimulus perçu) pour obtenir une réponse adaptative.

1. Structure

Les bactéries sont dans la nature confrontées à de nombreuses variations environnementales. Afin de s'adapter au mieux à leur environnement, elles ont développé des systèmes à deux composants. Ils comprennent un **capteur** (HK), le plus souvent dans la membrane interne avec une boucle périplasmique, et un **régulateur** transcriptionnel (RR) dans le cytoplasme permettant une activation ou une répression transcriptionnelle de gènes cibles dont les produits sont impliqués dans cette adaptation. Les gènes codant le capteur et le régulateur sont le plus souvent organisés en opéron. *E. coli* présente 30 protéines HK et 34 protéines RR (Yamamoto et coll., 2005). Pour notre modèle d'étude *E. chrysanthemi*, 32 systèmes ont été annotés dont 4 spécifiques (Bohin JP, communication personnelle).

a) Le capteur

Il est généralement dans la membrane interne (figure 13a). Il est composé de deux segments transmembranaires délimitant un segment périplasmique (N-terminal) nécessaire à la reconnaissance du signal et un domaine Histidine kinase cytoplasmique (C-terminal). Le domaine cytoplasmique se divise en 2 parties, le premier sous domaine fixe l'ATP et permet l'autophosphorylation d'une histidine conservée au niveau du deuxième sous domaine, le domaine phosphotransférase de la kinase. Ces capteurs fonctionnent en dimère, la dimérisation est nécessaire pour le bon fonctionnement du capteur, cela a été montré pour EnvZ chez *E. coli* (Cai et Inouye, 2003).

Parfois le capteur peut posséder d'autres domaines modulant son activité, comme le domaine PAS ou le domaine HAMP, localisés dans la région charnière entre le deuxième segment transmembranaire (TM2) et le domaine kinase.

b) Le régulateur

Il possède deux domaines, le domaine récepteur qui contient un résidu d'aspartate phosphorylable et le domaine régulateur, responsable de la reconnaissance des séquences

opératrices des gènes cibles et donc de l'activation ou de la répression transcriptionnelle (figure 13a). Le régulateur est phosphorylé ou déphosphorylé par le capteur, le groupement phosphate provenant alors du résidu histidine du capteur. La variation de phosphorylation du régulateur permet la modulation de son activité. En effet, la phosphorylation va engendrer un changement de conformation permettant une meilleure interaction avec l'ADN.

c) Les phosphorelais

Dans certains cas, une version plus complexe des systèmes à deux composants implique un phosphotransfert multiple ($\text{His1} \rightarrow \text{Asp1} \rightarrow \text{His2} \rightarrow \text{Asp2}$), ils sont alors appelés les phosphorelais (figure 13b). Cela implique donc la présence d'autres domaines constitués d'un domaine receveur comme celui du régulateur avec un aspartate (D1) et un domaine Hpt (Histidine-containing phosphotransfer) contenant le résidu histidine (H2). Dans la plupart des cas, le capteur contient une histidine (H1) et un aspartate (D1). L'histidine H2 est au niveau du domaine Hpt d'une protéine supplémentaire intervenant entre le capteur et le régulateur. Nous développerons un exemple avec le phosphorelais Rcs (Cf. chapitre D : Le phosphorelais Rcs).

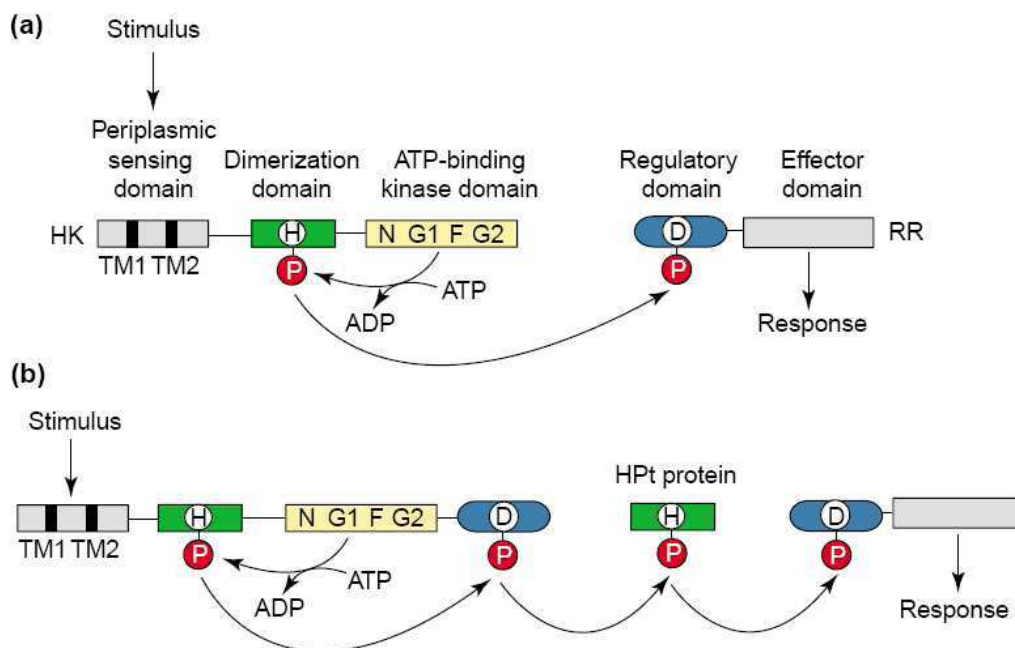


Figure 13 : Représentation des différents domaines des protéines constituant les systèmes à deux composants et les phosphorelais. (a) Système à deux composants typique constitué d'un capteur dimérique (HK) et d'un régulateur cytoplasmique (RR). Le monomère représenté possède des domaines transmembranaires (TM1 et TM2) permettant de délimiter une région périplasmique. L'HK catalyse l'autophosphorylation ATP dépendante sur un résidu histidine H1 conservé. Le phosphate (P) est transféré sur un résidu Aspartate (D) du domaine régulateur du RR, modulant ainsi sa capacité de fixation à l'ADN des gènes cibles. (b) Le phosphorelais nécessite des domaines supplémentaires par rapport aux systèmes à deux composants, comme un domaine comportant un aspartate en C-terminal du capteur ainsi qu'un domaine Hpt présent sur une protéine intermédiaire (West & Stock, 2001).

2. La perception du signal

Mascher a répertorié trois mécanismes différents de la perception du signal (Mascher et *coll.*, 2006). Tout d'abord, le plus courant, la perception du signal se fait au niveau des boucles périplasmiques du capteur (figure 14A). La perception du signal par le capteur peut également se faire au niveau des domaines transmembranaires de celui-ci (figure 14B). Enfin, il a répertorié la perception d'un signal cytoplasmique par le capteur qui peut être soluble ou ancré dans la membrane (figure 14C).

Chez *E. chrysanthemi*, parmi les 32 systèmes à deux composants prédits, 2 présentent un capteur cytoplasmique (Bohin JP, communication personnelle).

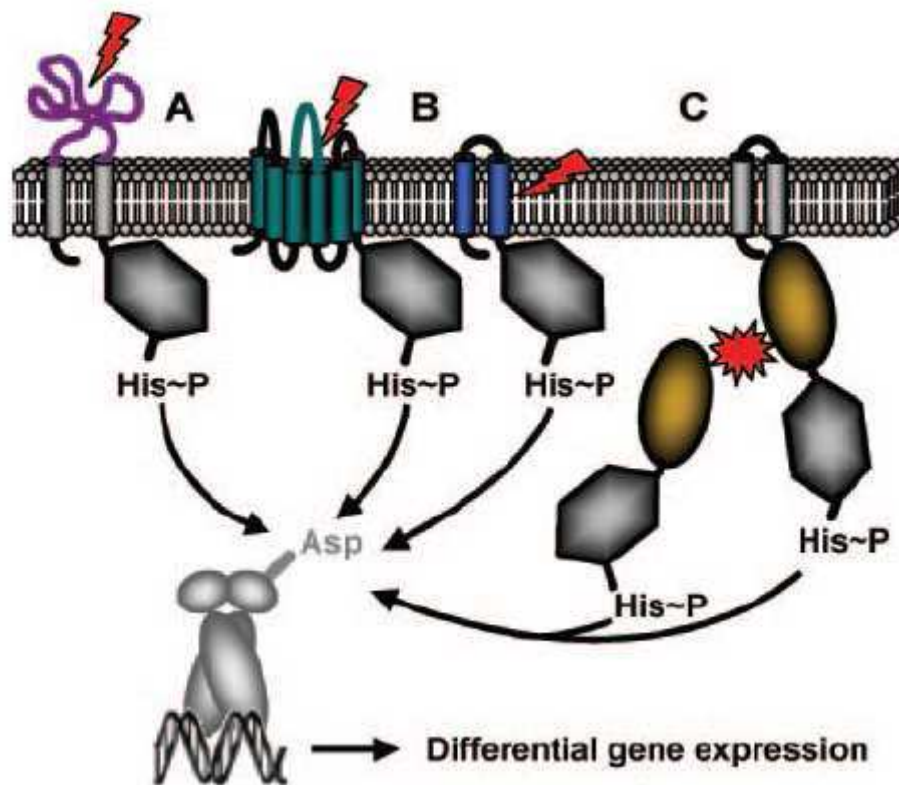


Figure 14 : Représentation schématique des trois différents mécanismes de la perception du signal (Mascher et al, 2006). (A) HK percevant le signal dans le périplasma. (B) HK avec des régions transmembranaires permettant la perception du signal. (C) HK percevant un signal cytoplasmique, le capteur peut être soluble ou ancré dans la membrane. Le stimulus est représenté en rouge (flèche ou étoile) et les protéines interagissant avec le stimulus sont en couleur.

3. Le paradigme EnvZ-OmpR

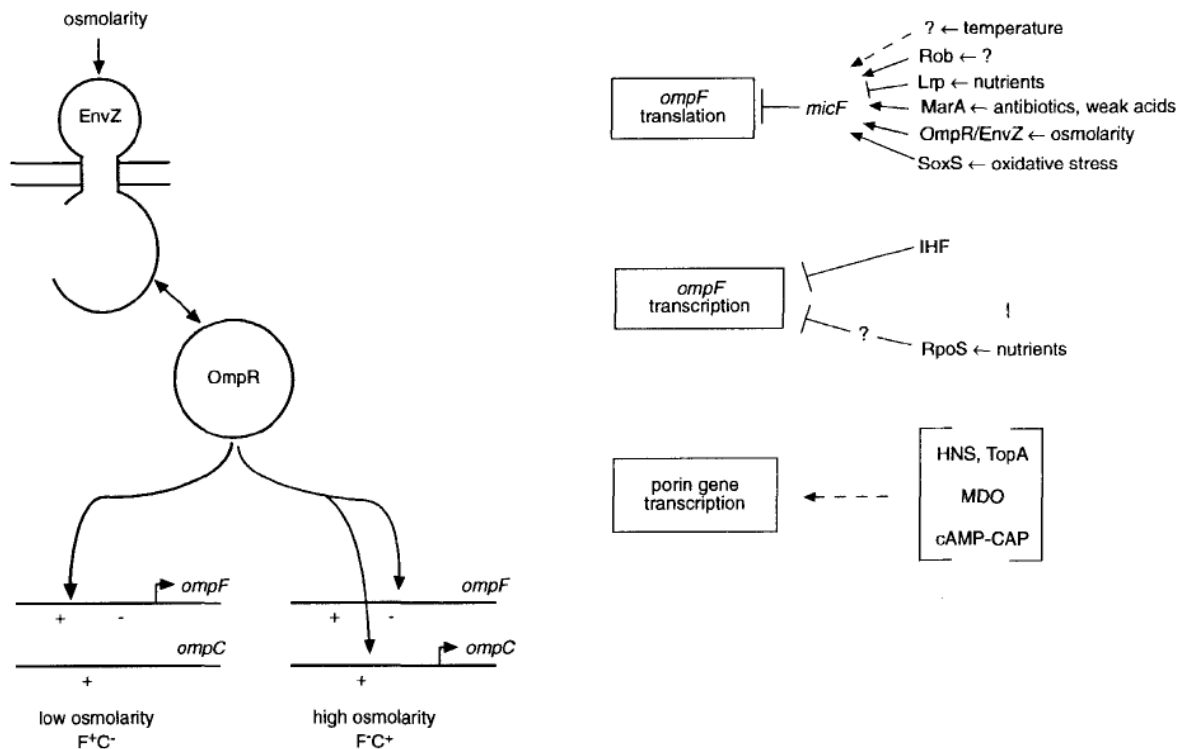


Figure 15 : Régulation de *ompF* et *ompC* par le système à deux composants EnvZ-OmpR et par les facteurs environnementaux (Pratt et coll., 1996).

Chez *E. coli*, l'expression de 2 porines majeures (OmpC et OmpF) est régulée par les paramètres environnementaux et par d'autres facteurs. OmpC est une porine dont les pores sont plus grands que ceux de OmpF. Le système à deux composants EnvZ/OmpR contrôle la transcription des gènes *ompC* et *ompF* en réponse à l'osmolarité. EnvZ étant le capteur et OmpR le régulateur transcriptionnel. Il existe également un ARN antisens MicF qui influence la transcription de *ompF*.

La régulation s'effectue en fonction de l'osmolarité (figure 15 et 16):

- A faible osmolarité, on observe une phosphorylation faible du capteur EnvZ qui va donc phosphoryler faiblement le régulateur OmpR. OmpR-P va se fixer aux sites de forte affinité des promoteurs de *ompF* pour l'activer.
- A forte osmolarité, on observe une phosphorylation du capteur EnvZ qui va phosphoryler le régulateur OmpR. OmpR-P va se fixer aux sites de forte et faible affinité des promoteurs de *ompF* et *ompC*. On observe alors une répression de la transcription de *ompF*, activation de la transcription de *ompC*. La répression de *ompF* à haute osmolarité est facilitée par le domaine IHF puisqu'il facilite la courbure de

l'ADN pour empêcher la transcription. On a également une augmentation de la transcription de *micF* : un ARN complémentaire de l'ARN de *ompF* (répression de *ompF*).

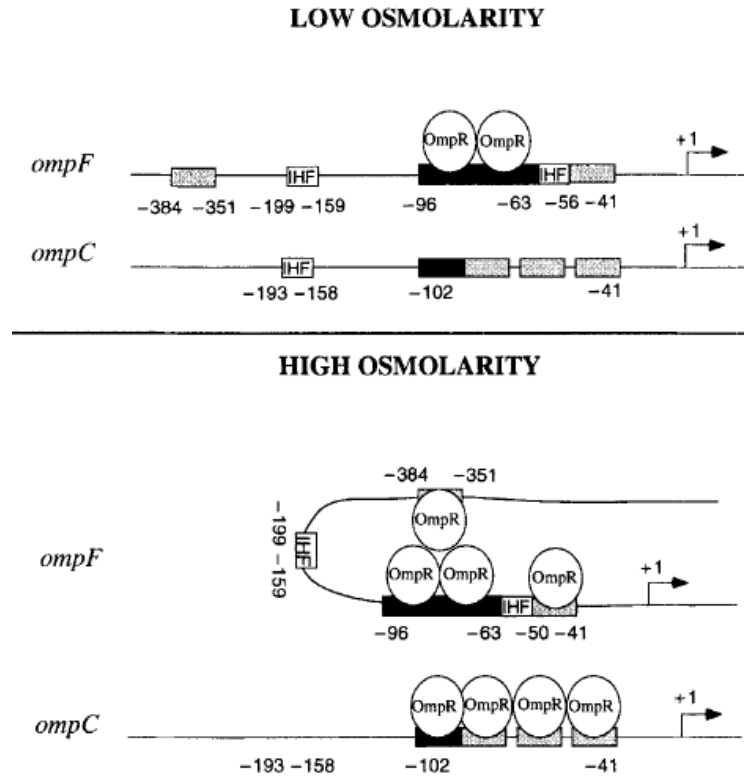


Figure 16 : Régulation de la transcription de *ompF* et *ompC* par OmpR (Pratt et coll., 1996).

OmpF est donc synthétisée à faible osmolarité. C'est la forme majoritaire quand la bactérie est à l'extérieur. Cette porine permet la pénétration des substrats présents dans les solutions rencontrées. Alors que OmpC est synthétisée à forte osmolarité. C'est la forme majoritaire quand la bactérie est dans l'intestin et elle permet l'exclusion de nombreuses molécules toxiques rencontrées dans l'intestin.

4. Une réponse graduée

Un moyen qu'ont les bactéries de s'adapter au milieu est de réguler l'expression des gènes. Nous venons de voir que les systèmes à deux composants sont impliqués dans cette régulation. Le régulateur phosphorylé va interagir avec les régions régulatrices des gènes cibles afin d'activer ou d'inhiber ceux-ci. Le retour au niveau initial va nécessiter la déphosphorylation du régulateur. Pour cela, la déphosphorylation peut s'effectuer par la protéine portant également l'activité kinase, on dit alors que le système est bifonctionnel,

sinon la déphosphorylation est effectuée par une phosphatase distincte, le système est alors monofonctionnel (Figure 17). Le plus fréquemment, le capteur est bifonctionnel, il est alors capable, quand il est non phosphorylé de déphosphoryler le régulateur. Cette activité phosphatase peut également être modulée par les signaux environnementaux. Il a été trouvé que les systèmes à deux composants bifonctionnels sont plus efficaces pour amplifier le signal pour limiter les signaux parasites (réactions croisées) et pour amortir le rétrocontrôle. Par contre, un système à deux composants monofonctionnel est plus efficace pour intégrer les signaux de différentes sources (Igoshin et *coll.*, 2008).

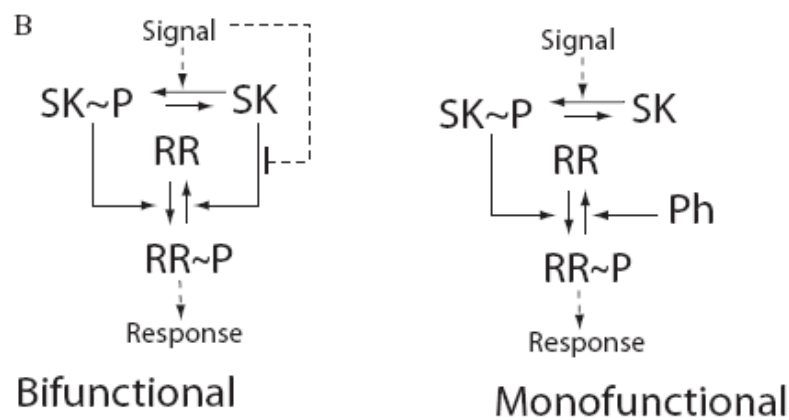


Figure 17 : Représentation de la phosphorylation et de la déphosphorylation des systèmes à deux composants (Igoshin et *coll.*, 2008).

Un modèle mathématique a été établi en utilisant le système à deux composants EnvZ OmpR pour tester la réponse graduée et la bistabilité (Igoshin et *coll.*, 2008).

Les cellules répondent aux changements d'un signal d'une manière graduée (trait continu) (figure 18). Cependant une analyse plus poussée a montré l'existence d'un seuil en dessous duquel le signal est trop faible pour produire une réponse significative : « signal ON » (trait discontinu montant), le même phénomène est observé pour la perte de réponse avec un seuil à partir duquel la réponse ne sera plus significative (trait discontinu descendant). Ainsi dans une population, au lieu d'avoir une réponse graduée pour toutes les bactéries, on a une population bi-modale avec deux populations dans un état stable avec des réponses différentes. On s'attend alors à un phénomène d'hystérésis : le chemin « ON » et le chemin « OFF » ne sont pas confondus à cause du seuil différent des deux chemins. La réponse observée est donc la somme des différents états dans la population.

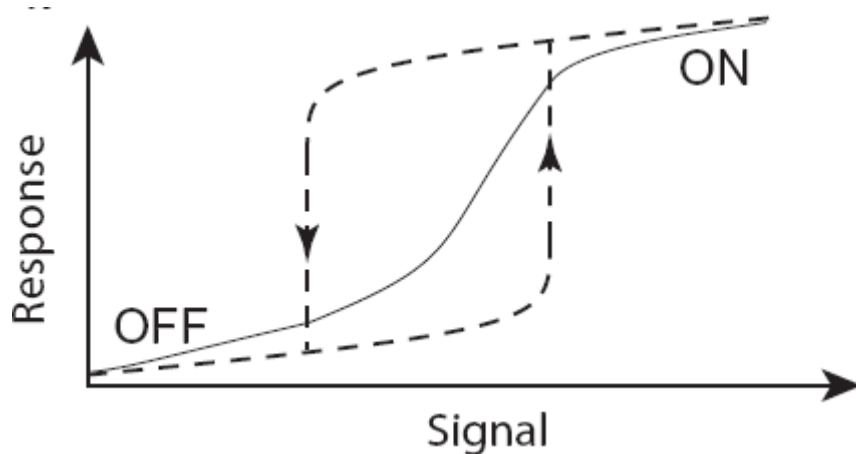


Figure 18 : Réponse observée suite à un signal (Igoshin et *coll.*, 2008).

Grâce à cette bistabilité, il y a en permanence dans la population des bactéries qui sont susceptibles de pouvoir s'adapter à des variations environnementales, ces bactéries ne sont pas les mieux adaptées pour le contexte actuel mais seraient adaptées à anticiper un contexte ultérieur. La bistabilité est donc un processus épigénétique qui permet à des cellules avec un même génome d'exprimer en réponse aux mêmes informations des états différents.

5. Rôle dans la virulence

De nombreux systèmes à deux composants sont connus pour affecter la virulence des bactéries. Le tableau 1 présente une liste de systèmes à deux composants dont on a montré qu'ils étaient impliqués dans la virulence chez diverses bactéries pathogènes.

TCSs contributing to bacterial virulence regulation			
Organism	TCS	Presumptive stimulus	Regulation of, or effect of inactivation
<i>S. enterica</i>	PhoP-PhoQ	Mg ²⁺ /Ca ²⁺	Mg ²⁺ uptake, modification of LPS, resistance to antimicrobial peptides, <i>pmrD</i> , transcriptional regulator genes <i>ssrB</i> , <i>hilA</i> , <i>slyA</i> , other virulence related genes post-transcriptional regulation of SsrA
	PmrA-PmrB	Fe ³⁺	Lipid A modification
	RcsC-YojN-RcsB	Desiccation, osmotic shock, growth on solid surfaces; specific <i>in vivo</i> stimulus unknown	Colonic acid capsule synthesis, <i>ftsA</i> , <i>osmC</i> , motility and chemotaxis genes, <i>fhfDC</i> , <i>tviA</i> , <i>rprA</i>
	OmpR-EnvZ	Osmolarity	Porin genes, <i>ssrB-ssrA</i> , stationary phase acid response
	SsrB-SsrA	ND	SPI-2 TTSS and effector genes
<i>Shigella flexneri</i> <i>S. sonnei</i>	SirA-BarA	ND	<i>csrB</i> , <i>hiiD</i>
	OmpR-EnvZ	ND	Invasion genes
<i>Vibrio cholerae</i>	CpxR-CpxA	pH?	Virulence regulator gene <i>virF</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	ArcA-ArcB	ND	Virulence regulator gene <i>toxT</i>
	FlgR-FlgS	ND	Flagellar genes
<i>Campylobacter jejuni</i>	ArsR-ArsS	Low pH	Urease and other acid-resistance genes
	DccR-DccS	ND	Colonization defect
<i>Legionella pneumophila</i>	CpxR-CpxA	ND	<i>icmR</i> and other <i>icm-dot</i> genes, no effect on intracellular replication in amoeba and human macrophages
<i>Yersinia pseudo-tuberculosis</i>	LetA-LetS	ND	Growth defect in amoeba, but not in human macrophages
	PhoP	ND	Virulence attenuation, reduced survival in macrophages
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AlgR-FimS	ND	Alginate biosynthesis, twitching motility
	AlgB-KinB	ND	Alginate biosynthesis
	RocA1-RocS1 (SadR-SadS)	ND	Fimbrial genes, biofilm maturation
	PprB-PrpA	ND	Virulence genes and cell motility, QS signal production
	RtsM (RetS)	ND	TTSS and effector genes
<i>Brucella abortus</i>	BvrR-BvrS	ND	<i>omp</i> genes, virulence attenuation, reduced invasiveness in macrophages and HeLa cells
<i>Neisseria meningitidis</i>	MisR-MisS	ND	Composition of LOS inner core
<i>B. pertussis</i>	BvgA-BvgS	Temperature, redox state of quinones, SO ₄ ²⁻ , nicotinic acid	Toxin and adhesin expression, biofilm formation
<i>Listeria monocytogenes</i>	DegU	ND	Virulence attenuation
	VirR-VirS	ND	Virulence attenuation
	AgrA-AgrC	ND	Virulence attenuation
	LisR-LisK	ND	Virulence attenuation
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DevR-DevS	ND	Virulence attenuation
	MprA-MprB	ND	Virulence attenuation
	RegX3-SenX3	ND	Virulence attenuation
	PrrA-PrrB	ND	Intracellular growth defect during the early stages of macrophage infection
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CiaR-CiaH	ND	Virulence relevant gene <i>htrA</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	RR04-HK04	ND	Virulence genes <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaA</i>
	RR06-HK06	ND	Virulence gene <i>cbpA</i>
	RitR	ND	Iron homeostasis
	MicA-MicB	Oxygen?	Virulence attenuation
	CsrR-CsrS (CovR-CovS)	Mg ²⁺	Capsule synthesis, virulence genes <i>ska</i> , <i>sagA</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CsrR-CsrS (CovR-CovS)	ND	Virulence attenuation
<i>S. mutans</i>	SMRR11-SMHK11	ND	Biofilm formation and acid resistance
<i>Staphylococcus aureus</i>	AgrA-AgrC	AIP	Regulatory RNA III
	SrrA-SsrB	Oxygen?	Exoprotein genes, RNA III
	SaeR-SaeS	ND	Exoprotein genes
	ArlR-ArlS	ND	Exoprotein genes
	LytR-LytS	ND	Holin-like genes <i>lrgA</i> , <i>lrgB</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	VirR-VirS	ND	Toxin (<i>pfoA</i> , <i>cpb2</i>) and adhesion genes (<i>cna</i>)

Tableau 1 : Systèmes à deux composants contribuant à la régulation de la virulence (Beier & Gross, 2006)

La virulence résulte de l'action de plusieurs systèmes à deux composants dont les actions peuvent être associées.

La figure 19 nous montre les systèmes impliqués dans la virulence de *S. enterica*. Il faut noter qu'il existe des relations complexes entre les différents systèmes à deux composants puisque les systèmes PhoP-PhoQ et EnvZ-OmpR régulent l'expression du système SsrB-SsrA qui contrôle la transcription des gènes codant notamment le système de sécrétion de type III.

De plus, nous pouvons noter que le stimulus perçu par les systèmes à deux composants n'est pas toujours connu.

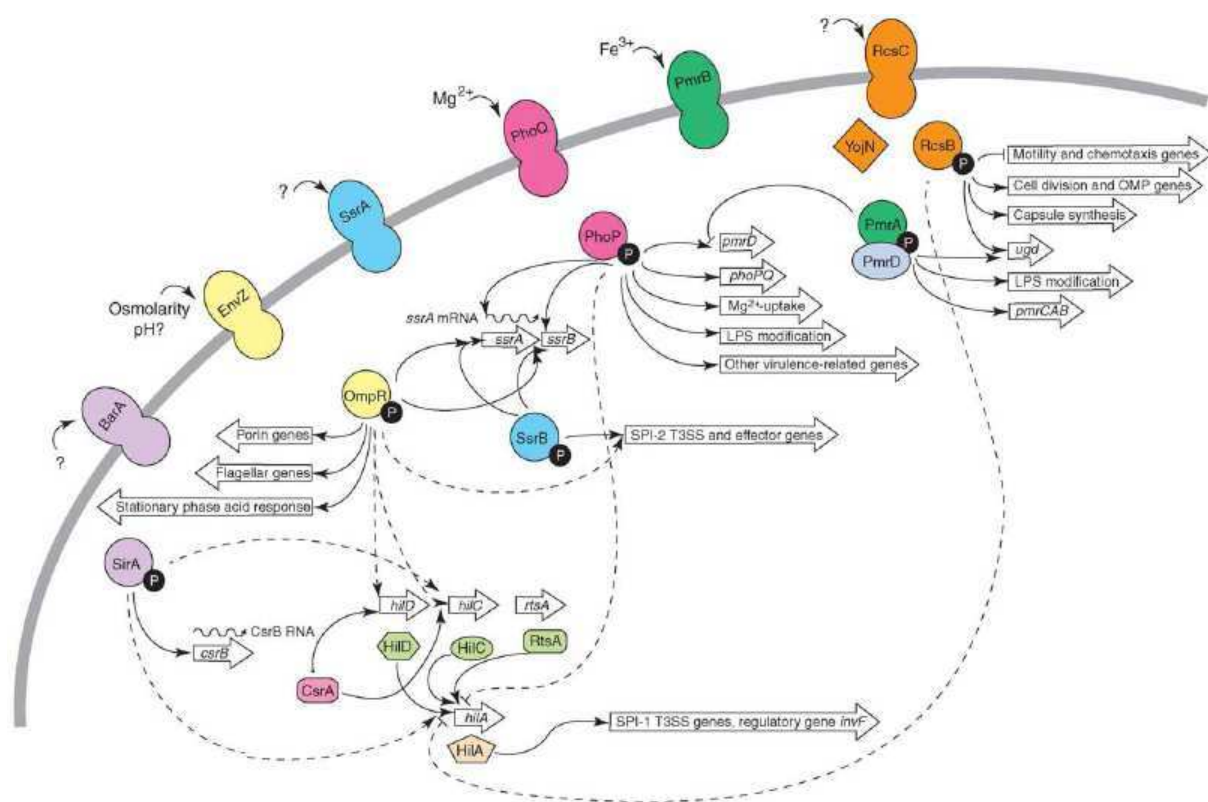


Figure 19 : Représentation schématique de systèmes régulant l'expression de gènes impliqués dans la virulence chez *S. enterica* (Beier & Gross, 2006). Les couples capteur-régulateur sont représentés dans la même couleur.



- PmrA-PmrB : Ce système est activé par un excès de fer en pH acide. Il est impliqué dans la virulence puisqu'un mutant dans un des deux gènes présente une diminution de leur virulence sur tubercules de pomme de terre. Ce système permet la résistance à la polymyxine B (Hyytiäinen et *coll.*, 2003).

Chez *E. chrysanthemi*, 2 systèmes à deux composants sont connus pour affecter la virulence :

- PhoP-PhoQ : Un mutant *phoQ* présente une réduction de survie dans les tissus végétaux à cause d'une sensibilité accrue au pH acide et une réduction de sa virulence sur feuilles d'endive. Ce système est induit dans la plante mais aussi par une faible concentration en Mg^{2+} (Llama-Palacios et *coll.*, 2003). De plus, une étude a montré qu'une mutation dans *phoQ* affectait la transcription d'au moins 40 gènes dont ceux impliqués dans le métabolisme du fer et un sidérophore nécessaire à une virulence optimale. Les auteurs en concluent que certains gènes impliqués dans des transporteurs sont également touchés. PhoP-PhoQ gouvernerait donc l'expression de plusieurs facteurs de virulence et pourrait également interagir avec d'autres systèmes régulateurs (Venkatesh et *coll.*, 2006).
- GacS/GacA : GacA est nécessaire pour une expression appropriée des gènes de virulence lors de l'infection de la plante par EC3937. Un mutant *gacA* présente une production diminuée des pectate-lyases, des proteases et des cellulases. Le système de sécrétion de type III est diminué (Lebeau et *coll.*, 2008 ; Yang et *coll.*, 2008).

D. Le phosphorelais : RcsCDB

1. RcsCDB

Le système Rcs est un système de phosphorelais et se compose de 3 protéines permettant la transduction du signal. Les gènes codant les capteurs et le régulateur sont organisés en opéron : *rcsDB-rcsC*, cette organisation est conservée chez la plupart des Entérobactéries (figure 21a). Il a été initialement caractérisé chez *E. coli* comme activant la synthèse d'exopolysaccharides (Gottesman et coll., 1985).

a) RcsC

RcsC (figure 21b) est un capteur transmembranaire possédant 2 segments transmembranaires (TM1 et TM2) permettant de délimiter un domaine périplasmique. Ce domaine périplasmique interviendrait dans la perception des signaux environnementaux. La partie cytoplasmique comprend un domaine PAS, un domaine histidine kinase (domaine comprenant l'histidine phosphorylable H1) et un domaine receveur (domaine comprenant l'aspartate phosphorylable D1).

b) RcsD

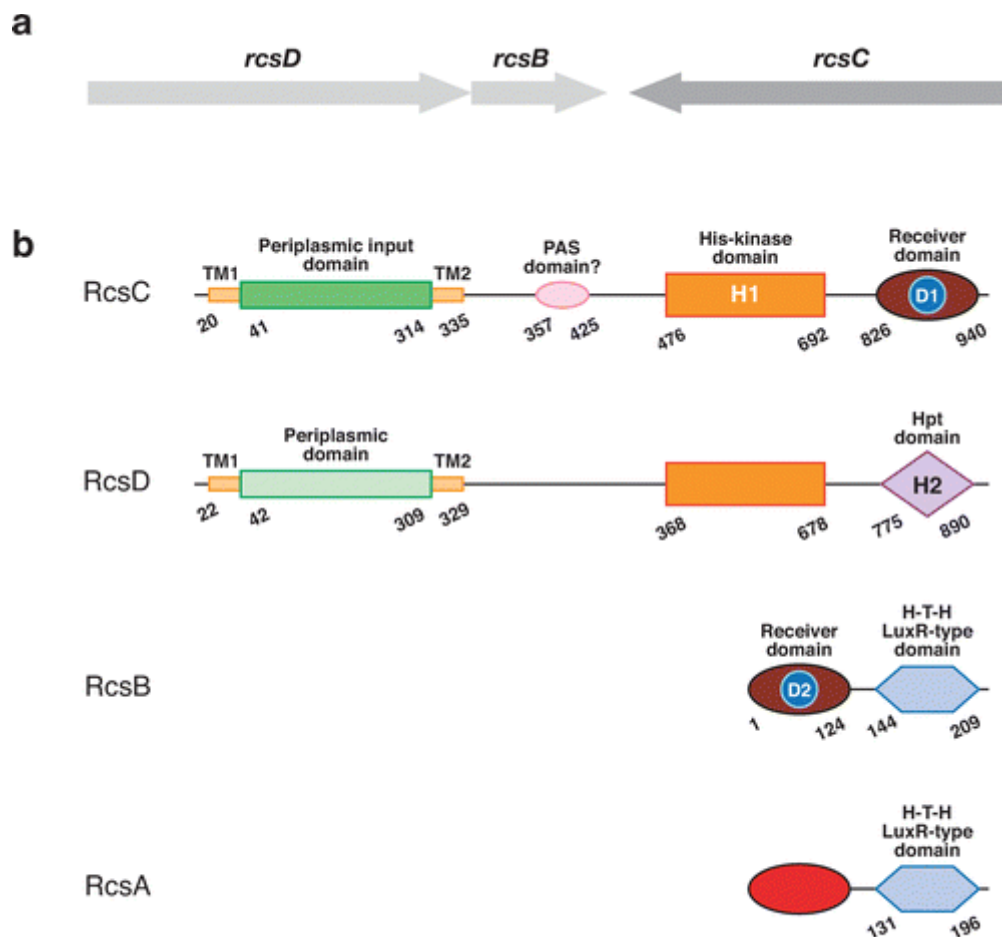
RcsD (anciennement appelé YojN) (figure 21b) est également une protéine transmembranaire avec 2 segments transmembranaires (TM1 et TM2) délimitant également un domaine périplasmique qui pourrait participer avec RcsC ou indépendamment à la perception des signaux environnementaux. Le domaine cytoplasmique ne présente pas de domaine histidine kinase mais présente un domaine Hpt (histidine-containing phosphotransmitter), domaine transmetteur de phosphate avec une histidine phosphorylable (H2).

On peut noter une plus grande conservation du domaine périplasmique de RcsD que du domaine correspondant de RcsC. Ainsi RcsD semble un meilleur candidat que RcsC à une interaction avec un partenaire de structure conservée.

c) RcsB

RcsB est le régulateur du phosphorelais (figure 21b). Il est cytoplasmique et possède un domaine receveur avec un aspartate phosphorylable (D2) et un domaine de fixation à l'ADN.

Le capteur formé de RcsC et RcsD perçoit un signal environnemental au niveau de la boucle périplasmique, il y a alors autophosphorylation au niveau de l'histidine H1 (RcsC), puis transfert du phosphate sur l'aspartate D1 de RcsC. Il y a alors transfert de ce phosphate sur une histidine (H2) du domaine Hpt de RcsD puis transfert du groupement phosphate sur l'aspartate du domaine receveur du régulateur RcsB (D2). RcsB est phosphorylé ou déphosphorylé par le capteur. Le niveau de phosphorylation permet la modulation de son activité. Le régulateur, grâce à son domaine responsable de la reconnaissance des séquences de régulation, permet ainsi leur activation ou leur répression transcriptionnelle (figure 22). Comme nous l'avons dit précédemment, les capteurs fonctionnent en dimère. Dans la littérature, le capteur est dans la plupart des cas un hétérodimère (RcsCD), cependant nous ne pouvons exclure que ce capteur soit un hétérotétramère (RcsC2D2) ou qu'il se compose de 2 dimères (RcsC2 + RcsD2).



Majdalani N, Gottesman S. 2005.
Annu. Rev. Microbiol. 59:379-405

Figure 21: Le système phosphorelais Rcs d'après Majdalani et Gottesman, 2005.

(a) Organisation du locus *rcs* : *rcsDB-rcsC*.

(b) Organisation des domaines des protéines du système Rcs et RcsA.

d) RcsA

Chez *E. coli* et de nombreuses entérobactéries, la protéine **RcsA** est présente (figure 21b). Le gène *rcsA* se localise loin de l'opéron *rscCBD*. RcsA est un cofacteur interagissant avec RcsB au niveau de boîtes RcsAB des séquences régulatrices de certains gènes cibles. La formation de cet hétérodimère n'est pas obligatoire. En effet, l'activation des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides (*cps*) et la répression des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle (*flh*) nécessitent la présence de RcsA (Francez-Charlot et coll., 2003). Par contre, l'activation de gènes comme les gènes *fts* impliqués dans le contrôle de la division cellulaire n'est pas dépendante de RcsA (Carballès et coll., 1999). RcsA est dégradée par la protéase Lon, ce qui explique que les mutants *lon* sont muqueux (Markovitz A. 1964). La protéase Lon dégrade également SulA, un inhibiteur de FtsZ induit lors de la réponse SOS ce qui explique que les mutants *lon* sont sensibles aux UV (ils filamentent) (Mizusawa et coll., 1983).

Chez *E. chrysanthemi*, la protéine RcsA n'est pas présente. RcsB régulerait alors les gènes seul ou en interagissant avec un autre cofacteur encore inconnu.

2. Protéines interagissant avec le phosphorelais Rcs

Il existe plusieurs protéines interagissant avec le phosphorelais RcsCDB(A) (figure 22).

a) RcsF

RcsF est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe. Elle joue un rôle dans la transduction du signal de la membrane externe vers RcsC (présent dans la membrane interne). Il a été montré d'une part que la surexpression de RcsF active les gènes *cps* (exopolysaccharides) et d'autre part, que l'activité de RcsF est dépendante de DsbA, protéine périplasmique catalysant la formation de ponts disulfure.

b) IgaA

IgaA (Intracellular-growth-attenuator-A) est une protéine de la membrane interne connue pour agir négativement sur le système Rcs. Une mutation dans *igaA* réduit la motilité de *Salmonella enterica* en activant Rcs. Il faut noter que chez cette bactérie la mutation est létale sauf dans un contexte où le système Rcs est inactif (mutant *rscC*, *rscD* ou *rscB*) et ceci indépendamment de RcsA et RcsF (Cano et coll., 2002 ; Majdalani et Gottesman, 2005). De plus, il a récemment été montré qu'en absence de IgaA, le locus *rscCBD* était instable chez *Salmonella* (délétion) (Mariscotti et coll., 2008).

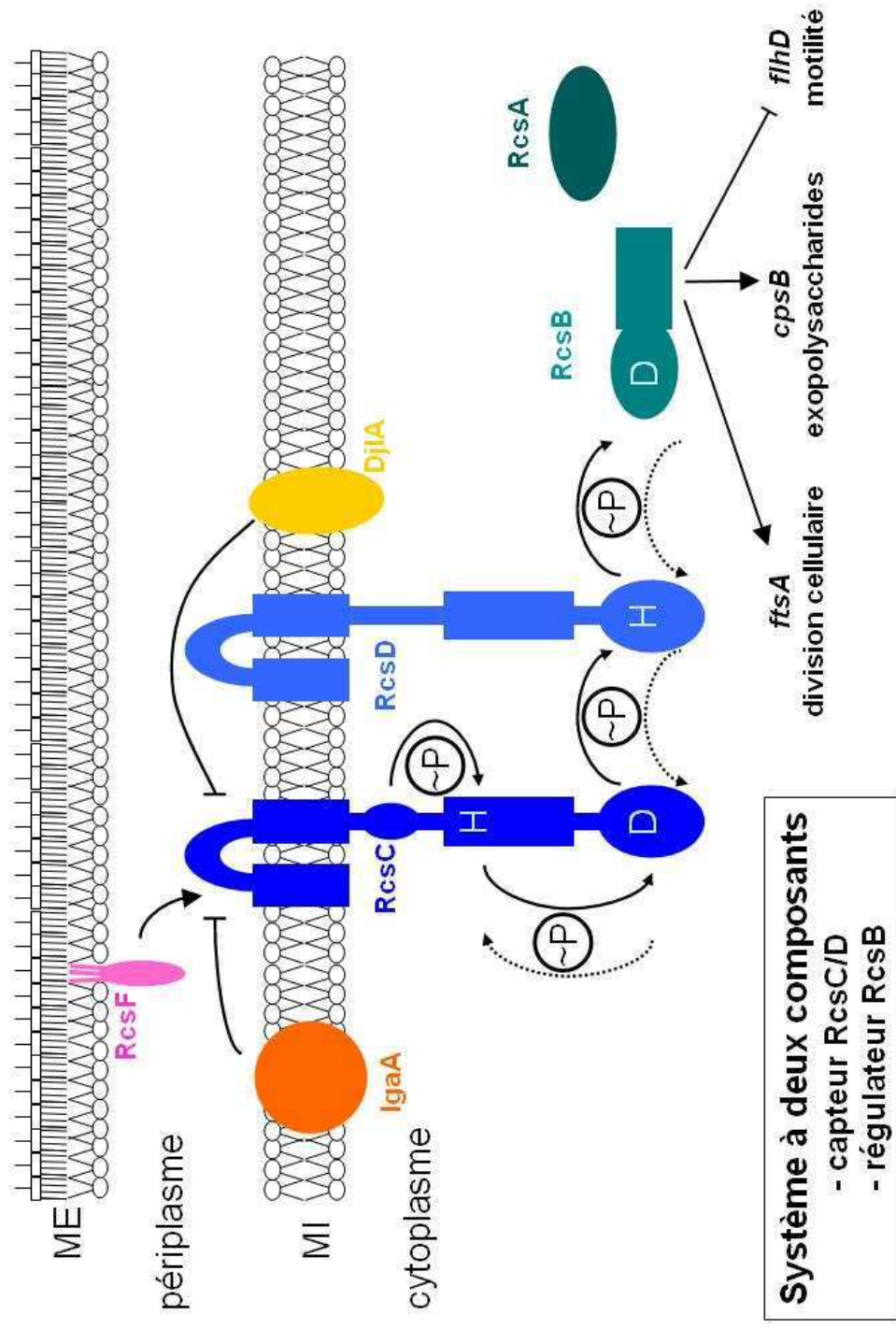


Figure 22 : Représentation du système RcsCDB, des protéines interagissant avec lui et des gènes cibles

c) DjlA

DjlA est une protéine ancrée dans la membrane interne par un segment N-terminal. Une surexpression de DjlA entraîne une activation du système Rcs (Clarke et *coll.*, 1997). Il a été montré que l'activation nécessite la présence de DjlA en coopération avec DnaK et GrpE et la présence du segment transmembranaire (TM) notamment impliqué dans la dimérisation de DjlA (figure 23, Toutain et *coll.*, 2003). Par contre, il a été montré chez *E. coli* qu'une délétion dans *djlA* engendrait une augmentation de l'activité du système Rcs et qu'une surexpression (à faible niveau) entraînait une diminution de l'activité du système Rcs. DjlA est donc un autre répresseur du système Rcs (Shiba et *coll.*, 2006).

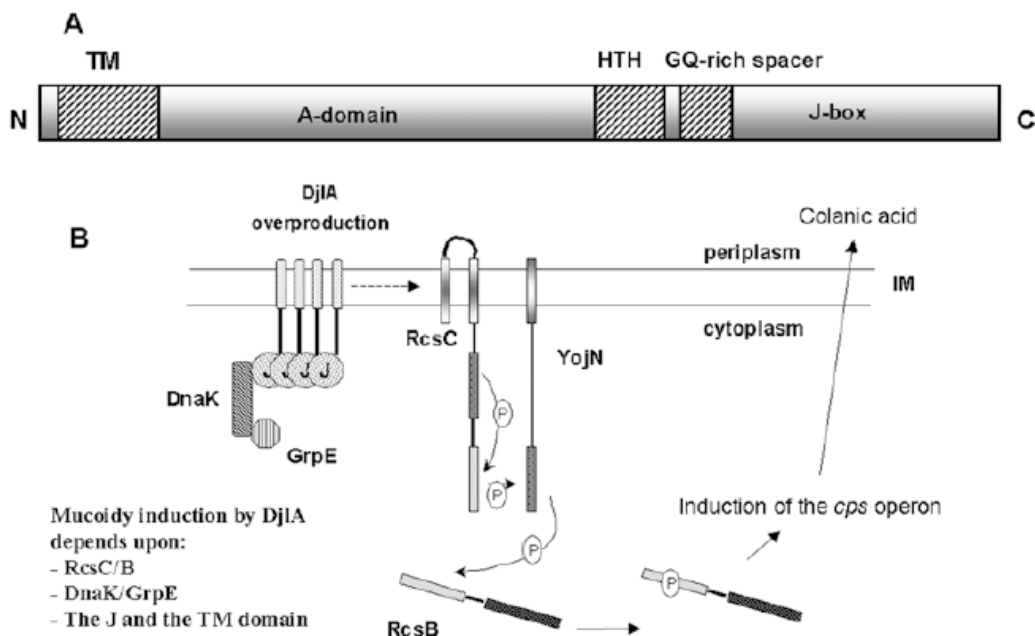


Figure 23 : Représentation schématique de DjlA et de son mode d'activation du système RcsCDB, conduisant à une augmentation de la production d'acide colanique (Toutain et *coll.*, 2003).

3. Autres éléments interagissant avec le phosphorelais Rcs

Les signaux perçus par le système Rcs sont pour le moment inconnus. Cependant, il a été montré que des mutations dans l'opéron *rfa* impliqué dans la biosynthèse du LPS (lipopolysaccharides) et dans le gène *opgH* impliqué dans la biosynthèse des OPG activent de manière constitutive le système Rcs (Parker et *coll.*, 1992 ; Ebel et *coll.*, 1997). Il a alors été suggéré des interactions entre le phosphorelais et le LPS ou les OPG. Le LPS et les OPG pourraient avoir un effet sur RcsF dû à la perturbation de la membrane. Les travaux de Ebel et

coll. en 1997, laissent penser que les OPG pourraient être un signal directement perçu par Rcs.

4. Les gènes cibles du système Rcs

Le Système RcsCDB est connu pour être impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires.

➤ La synthèse des exopolysaccharides

Comme cité précédemment, le système Rcs a d'abord été identifié comme activateur des gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides (*cps*) chez *E. coli* (Gottesman et *coll.*, 1985).

➤ La division cellulaire

Il a été montré chez *E. coli* que la protéine RcsB active, indépendamment de RcsA, l'expression des gènes *ftsA* et *ftsZ* impliqués dans la formation de l'anneau lors de la division cellulaire.

➤ Il a été montré que l'opéron *tolQRA*, (codant des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité membranaire) chez *E. coli* était régulé par le système RcsCDB. Il a été montré que le système RcsCDB est activé dans les mutants *tol* ou quand les protéines Tol sont surexprimées (Clavel *et al.*, 1996; Vianney et *coll.*, 2005).

➤ La motilité

Le système RcsCDB réprime la motilité en régulant négativement la transcription des gènes *flhDC*, opéron maître de la biosynthèse du flagelle (Francez-Charlot et *coll.*, 2003) (figure 24). Cette répression nécessite la présence de RcsA.

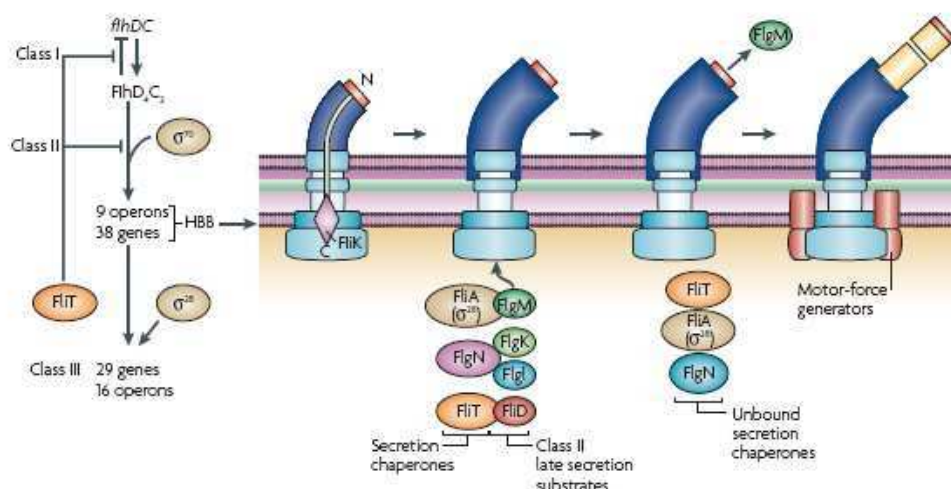


Figure 24: Schéma représentant les gènes régulant la synthèse du flagelle et son assemblage. L'opéron *flhDC* est sous le contrôle d'une régulation globale qui conduit à l'expression ou à l'inhibition de la synthèse du flagelle (Chevance & Hughes, 2008).

➤ La virulence

De nombreux travaux ont montré l'importance de ce phosphorelais dans la virulence, comme pour *Salmonella* (Mouslim et coll., 2004), pour des souches entérohémorragiques d'*E. coli* (Tobe et coll., 2005), pour *E. amylovora* (Bereswill et Geider, 1997) ou encore *Y. enterocolitica* (Venecia et Young, 2005). Il a ainsi été suggéré que les bactéries pathogènes diminuaient l'expression de certains gènes lors de l'infection, gènes incompatibles avec le bon déroulement de l'infection (Mouslim et coll., 2004). Il a été montré qu'une activation constitutive du système RcsCDB engendrait une atténuation de la virulence chez *Salmonella* (Garcia-Calderon et coll., 2005).

➤ Cette liste n'est pas exhaustive puisqu'une étude récente (Hinchliffe et coll., 2008) utilisant des puces à ADN afin de montrer le rôle du phosphorelais Rcs chez les *Yersinia* a montré qu'il régulait l'expression de 136 séquences codantes dont 60% sont prédites pour affecter l'enveloppe, de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la virulence dont les gènes codant les protéines impliquées dans la formation des biofilms, la motilité, l'adhésion aux cellules mammaliennes...

5. La mutation suppressive *rscC2*

La recherche de mutations permettant la suppression du phénotype *opgG* d'*E. chrysanthemi* a été effectuée par Franck Bouchart (il a recherché des bactéries ayant une restauration de la motilité). La mutation permettait de restaurer la quasi-totalité des phénotypes sauvages : absence de mucosité, restauration partielle de la résistance aux sels biliaires, restauration de la motilité, de la sécrétion des exoenzymes et de la virulence sur tubercules de pomme de terre mais pas sur feuilles d'endive. La mutation a été localisée dans le gène *rscC* : *rscC2*. La mutation ponctuelle se situe dans la partie cytoplasmique en C-terminal entre le domaine PAS et le domaine histidine kinase (figure 25) et permet un changement de l'alanine 463 en valine. D'autres mutations ponctuelles affectant les capteurs de systèmes à deux composants ont été étudiées. Ces mutations affectent l'activité kinase ou phosphatase. Parmi elles, chez *Bordetella pertussis*, une mutation ponctuelle en C-terminal de BvgS (H1172N) abolit son activité (Uhl & Miller, 1996), ou encore chez *E. coli* des mutants ponctuels de EnvZ ne présentent plus d'activité phosphatase mais conserve leur activité kinase, on observe alors un phénotype constitutivement activé (Tokishita & Mizuno, 1994). Une mutation ponctuelle dans BarA du système BarA/UvrY crée une activité kinase affaiblie et une augmentation de son activité phosphatase chez *E. coli* (Tomenius et coll., 2006).

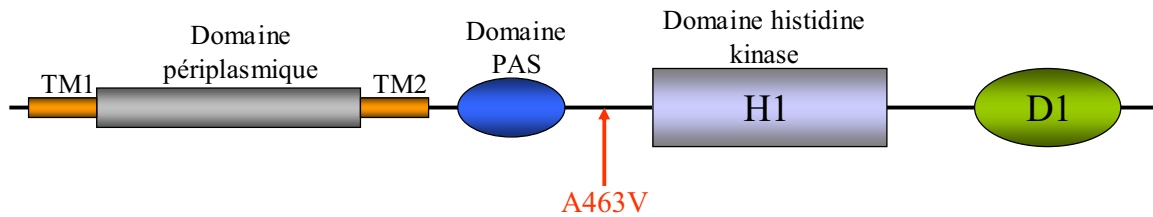


Figure 25 : Organisation des différents domaines de la protéine RcsC et localisation (en rouge) de la mutation *rscC2*. Schéma réalisé d'après la représentation obtenue grâce au logiciel SMART d'Infobiogen.

Le phénotype de la souche *rscC2* dans un contexte sauvage (*Opg*⁺) a également été analysé. Ce mutant produit presque 2 fois moins d'OPG, sécrète plus de pectinases et est hyperrésistant aux sels biliaires. On observe également une hypervirulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive. C'est à notre connaissance, le premier mutant du système Rcs stimulant la virulence d'une entérobactérie pathogène (Bouchart, 2006).

Ainsi les travaux de F. Bouchart et ceux d'Ebel en 1997 montrent un lien étroit entre la présence des OPG et le niveau d'activation du système RcsCDB.

E. Le modèle d'étude : *Erwinia chrysanthemi* 3937

Erwinia chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène faisant partie de la subdivision γ des Protéobactéries qui comprend en particulier les *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae*. *E. chrysanthemi* est un pathogène pour de nombreuses plantes dans les régions tropicales et subtropicales, et peut également infecter certaines cultures dans les régions tempérées comme les endives, les pommes de terre, le saintpaulia... *E. chrysanthemi* provoque la pourriture molle causée par la sécrétion d'une batterie de pectinases qui provoquent la déstructuration de la pectine. L'action de ces enzymes est prérequis pour la dégradation de la paroi des cellules végétales par les cellulases et les protéases (Collmer & Bateman, 1981). *E. chrysanthemi* a également été classée dans un autre genre, *Pectobacterium* parce qu'elle possédait une activité pectinolytique provoquant la macération des tissus végétaux (Hauben et coll., 1998). Plus récemment encore, *Pectobacterium chrysanthemi* a été transférée dans le nouveau genre *Dickeya* (Samson et coll., 2005) et son nom actuel est *Dickeya dadantii*. Dans cette thèse, la nomenclature initiale est conservée, nous l'appellerons donc *Erwinia chrysanthemi*.

1. Structure de la paroi de la plante hôte

La paroi des cellules végétales se compose de plusieurs parties :

- la paroi primaire, composée de fibres de cellulose assemblées dans une matrice de pectine.
- La paroi secondaire est constituée de cellulose et d'hémicellulose. Cette paroi peut être renforcée par de la lignine.
- La lamelle moyenne, constituée de pectine, est la partie la plus externe de la paroi. La pectine permet la cohésion entre les cellules.

La combinaison des différentes enzymes pectinolytiques permet lors de l'infection par la bactérie pathogène la dissociation des cellules afin de provoquer la pourriture molle.

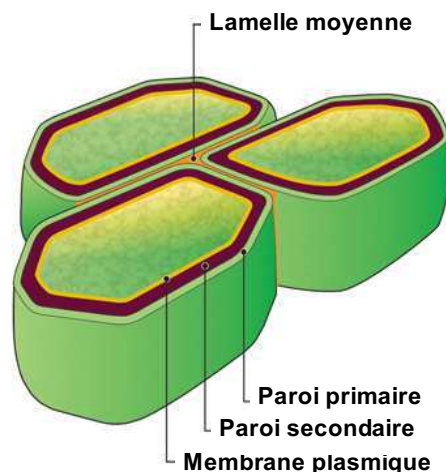


Figure 26: Structure de la paroi des cellules végétales.

La paroi des cellules végétales est donc composée majoritairement de polysaccharides répartis en trois groupes : la cellulose, l'hemicellulose et la pectine (figure 26).

- La cellulose est un polymère de glucoses liés en β -1,4.
- L'hemicellulose est un hétéropolysaccharide composé de xyloglucanes et de xylanes dont les proportions varient en fonction de la plante (Muyersowitz et Somerville, 1994) :
 - Les xyloglucanes sont constitués d'un squelette linéaire de cellulose ramifié principalement par des résidus de xylose mais aussi par des résidus de galactose et de fucose.
 - Les xylanes sont constitués de résidus de xylose liés en β -1,4 et ramifiés principalement par de l'arabinose.
- La pectine est un hétéropolysaccharide méthylestérifié constitué principalement (figure 27) :
 - d'homogalacturonane (HGA) : une chaîne linéaire d'acide galacturonique (GalA) liés en α -1,4.
 - de rhamnogalacturonane de type I (RGI) : un hétéropolymère branché alternant des résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4 et de rhamnose liés en α -1,2.
 - Sur le RGI sont attachés des chaînes d' α -1,5-arabinane (A)
 - Sur le RGI, on retrouve des chaînes de rhamnogalacturonane de type II constituées de divers sucres (galacturonate, fucose, rhamnose, arabinose, ...) (RGII) (Vincken et coll., 2003, Willats et coll., 2001).

➤ Sur le RGI, il y a également des chaînes d'arabinogalactane (G) qui peuvent être des chaînes de β -1,4-galactanes (galactanes de type I) ou des galactanes liés en β -1,3 qui peuvent être branchés par des résidus de galactopyranose en β -1,6 (galactanes de type II). La structure de ces chaînes va varier selon l'espèce et vont faire varier les propriétés de la pectine (Hwang et *coll.*, 1993). Ce sont les galactanes de type I qui nous intéresseront particulièrement par la suite (Partie I : Contribution à la caractérisation du locus *gan* impliqué dans l'utilisation des galactanes chez *Erwinia chrysanthemi*).

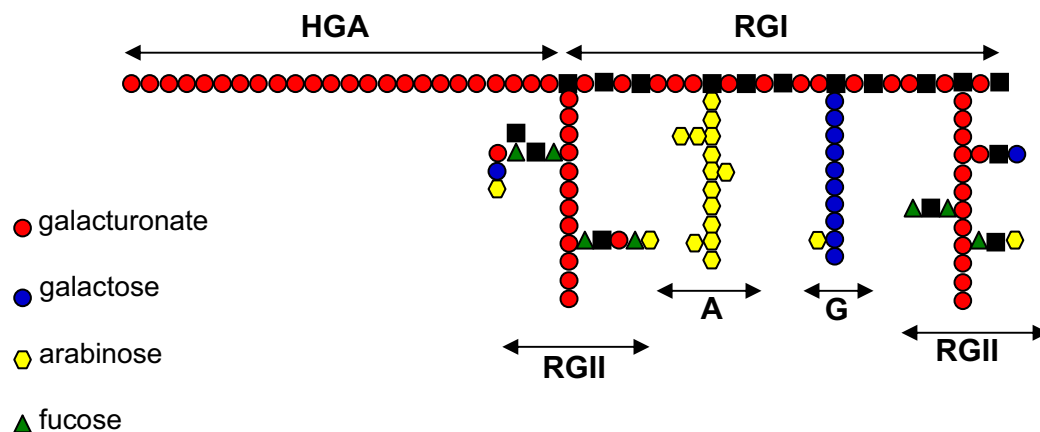


Figure 27 : Représentation schématique de la structure de la pectine. HGA, homogalacturonate ; RGI, rhamnogalacturonate de type I ; RGII, rhamnogalacturonate de type II ; A, arabinane ; G, galactane (d'après Vincken et *coll.*, 2003).

2. Mécanismes de virulence

E. chrysanthemi, quand elle ne cause pas la macération, peut vivre dans la plante d'une manière endophytique, sur la surface de la plante d'une manière epiphytique ou d'une manière saprophytique dans le sol ou dans les nappes phréatiques.

E. chrysanthemi pénètre dans la plante par des blessures ou par des entrées naturelles. A l'intérieur de la plante, elle est retrouvée dans le tissu vasculaire et dans les espaces intercellulaires où elle peut rester un long moment avant de provoquer la maladie. Durant cette phase, on ne sait pas si la bactérie est en dormance et non reconnue par la plante ou si il y a un processus dynamique de la croissance bactérienne contre les défenses de la plante. Lorsqu'elle devient virulente, les symptômes de la maladie se manifestent par la nécrose des tissus végétaux. Elle est produite par la désorganisation des tissus végétaux et la lyse des cellules provoquées par la dégradation de la paroi de ces cellules. Cette dégradation est assurée par la sécrétion de cellulases, de protéases mais surtout de pectinases.

➤ Les cellulases

Elles présentent une activité endoglucanase, permettant la digestion de la cellulose des parois primaire et secondaire. Chez *E. chrysanthemi*, deux cellulases sont connues : CelZ et CelY. CelZ, majoritaire, est une enzyme extracellulaire sécrétée par le système Out (typeII), tandis que CelY est une enzyme périplasmique. Elles ne sont pas essentielles pour la pathogénicité mais agissent en synergie avec les autres exoenzymes.

➤ Les protéases

Les exoprotéases ne sont pas essentielles pour la virulence. Elles sont sécrétées par le système Ptr de type I. Il est composé de 3 protéines, PtrD, PtrE et PtrF, traversant toute l'enveloppe. Il permet la translocation des protéines du cytoplasme au milieu extérieur en une étape en utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour le transport (Delepelaire et Wandersman, 1991).

➤ Les pectinases

La structure complexe de la pectine nécessite l'action combinée de plusieurs pectinases pour une déstructuration efficace (figure 28). Lors de l'infection bactérienne, la dégradation de la pectine commence grâce à l'action de pectine estérases (PemA, PaeY), de dépolymérases (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelZ et RhiE) pour aboutir à la formation d'oligomères qui peuvent entrer dans le périplasma bactérien par la porine KdgM (Blot et coll., 2002). Les pectinases sont sécrétées par le système de sécrétion de type II, appelé Out (Salmond, 1994). Dans le périplasma, les oligomères sont désestérifiés (PemB et PaeX) puis clivés (PelX, PehV, PehW et PehX). Les petits oligomères (majoritairement des dimères et trimères) issus de cette dégradation entrent dans le cytoplasme grâce au système de transport TogT et TogMNAB où ils sont dégradés par l'exopectate-lyase PelW et l'oligogalacturonate-lyase Ogl, pour donner des monomères : le galacturonate et le 5-céto-4-désoxyuronate (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et Reverchon, 2001).

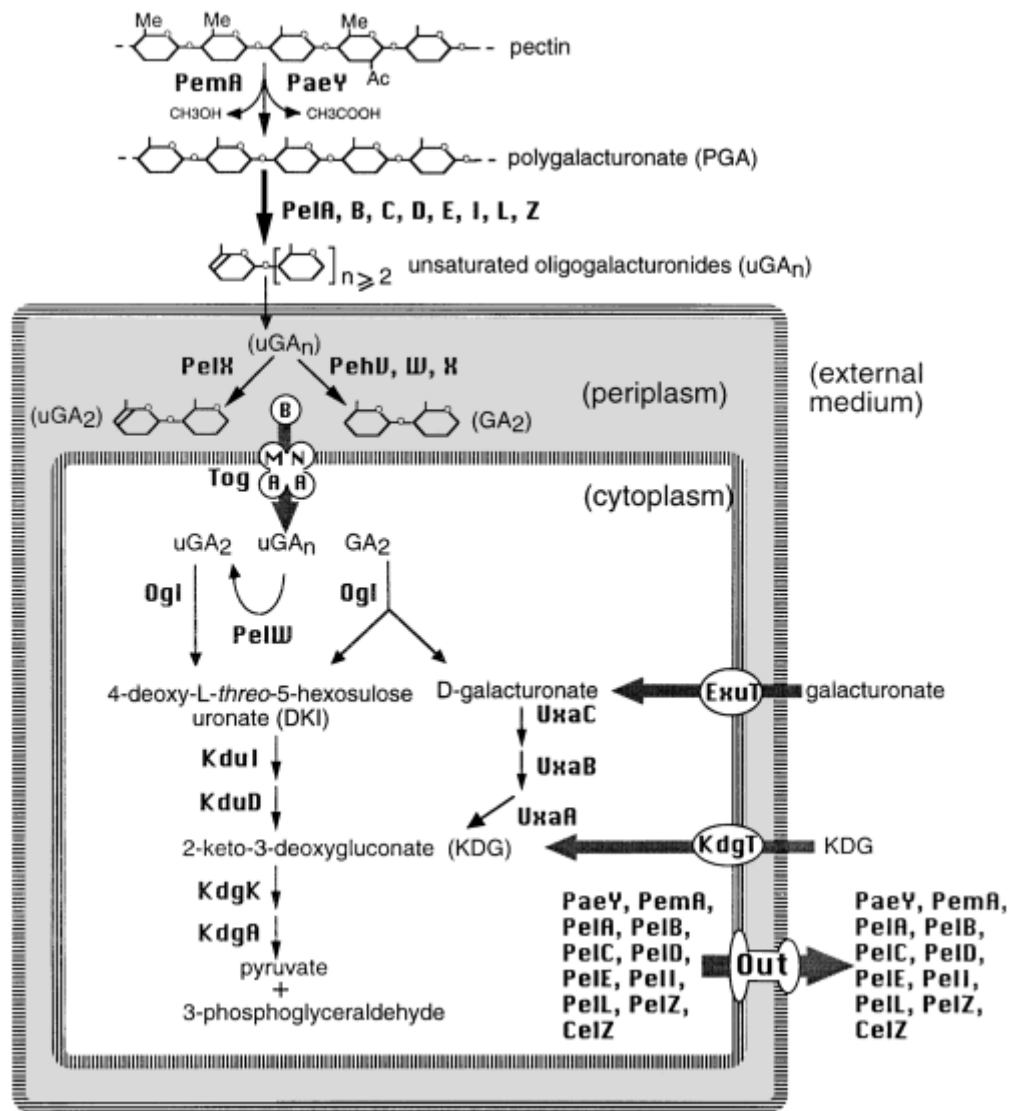


Figure 28: Dégradation et catabolisme de la pectine chez *E. chrysanthemi*, d'après Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 2001.

E. chrysanthemi clive donc la pectine afin de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. La régulation de ces gènes dépend de l'effet cumulé de différents régulateurs. La transcription des gènes *pel* est induite par les produits du catabolisme de la pectine, l'état stationnaire de croissance, les métabolites de la plante hôte (Bourson et coll., 1993), la carence en fer (Masclaux et coll., 1996), et la protéine H-NS (protéine associée au nucléoïde) (Nasser & Reverchon, 2002). Par contre, la transcription de ces gènes est réprimée lors de la privation en azote, à des températures élevées, à haute osmolarité et est soumise à la répression catabolique (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992 ; Reverchon et coll., 1997). La répression catabolique est exercée par la protéine CRP (Reverchon et coll., 1997). Chez *E. coli*, il existe en amont des promoteurs soumis à la répression catabolique, un site de fixation pour une

protéine activatrice de la transcription. Tant que cet activateur n'est pas fixé, l'initiation de la transcription est faible. La fixation de CRP sur l'ADN est dépendante de la présence d'AMPc. Le complexe CRP+AMPc se fixe sur l'ADN et active la transcription. En présence de glucose dans le milieu, l'adénylate cyclase est incapable de fabriquer de l'AMPc, il n'y a pas de formation du complexe CRP+AMPc et donc absence d'activation de la transcription. En absence de glucose, l'adénylate cyclase est active, l'AMPc formé va se complexer à la protéine CRP et ainsi activer la transcription. Chez *E. chrysanthemi*, la production de pectates lyases est soumise à cette répression catabolique. Celle-ci est observée lors de la croissance en présence de glucose mais également en présence des produits de dégradation de la pectine (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996).

De plus, la synthèse et la sécrétion des pectinases sont très liées puisque les gènes *pel* et *out* présentent une régulation similaire par les mêmes facteurs de régulation (Condemine & Robert-Baudouy, 1995).

➤ D'autres facteurs intervenant dans la virulence.

D'autres facteurs vont intervenir dans le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*.

- Le système de sécrétion de type III, précédemment cité, permet d'injecter les protéines dans les cellules de la plante. Ces protéines pourront alors perturber le métabolisme cellulaire et empêcher les mécanismes de défense de la plante d'être efficace. Ce système de sécrétion fait partie des gènes *hrp* (« hypersensitive response and pathogenicity ») et *hrc* (« hypersensitive response and pathogenicity genes conserved »). Il joue un rôle dans la virulence bactérienne d'*E. chrysanthemi* (Yang et coll., 2002) et d'*E. carotovora* (Rantakari et coll., 2001). La surproduction ou l'absence des gènes *hrp* diminue la virulence.

- Condemine et coll. ont montré en 1999, qu'un mutant *eps* affecté dans la biosynthèse des exopolysaccharides était moins efficace pour la phase initiale de la macération.

- Des mutants affectés dans la structure du lipopolysaccharide (LPS) ont perdu leur capacité à infecter le saintpaulia (Schoonejans et coll., 1987)

- Lors de l'infection, *Erwinia* colonise les espaces intercellulaires de la plante. *Erwinia* rencontre alors un environnement oxydatif, puisque les cellules de la plante produisent de l'oxygène actif en réponse à l'attaque bactérienne. La bactérie a pour se protéger des systèmes qui la protège comme la methionine sulfoxide réductase MsrA et une superoxide dismutase qui sont essentielles au résultat final de l'infection (El Hassouni et coll., 1999. Santos, R., 2001).

- La fixation du fer par les sidérophores (la chrysobactine et l'achromobactine) est importante dans la pathogénicité d'*E. chrysanthemi*. Les sidérophores fixent le fer dans un environnement pauvre en fer comme dans la plante. Le fer fixé est un signal activant notamment la transcription des gènes des pectates lyases et des gènes codant le transport du fer. Des mutants affectés dans l'assimilation du fer présentent une croissance plus faible lors des phases précoces de l'infection (Enard et *coll.*, 1988).
- Nous l'avons développé dans le chapitre sur les OPG, les Glucanes Périplasmiques Osmorégulés (OPG) sont nécessaire à la virulence d'*E. chrysanthemi* (Page et *coll.*, 2001).

. Objectifs

Au sein du laboratoire, nous nous intéressons aux glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Ces oligosaccharides sont essentiels pour la virulence d'*E. chrysanthemi* puisqu'un mutant *opgG* incapable de synthétiser ces glucanes présente un phénotype pléiotrope dont une absence de virulence sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. Il a été montré que les OPG, présents dans le périplasma, pouvaient interagir avec des systèmes à deux composants qui sont impliqués dans la perception de changements environnementaux.

Cette thèse est une contribution à la compréhension du rôle du périplasma dans la perception de l'environnement par la bactérie. Ma thèse comporte deux parties distinctes correspondant à des expériences effectuées parallèlement.

A la suite de l'étude protéomique du mutant *opgG*, nous nous sommes intéressé à une protéine périplasmique inconnue très abondante. En collaboration avec Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et Aurélie Delangle, nous avons pu caractériser cette protéine et montrer qu'elle faisait partie d'un système de transport et de dégradation des β -galactanes, produits issus de la dégradation de la pectine. Ce système Gan permet donc le transport d'oligosaccharides à travers l'enveloppe de la bactérie afin de les utiliser comme source de carbone. Ce transport nécessite plusieurs étapes de dégradation indispensables dont une qui a lieu dans le périplasma.

Une approche génétique visant à obtenir des mutations suppressives du mutant *opg* a permis l'obtention d'une mutation dans le gène *rscC* par F. Bouchart au sein du laboratoire. Au cours de ma thèse, j'ai voulu préciser le rôle du système à deux composants RcsCDB dans le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* et notamment pourvoir déterminer l'impact de la mutation *rscC2* sur les gènes cibles du système Rcs. Je me suis ensuite intéressée au lien qui existe entre les OPG et ce système RcsCDB. J'ai enfin voulu voir les relations qui pouvaient exister entre le système à deux composants et les protéines interagissant avec ce phosphorelais : les protéines DjlA, IgaA et une version soluble de RcsF. Nous avons entrepris en collaboration avec Carmen Ödberg-Ferragut de caractériser la lipoprotéine RcsF par mutagenèse dirigée, afin d'apporter des éléments sur la structure de cette lipoprotéine.

Résultats :

**Partie I – Contribution à la caractérisation du locus *gan*
impliqué dans l'utilisation des galactanes
chez *Erwinia chrysanthemi*.**

. Partie I – Contribution à la caractérisation du locus *gan* impliqué dans l'utilisation des galactanes chez *Erwinia chrysanthemi*.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, Lyon) et avec Aurélie Delangle, doctorante du laboratoire. Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat a notamment participé aux constructions génétiques ainsi qu'à l'étude de la régulation du locus et Aurélie Delangle a réalisé la caractérisation biochimique de ce travail.

E. chrysanthemi est un pathogène pour de nombreuses plantes dans les régions tropicales et subtropicales, et peut également infecter certaines cultures dans les régions tempérées comme les endives, les pommes de terre, le saintpaulia... *E. chrysanthemi* provoque la pourriture molle causée par la sécrétion d'une batterie de pectinases qui provoquent la dépolymérisation de la pectine. L'action de ces enzymes est prérequis pour la dégradation de la paroi des cellules végétales par les cellulases et les protéases (Collmer & Bateman, 1981) (Cf. le chapitre E : le modèle d'étude : *E. chrysanthemi*).

A. Caractérisation du locus *gan* chez *Erwinia chrysanthemi*

1. Identification du locus

Lors de l'étude protéomique d'un mutant *opgG* (Bouchart et coll., 2007), une protéine inconnue fortement exprimée a pu être identifiée. Elle présente un fort degré de similarité avec les produits de gènes inconnus de *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* (83%) et *Erwinia carotovora* (78%).

Le gène de cette protéine, que nous avons appelé *ganA*, fait partie d'un locus comprenant 4 unités de transcription et 9 gènes : *ganR*, *ganL*, *ganEFGABC* et *ganK*. Ce locus semble être impliqué dans l'utilisation des galactanes (produits par la dégradation de la pectine). D'après une étude génomique comparative, ce locus est conservé chez *E. carotovora* et *Y. pseudotuberculosis* mais est absent chez *E. coli*. L'organisation génétique du locus est conservée chez *Y. pseudotuberculosis* et chez *E. carotovora*, à l'exception des gènes *ganL*, localisé à l'autre extrémité du locus et *ganR*, absent chez *E. carotovora* (Figure 29).

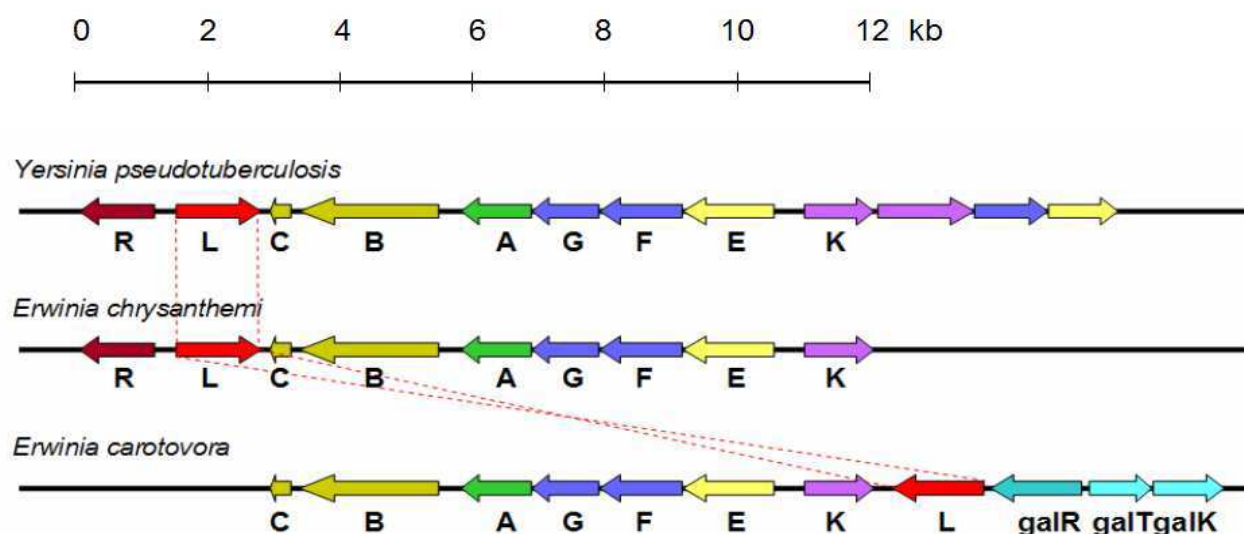


Figure 29 : Locus *gan* d'*E. chrysanthemi* potentiellement impliqué dans l'utilisation des β -galactanes. Il est conservé chez *E. carotovora* et *Y. pseudotuberculosis*. Nous avons appelé les gènes (*gan*) *R*, *L*, *EFGABC* et *K*. Les flèches correspondent aux phases ouvertes de lecture et l'orientation de la transcription des gènes. La taille des locus est donnée grâce à l'échelle en haut de la figure (en kb).

Le gène *ganA* est entouré par des gènes typiques d'un système de transport de type ABC dont le paradigme est le transport des maltodextrines chez *E. coli* (Mayer & Boos, 2005). On y retrouve une porine GanL (48% de similarité avec LamB) dans la membrane externe, une protéine affine périplasmique GanE (45% de similarité avec MalE), deux protéines de la membrane cytoplasmique GanF et GanG (respectivement 62% et 56% de similarité avec MalF et MalG), une protéine d'utilisation de l'ATP : GanK (72% de similarité avec MalK) (Figure 30).

On retrouve en plus du système de transport, un système de dégradation comprenant une endo-1,4- β -galactanase périplasmique (GanA) et une exo-1,4- β -galactanase cytoplasmique ou β -galactosidase (GanB). En effet, la protéine GanB présente de forte similarité avec des β -galactosidases de nombreuses bactéries notamment de *Y. pestis* (84% de similarité), *E. carotovora* (83%).

Le gène *ganC* code une protéine semblable à un fragment d'une protéine IIB d'un système PTS (système de translocation de groupe des sucres). Cette protéine est conservée chez *Y. pestis* et *E. carotovora* (respectivement 86% et 75%) mais aucune fonction n'a pu lui être attribuée.

Enfin le gène *ganR* code un régulateur transcriptionnel semblable à LacI (62% de similarité) : le répresseur de l'opéron lactose chez *E. coli*.

Un modèle d'utilisation des galactanes a été construit en se referant au transport des maltodextrines chez *E. coli* (Figure 30). Ce modèle proposé chez *E. chrysanthemi* par le locus *gan* est le suivant :

La pectine est dégradée par les pectates lyases (PL) et les rhamnogalacturonates lyases (RGL). Les oligogalactanes libérés entreraient dans le périplasma grâce à la porine GanL (LamB) présente dans la membrane externe (ME) et seraient dégradés par l'endo-1,4- β -galactanase périplasmique GanA. La protéine affine périplasmique GanE (MalE) apporterait les oligomères au système de transport GanFGK₂ (MalFGK₂) présent au niveau de la membrane interne. Le transport s'effectuerait grâce à l'hydrolyse d'ATP. L'exo-1,4- β -galactanase GanB cliverait les oligomères en galactose qui sera pris en charge par les protéines GalKTE, permettant la synthèse d'UDP-Galactose (Cf. Figure 40 dans la discussion).

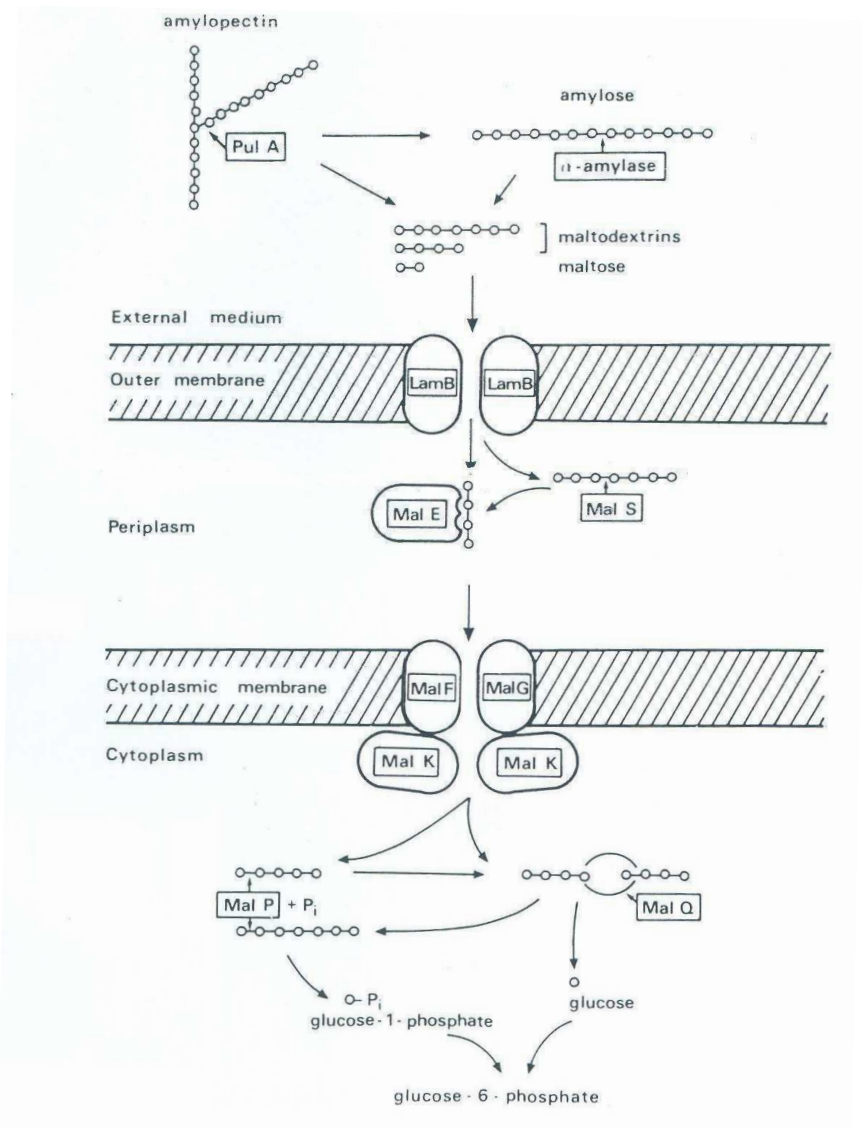


Figure 30 : Transport des maltodextrines chez *E. coli* (d'après M Schwartz)

2. Caractérisation du locus : utilisation des galactanes et de leurs dérivés

Afin d'étudier le locus *gan*, des mutations dans différents gènes ont été réalisées. Ces mutants ont été construits par génétique inverse après inactivation par insertion de cassette (Cf. Matériels et Méthodes).

La souche sauvage EC3937 est capable de croître en présence de galactanes de pomme de terre (MEGAZYME) comme seule source de carbone. Par contre, les mutants *ganA* ou *ganB* en sont incapables. Le locus *gan* est donc nécessaire à l'utilisation des galactanes par la bactérie (Tableau 2). De plus, ni la souche sauvage EC3937, ni les mutants *gan* ne sont capables de croître en présence de galactobiose (MEGAZYME) comme seule source de carbone.

a) Caractérisation des activités galactanases

Les galactanases sont également présentes chez de nombreux végétaux. En effet, lors de l'étude de la maturation de fruits comme le plaqueminier du Japon (*Diospyros kaki*), il a été observé que la maturation du fruit se fait grâce à la solubilisation des polysaccharides pectiques. Cette solubilisation de la pectine et le ramollissement du tissu qui en découle sont causés par l'action conjointe de la protéine GalA (endo-1,4- β -galactanase) et d'une β -galactosidase. Trois activités β -galactosidases sont décrites, elles sont capables de modifier la paroi des cellules végétales, et provoquent le ramollissement pendant la maturation des fruits. Une de ces trois activités β -galactosidase a été décrite comme étant une activité exo-1,4- β -galactanase (Nakamura et coll., 2003, Lazan et coll., 2004). De plus, l'étude de la galactanase codée par *galA* chez *Pseudomonas fluorescens*, a montré que la protéine purifiée était capable d'hydrolyser les galactanes et de libérer majoritairement des galactotrioses, des galactobioses et du galactose en fin de réaction (Braithwaite et coll., 1997). L'endo-1,4- β -galactanase chez *Aspergillus niger* clive l'arabinogalactane pour libérer principalement des galactobioses et galactotrioses (de Vries et coll., 2002). Cette activité n'avait jamais été décrite chez *E. chrysanthemi*.

- **GanA : l'endo-1,4- β -galactanase**

Pour évaluer si la bactérie a la capacité d'hydrolyser les β -1,4 galactanes, les bactéries sont déposées sur un milieu 63 complété en source de carbone et contenant en surcouche de l'AZCL galactan[®] (MEGAZYME). Après incubation, l'apparition d'un halo bleu révèle la

présence d'une activité galactanase. Les souches EC3937, NF3653 *ganA*::Cml, NF3674 *ganB*::Cml, NF3678 *ganA*::*uidA*-Kan sont déposées sur ces boîtes (Figure 31). Lorsque la souche sauvage EC3937 est inoculée sur ces boîtes, on observe la formation d'un halo bleu autour de la colonie dû à l'hydrolyse du substrat. Par contre, aucun halo n'est visible lorsque l'on inocule les souches NF3653 *ganA*::Cml, NF3678 *ganA*::*uidA*-Kan. Le locus *gan* est donc bien impliqué dans une activité galactanase. Par contre, on observe la présence d'un halo bleu autour de la colonie NF3674 *ganB*::Cml. Ces résultats montrent que c'est bien la protéine GanA qui attaque ce substrat (spécifique d'une activité endo-1,4- β -galactanase). La souche NF3657 *outS*::Kan montre également un halo de dégradation de taille identique à la souche sauvage. Le système de sécrétion de type II ne semble donc pas impliqué dans cette activité.

La présence d'une activité endo-1,4- β -galactanase est également observable par le dosage de l'activité hydrolytique d'un substrat soluble : l'AZO-galactan[®] (MEGAZYME). Les résultats du dosage de l'activité endo-1,4- β -galactanase, grâce à ce substrat soluble, sont présentés dans la partie concernant l'étude de la régulation du locus.

De plus, nous avons testé la croissance du mutant *ganA* sur milieu solide contenant des galactanes comme seule source de carbone. Alors que l'on observe une croissance pour la souche sauvage (EC3937), aucune croissance n'est observée pour le mutant *ganA*. Ceci confirme que GanA est nécessaire pour l'utilisation des galactanes.

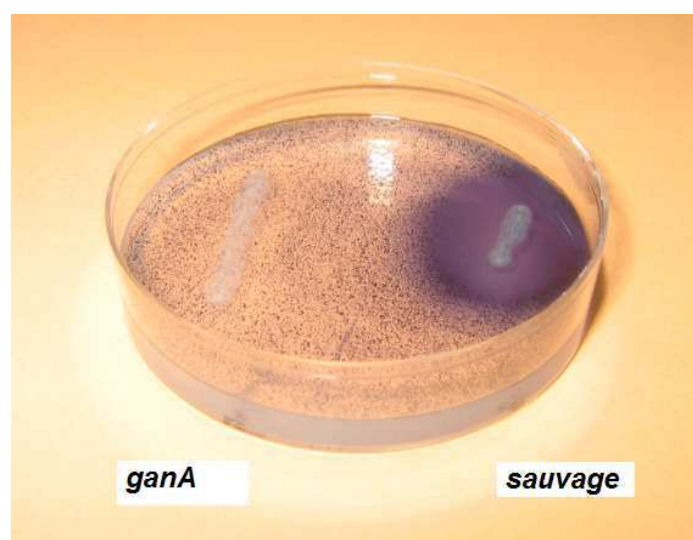


Figure 31 : Test d'activité endo-1,4- β -galactanase. Les souches EC3937 et NF3653 *ganA*::Cml sont déposées sur les boîtes AZCL-galactan[®]. Une activité endo-1,4- β -galactanase permet la formation d'un halo autour de la colonie. La souche EC3937 présente une activité endo-1,4- β -galactanase contrairement à la souche NF3653 *ganA*::Cml.

souches	Croissance sur galactose	Croissance sur galactanes	Croissance sur gal ₃ à gal ₆
3937 (sauvage)	1	0,7	0,7
A4809 (<i>ganA</i>)	1	0	0,13 (19%)*
A4807 (<i>ganB</i>)	1	0	0
A4868 (<i>ganL</i>)	1	0	0,17 (24%)*
A4810 (<i>ganE</i>)	1	0	0
NFB3701 (<i>ganK</i>)	1	0	0
A4863 (<i>ganR</i>)	1	0,7	0,7

Tableau 2 : Croissance de la souche sauvage et de différents mutants d’*E. chrysanthemi*. Les bactéries sont cultivées en milieu M63 contenant du galactose, des galactanes ou des oligogalactanes (gal₃ à gal₆) comme seule source de carbone (2g/L). Le rendement de croissance est exprimé à DO_{620nm} en phase stationnaire de croissance. (*)Les pourcentages représentent le rendement de croissance de la souche par rapport à celui de la souche sauvage (Cf. matériels et méthodes).

Souches	Activité β-galactosidase spécifique (nmol/min/mg)	Activité β-galactosidase spécifique en %
3937 (sauvage)	252	100
NFB3680 (<i>lacZ</i>)	241	96
A4807 (<i>ganB</i>)	7	3
NFB3687 (<i>lacZ, ganB</i>)	0	0
A4809 (<i>ganA</i>)	46	18
A4810 (<i>ganE</i>)	49	19
A4863 (<i>ganR</i>)	58	23

Tableau 3 : Activité β-galactosidase spécifique de la souche sauvage et de différents mutants d’*E. chrysanthemi*. L’activité spécifique est exprimée en nmole d’ONP libérée par min et par mg de protéines (Cf. matériels et méthodes).

La localisation de la protéine GanA a pu être déterminée par le dosage de l'activité endo-1,4- β -galactanase mesurée par l'AZO-galactan[®] (Cf. matériels et méthodes). La totalité de l'activité endo-1,4- β -galactanase est retrouvée dans le culot cellulaire (après centrifugation des bactéries) et aucune activité n'est détectée dans le surnageant. Près de 90% de l'activité est retrouvée dans les extraits périplasmiques. De plus, lors de l'étude protéomique du mutant *opgG* (Bouchart et coll., 2007), la protéine GanA est retrouvée en grande quantité dans les protéines solubles. La protéine GanA est donc bien périplasmique.

La protéine GanA a été purifiée à partir d'extraits périplasmiques et ses propriétés (activités enzymatiques en fonction du pH et de la température) ont été caractérisées par Aurélie Delangle (Delangle et coll., 2007). Ensemble, nous avons analysé, par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, les produits de dégradation des galactanes pectiques par GanA (dégradation *in vitro*). La digestion a été effectuée aux conditions optimales d'action de l'enzyme (50°C, dans du tampon acétate de sodium 0,2 M à pH 5,8). On observe une faible hétérogénéité du produit de dégradation. La dégradation est limitée à des molécules de plus de 5 résidus galactosyles. En effet, après 15 min d'incubation, on observe 66% de DP4 (DP = degré de polymérisation), 19% de DP3 et 14% de DP5. Cette production reste inchangée lors d'une incubation prolongée de 2h (Figure 32).

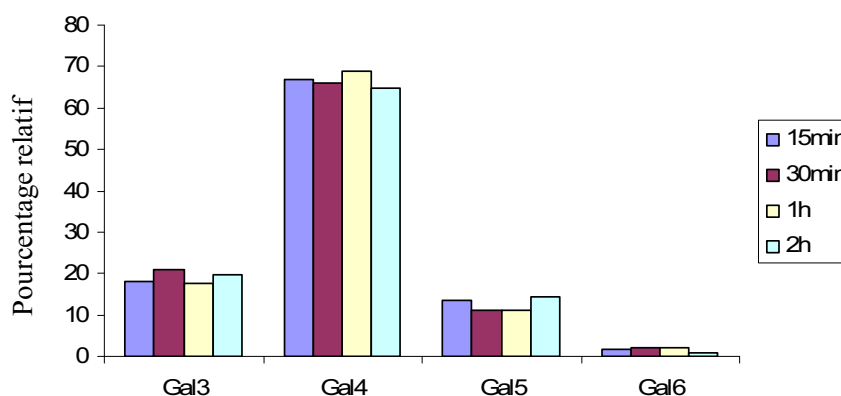


Figure 32: Distribution des produits de dégradation des galactanes par GanA après différents temps d'incubation à 50°C (Cf. Delangle et coll., 2007).

- **GanB : l'exo-1,4- β -galactanase**

En 1985, Hugouvieux Cotte Pattat & Robert-Baudouy ont effectué une étude de l'activité β -galactosidase chez *E. chrysanthemi* afin de pouvoir exprimer des fusions transcriptionnelles grâce au gène *lacZ* d'*E. coli*. Elle avait permis de mettre en évidence la présence de 2 activités

β -galactosidases codées par 2 gènes nommés *lacZ* et *lacB* sans que les gènes n'aient été localisés. Le séquençage du génome de la souche EC3937 a permis de confirmer que *lacZ* est présent chez *E. chrysanthemi*. Le gène *lacB* décrit semble donc correspondre à *ganB*. Le dosage de l'activité β -galactosidase a été effectué pour observer la part de l'activité β -galactosidase de *GanB* (Tableau 3). Pour cela, l'activité β -galactosidase de la souche sauvage, du mutant *lacZ* (Bouchart, 2006), du mutant *ganB* et du double mutant *ganB*, *lacZ* a été analysée en utilisant l'ONPG comme substrat. La majorité de l'activité β -galactosidase (96%) est retrouvée chez le mutant *lacZ*, une faible activité (3%) est présente chez le mutant *ganB*, et aucune activité β -galactosidase est détectée dans le double mutant *ganB*, *lacZ*. L'activité β -galactosidase observable chez le mutant *ganB* est donc due à l'activité de *LacZ* et celle observable chez le mutant *lacZ* provient donc de l'activité de *GanB*. Chez *E. chrysanthemi*, l'activité β -galactosidase est donc majoritairement assurée par la protéine *GanB* et minoritairement par la protéine *LacZ*. Il faut noter que les différentes souches testées lors du dosage ont été déposés sur des boîtes contenant du X-Gal, substrat très sensible à une activité β -galactosidase. Les souches EC3937, A4807 *ganB*, NFB3680 *lacZ*, sont bleues, alors que la souche NFB3687 *ganB*, *lacZ* est blanche. Il n'y a donc aucune autre activité β -galactosidase présente chez *E. chrysanthemi* et ces résultats indiquent que *lacB* et *ganB* sont le même gène.

De plus, l'activité β -galactosidase chez le mutant *ganA* et *ganE* représente environ 20 % de l'activité retrouvée pour la souche sauvage. Ces mutations ont donc un effet partiellement polaire sur le gène *ganB* (Figure 29).

Nous avons testé la croissance des mutants *ganB* et *lacZ* sur milieu solide contenant des galactanes comme seule source de carbone. Alors que la croissance pour le mutant *lacZ* est normale, aucune croissance n'est observée pour le mutant *ganB*. Ceci indique que *GanB*, contrairement à *LacZ*, est nécessaire pour l'utilisation des galactanes (Tableau 2).

b) Caractérisation du système de transport des galactanes.

Le gène *ganA* est entouré par des gènes typiques d'un système de transport de type ABC dont le paradigme est l'opéron maltose impliqué dans le transport des maltodextrines. On y retrouve une porine *GanL* dans la membrane externe, une protéine affine périplasmique *GanE*, deux protéines de la membrane interne *GanF* et *GanG*, une protéine d'utilisation de l'ATP *GanK*. Afin de caractériser le système de transport, nous avons comparé la croissance des mutants *gan* en présence de galactanes, d'oligogalactanes (*gal*₃ à *gal*₆ issus de la

dégradation des galactanes *in vitro* par GanA) et de galactose. Les mutants analysés sont les mutants *ganL* (porine), *ganK* (ATP^{asc}) et *ganE* (protéine affine périplasmique) (Tableau 2).

- Toutes les souches sont capables d'utiliser le galactose comme source de carbone avec le même rendement. Le système *gan* ne semble donc pas impliqué dans le transport du galactose. La souche sauvage et le mutant *ganR* présentent une croissance en présence de galactanes et d'oligogalactanes (gal₃ à gal₆) avec un rendement de 70%. Les mutants *ganL*, *ganA* ne sont pas capables d'utiliser les galactanes mais utilisent les gal₃ à gal₆ comme seule source de carbone avec un rendement d'environ 20%. Les mutants *ganE*, *ganB* et *ganK* ne sont capables d'utiliser ni les galactanes ni les gal₃ à gal₆.

- Ainsi l'absence de croissance du mutant *ganL* sur les galactanes indique que cette porine est bien spécifique du transport des galactanes. Cette mutation ne peut engendrer de mutation polaire sur d'autres gènes puisqu'il est le seul dans l'unité transcriptionnelle. La porine est donc essentielle pour le transport. La croissance de 20% du mutant *ganL* en présence des gal₃ à gal₆ nous laisse penser que les petits oligomères (gal₃) pourraient diffuser à travers la membrane externe de façon aspécifique par les porines majeures.

- L'absence de croissance des mutants *ganE* et *ganK* en présence de galactanes ou d'oligogalactanes montre que ces protéines sont spécifiques et nécessaires au transport des galactanes. Il faut noter que le dosage de l'activité β -galactosidase (Tableau 3) chez le mutant *ganE* représente environ 20 % de l'activité retrouvée pour la souche sauvage. La mutation *ganE* n'est donc pas totalement polaire. L'absence de croissance du mutant *ganE* ne peut donc s'expliquer par l'absence des protéines GanA et/ou GanB.

B. Régulation des gènes *gan*.

1. Effet de la source de carbone sur l'expression des gènes *gan*

a) Effet des conditions de culture sur l'expression des fusions transcriptionnelles

Nous prédisons 4 unités de transcription pour le locus *gan* : *ganR*, *ganL*, *ganEFGABC* et *ganK* (Figure 29). Afin de déterminer la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'utilisation des galactanes, Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et moi-même avons construit des fusions transcriptionnelles dans les gènes *ganA* (A4809), *ganB* (A4807), *ganE* (A4810), *ganK* (NFB3701) et *ganL* (A4868) avec le gène *uidA*, gène codant l'activité β -glucuronidase. Le dosage de l'activité β -glucuronidase a été effectué sur des extraits de

cultures des différents mutants cultivés en milieu minimum en présence de différentes sources de carbone (glycérol, galactose, glucose ou saccharose). Les dosages sont effectués pour des souches prélevées en phase exponentielle (DO_{620nm} de 0,8) (voir matériels et méthodes).

En présence de glucose et de saccharose, l'expression diminue d'un facteur 3 (*ganB*) à un facteur 7 (*ganL*) par rapport à l'expression en présence de galactose ou de glycérol (Figure 33). Ces résultats nous laissent penser que les gènes du locus *gan* sont soumis à la répression catabolique contrôlée par la protéine CRP (« cAMP receptor protein »). Par ailleurs, la recherche de la séquence consensus de la protéine Crp par un logiciel (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/cgi/consensus2.cgi>) a permis de mettre en évidence au moins un site consensus en amont des promoteurs des 3 unités transcriptionnelles : *ganEFGABC*, *ganK* et *ganL*.

Ce type de régulation a déjà été décrit pour plusieurs systèmes impliqués dans la dégradation de la paroi des cellules végétales chez *E. chrysanthemi* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). Ces résultats sont confirmés grâce à l'étude du mutant *crp::Cml* qui montre bien la perte d'activation. En effet, nous avons transduit la mutation *crp::Cml* dans les souches contenant les fusions *ganK::uidA*, *ganE::uidA* ou *ganL::uidA* (Figure 34). Nous avons analysé l'expression des fusions pour des cultures réalisées en milieu 63 contenant du glucose comme source de carbone. La mutation *crp* engendre respectivement une diminution de 3 et de 5 fois pour l'expression de *ganK::uidA* et de *ganE::uidA* et une diminution de 83 fois est observée pour l'expression de *ganL::uidA*. Pour les gènes pectinolytiques, une diminution de 2 à 260 fois est observée dans un contexte *crp* selon les gènes testés (Reverchon et coll., 1997). Le locus *gan* est donc bien soumis à la répression catabolique.

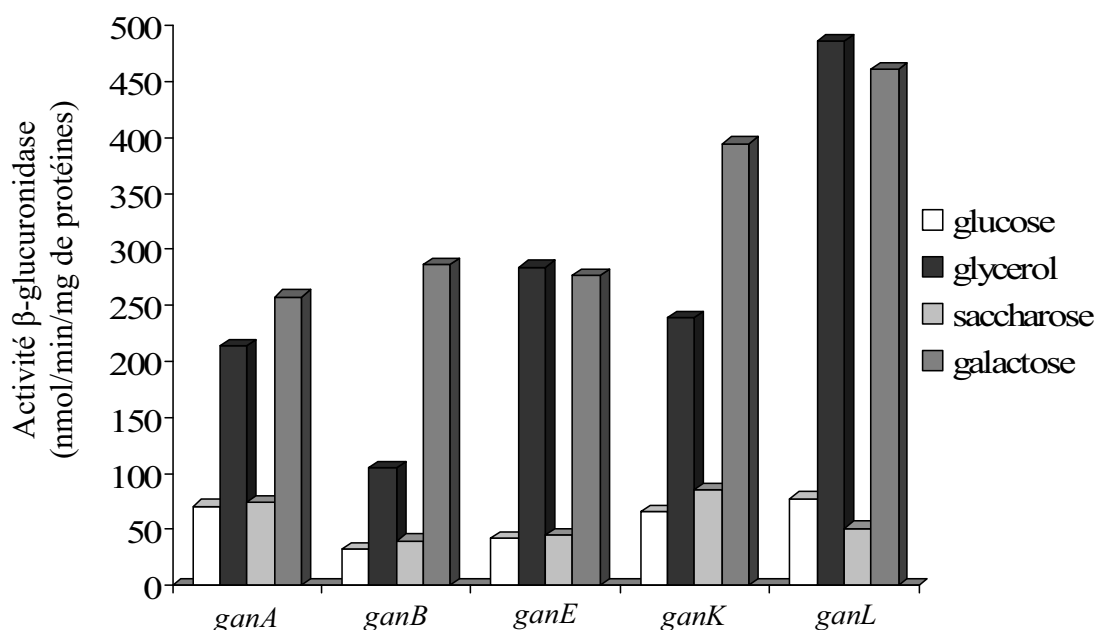


Figure 33 : Activité β -glucuronidase des fusions transcriptionnelles des gènes *ganA*, *ganB*, *ganE*, *ganK*, *ganL* avec le gène *uidA* en fonction de différentes sources de carbone. Les activités sont exprimées en $\Delta DO_{410nm}/min/mg$ de protéines.

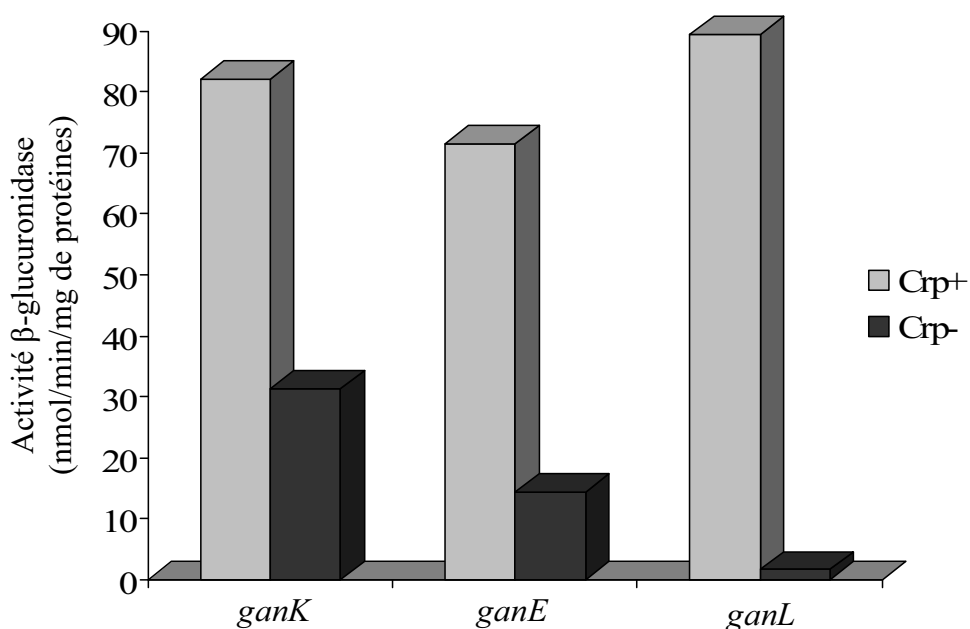


Figure 34 : Activité β -glucuronidase des fusions transcriptionnelles des gènes *ganK*, *ganE* et *ganL* avec le gène *uidA* mesurée dans un contexte sauvage (*Crp+*) ou dans un contexte *crp::Cml* (*Crp-*) en milieu minimum contenant du glucose comme source de carbone. Les activités sont exprimées en unité arbitraire $\Delta DO_{410nm}/min/mg$ de protéines.

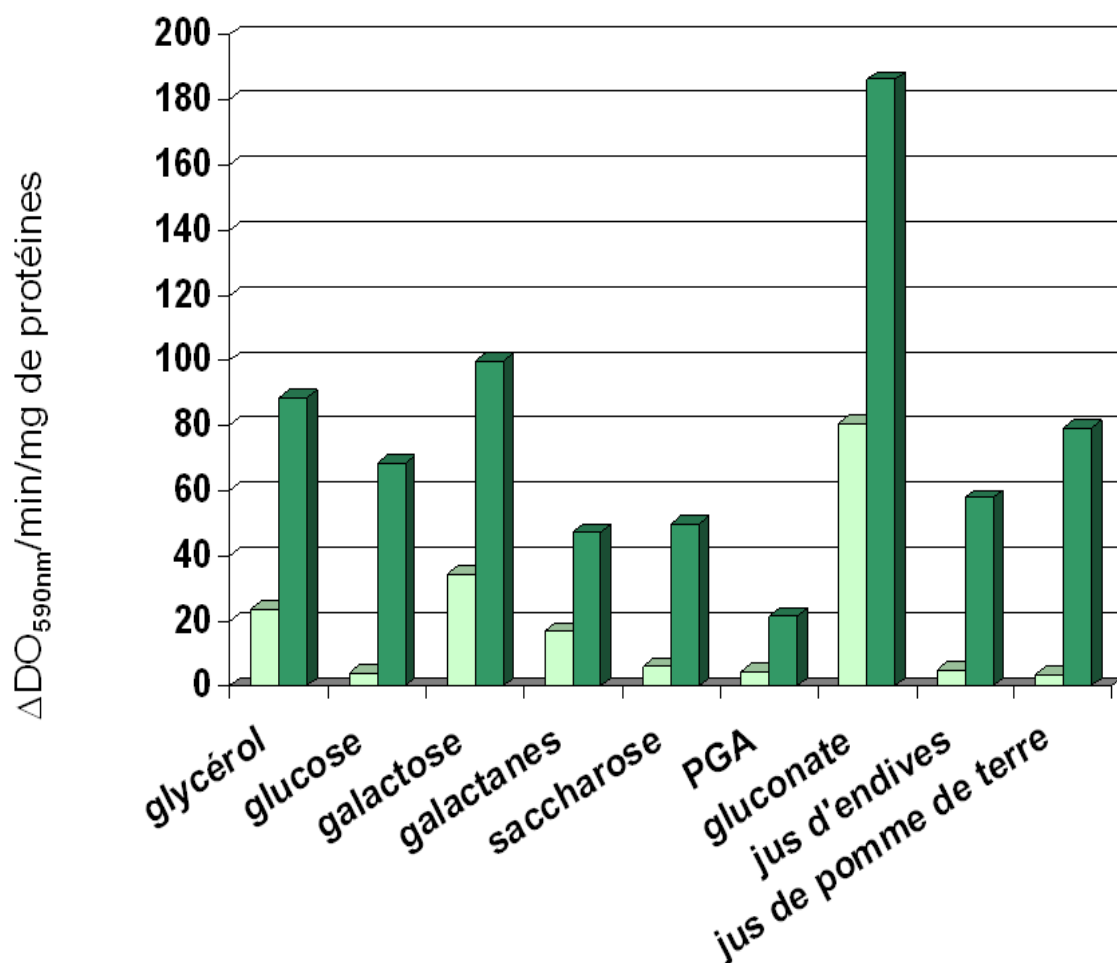


Figure 35: Dosage de l'activité endo-1,4-β-galactanase (GanA) en présence de différentes sources de carbone. Les activités sont exprimées en unité arbitraire $\Delta A_{590nm}/min/mg$ de protéines. Les activités de la phase exponentielle sont représentées en vert clair et les activités en phase stationnaire en vert foncé.

	Phase exponentielle	Phase stationnaire
glycérol	100	100
glucose	17	77
galactose	145	113
galactanes	70	54
saccharose	24	57
PGA	19	24
gluconate	342	211
jus d'endives	20	65
jus de pommes de terre	14	90

Tableau 4 : Pourcentage de l'activité endo-1,4-β-galactanase (GanA) par rapport à l'activité en glycérol en phase exponentielle ou stationnaire (100%). Les activités dites de base sont surlignées en jaune, les activités présentant une diminution ne sont pas surlignées (blanc) et l'activité présentant une augmentation est surlignée en orange.

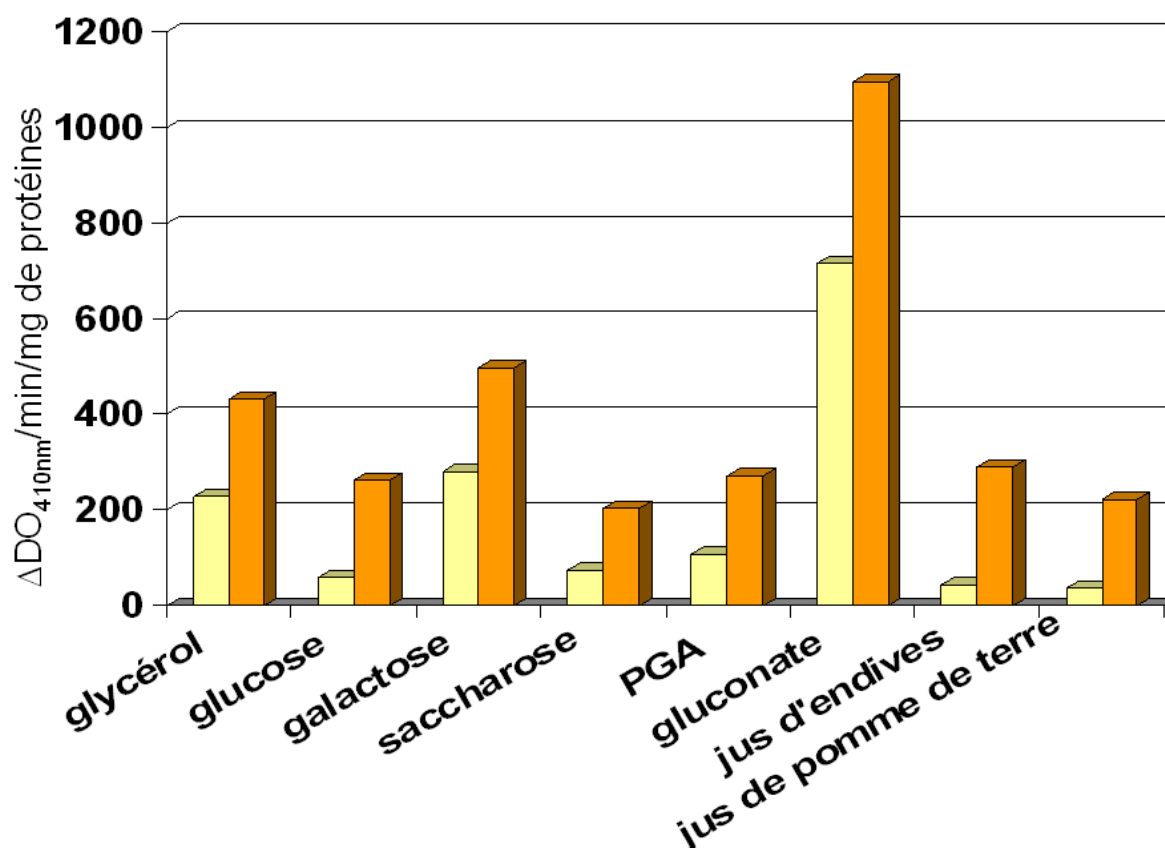


Figure 36: Dosage de l'activité glucuronidase de la fusion transcriptionnelle *ganA::uidA* en présence de différentes sources de carbone. Les activités sont exprimées en unité arbitraire $\Delta A_{410nm}/\text{min/mg}$ de protéines. Les activités de la phase exponentielle sont représentées en jaune et les activités de la phase stationnaire en orange.

	Phase exponentielle	Phase stationnaire
glycérol	100	100
glucose	26	60
galactose	123	115
saccharose	33	47
PGA	47	63
gluconate	312	253
jus d'endives	19	67
jus de pomme de terre	16	51

Tableau 5 : Pourcentage de l'activité glucuronidase de la fusion transcriptionnelle *ganA::uidA* par rapport à l'activité en glycérol en phase exponentielle ou stationnaire (100%). Les activités dites de base sont surlignées en jaune, les activités présentant une diminution ne sont pas surlignées (blanc) et l'activité présentant une augmentation est surlignée en orange.

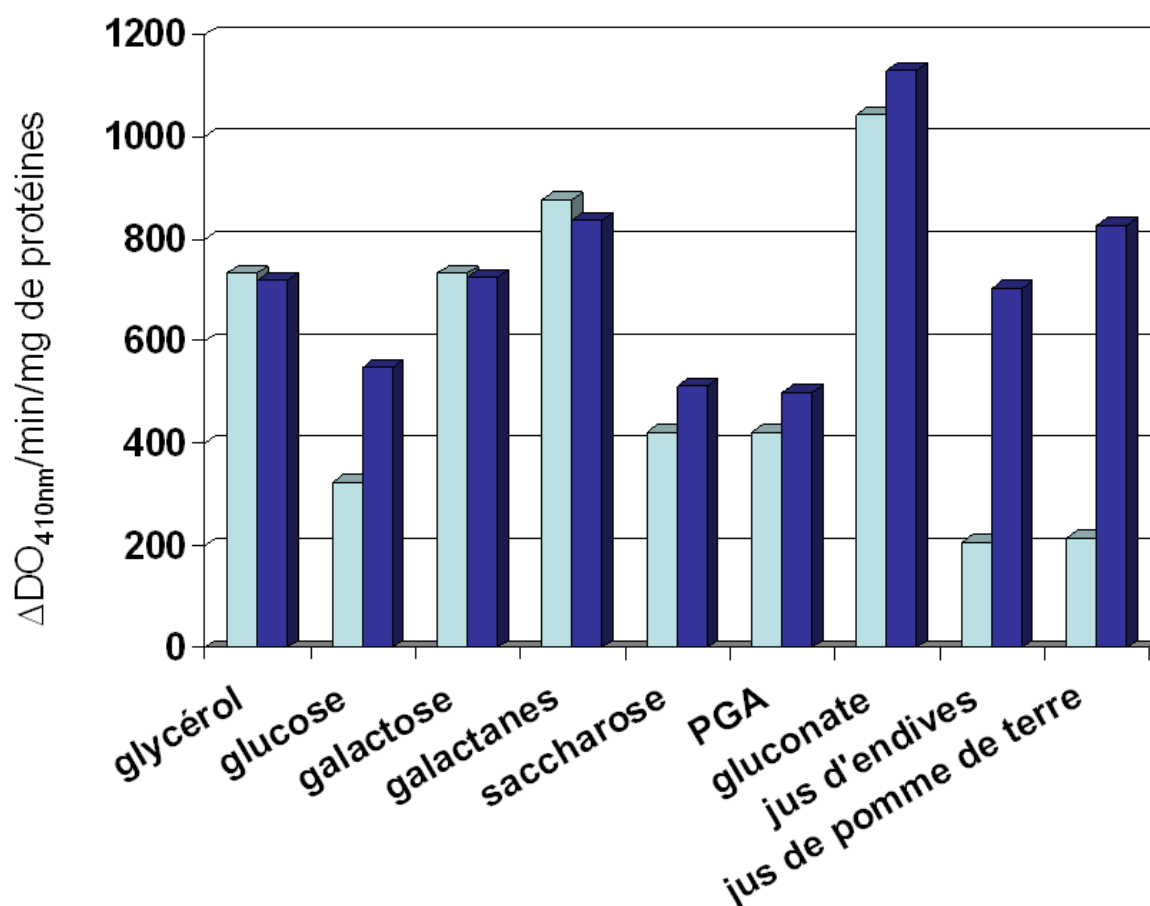


Figure 37 : Dosage de l'activité exo-1,4-β-galactanase (GanB) en présence de différentes sources de carbone. Les activités sont exprimées en unité arbitraire $\Delta A_{410nm}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Les activités de la phase exponentielle sont représentées en bleu clair et les activités de la phase stationnaire en bleu foncé.

	Phase exponentielle	Phase stationnaire
glycérol	100	100
glucose	44	76
galactose	100	101
galactanes	120	116
saccharose	58	71
PGA	58	69
gluconate	142	157
jus d'endives	28	98
jus de pommes de terre	29	115

Tableau 6 : Pourcentage de l'activité exo-1,4-β-galactanase (GanB) par rapport à l'activité en glycérol en phase exponentielle ou stationnaire (100%). Les activités dites de base sont surlignées en jaune, les activités présentant une diminution ne sont pas surlignées (blanc) et l'activité présentant une augmentation est surlignée en orange.

b) Effet des conditions de culture sur l'activité endo-1,4- β -galactanase.

- **Effet sur l'activité de GanA**

Le dosage de l'activité endo-1,4- β -galactanase a été effectué sur des extraits de cultures de la souche sauvage EC3937 en présence de différentes sources de carbone. Les souches sont prélevées en phase exponentielle puis en phase stationnaire (voir matériels et méthodes).

Quelque soit la phase de croissance (phase exponentielle ou stationnaire), on observe les mêmes effets de la source de carbone, c'est à dire une activité galactanase de base pour le glycérol, le galactose et pour les galactanes. On observe une activité galactanase réduite en présence de glucose, saccharose, PGA, jus d'endives et jus de pomme de terre. Enfin, on observe une activité maximale pour le gluconate (Figure 35).

- **Effet sur la fusion transcriptionnelle *ganA::uidA***

Cet effet a été en partie étudié dans le paragraphe précédent lors de la comparaison de l'effet des conditions de culture sur l'expression de toutes les fusions transcriptionnelles (*ganA*, *ganB*, *ganE*, *ganK* et *ganL*) (Figure 33).

Le dosage de l'activité β -glucuronidase de la fusion transcriptionnelle *ganA::uidA* a été effectué sur des extraits de cultures de la souche NFB3678 en présence de différentes sources de carbone. Les souches sont prélevées en phase exponentielle puis en phase stationnaire (voir matériels et méthodes).

Quelque soit la phase de croissance (phase exponentielle ou stationnaire), on observe les mêmes effets de la source de carbone, c'est à dire une activité β -glucuronidase de base pour le glycérol et le galactose. On observe une activité galactanase réduite en présence de glucose, saccharose, PGA, jus d'endives et jus de pomme de terre. Enfin, on observe une activité maximale pour le gluconate (Figure 36).

c) Effet des conditions de culture sur l'activité exo-1,4- β -galactanase

Le dosage de l'activité exo-1,4- β -galactanase a été effectué sur des extraits de cultures de la souche sauvage EC3937 en présence de différentes sources de carbone (nous considérons que l'expression de *lacZ* est négligeable par rapport à l'expression de *ganB*). Les extraits utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour le dosage de l'activité endo-1,4- β -galactanase (Figure 37).

Quelque soit la phase de croissance (phase exponentielle ou stationnaire), on observe une activité β -galactosidase de base pour le glycérol, pour le galactose et pour les galactanes. On observe une activité β -galactosidase réduite en présence de glucose, saccharose, PGA, jus d'endives et jus de pomme de terre. On observe une forte activité pour le gluconate.

Il faut noter que dans tous les cas (*ganA::uidA*, GanA et GanB), les différences d'expression entre les différentes sources de carbone sont plus faibles en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Tableau 4,5 et 6).

De plus, on observe que les différences d'expression entre les différentes sources de carbone sont plus faibles pour l'activité exo-1,4- β -galactanase (GanB) que pour l'activité exo-1,4- β -galactanase (GanA).

2. Effet de la phase stationnaire sur l'expression des gènes *gan*

Les dosages des activités endo-1,4- β -galactanase, β -glucuronidase (fusion *ganA::uidA*) et exo-1,4- β -galactanase montrent qu'il existe une différence d'activité entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Tableau 7).

	endo-1,4- β -galactanase GanA	β -glucuronidase (<i>ganA::uidA</i>)	exo-1,4- β -galactanase (β -galactosidase) GanB
glycérol	3,7	2,2	1
glucose	17,2	5,2	1,7
galactose	2,9	1,8	1
galactanes	2,9	ND	1,1
saccharose	8,7	2,4	1,2
PGA	4,7	3,2	1,2
gluconate	2,3	1,7	1
jus d'endives	12,1	6,6	3,4
Jus de pomme de terre	24,5	5	3,8

Tableau 7 : rapports d'activités entre la phase exponentielle et la phase stationnaire des souches EC3937 pour les activités endo-1,4- β -galactanase et exo-1,4- β -galactanase et NF3678 pour l'activité β -glucuronidase. L'activité β -glucuronidase en présence de galactanes comme seule source de carbone n'est pas réalisable (ND) puisque la souche NF3678 *ganA::uidA*-Kan n'est pas capable d'utiliser les galactanes. Les activités dites de base sont surlignées en jaune, les activités présentant une diminution d'expression ne sont pas surlignées (blanc) et l'activité présentant une augmentation d'expression est surlignée en orange.

On observe tout d'abord que les rapports de niveaux d'expression sont plus élevés pour l'activité de l'endo-1,4- β -galactanase, que pour les activités β -glucuronidase (*ganA::uidA*) et exo-1,4- β -galactanase. Pour les activités qui présentaient une expression faible (en présence de glucose, saccharose, PGA), on observe un rapport d'activité plus important que pour celles qui présentaient les activités dites de base (glycérol, galactose et galactanes). On observe un rapport élevé lors de l'étude en présence de jus de pomme de terre et jus d'endives. Nous avons donc une augmentation de l'expression en phase stationnaire dont le niveau varie en fonction des conditions. Les activations sont plus importantes pour la protéine GanA que pour celles de GanB où l'activation en phase stationnaire est visible uniquement pour les cultures en présence de jus. Les profils d'activation mesurés pour les activités β -glucuronidase et exo-1,4- β -galactanase sont comparables.

L'expression la plus importante a lieu, dans les 3 cas (activité β -galactanase, β -glucuronidase et β -galactosidase), lors de la croissance en gluconate comme seule source de carbone. Dans ce milieu où la croissance est très lente (temps de génération de 4 heures contre 2 heures environ pour toutes les autres sources de carbone y compris les jus de pomme de terre et d'endive), on observe un comportement de la bactérie voisin de celui observé en phase stationnaire. Nous avons donc voulu voir si le gluconate jouait un rôle spécifique. Pour cela, nous avons cultivé la souche NF3678 *ganA::uidA*-Kan en présence de galactose ou de gluconate, complémenté ou non en acides aminés. L'ajout d'acides aminés va permettre de diminuer le temps de génération pour la culture en gluconate (2 heures contre 4 heures) mais n'influence pas le temps de génération pour la culture en galactose. Le dosage de l'activité β -glucuronidase en phase exponentielle a permis de montrer plusieurs choses :

- * Tout d'abord, l'ajout d'acides aminés ne fait pas varier l'expression de la β -glucuronidase pour la culture de galactose. L'ajout d'acides aminés ne fait donc varier que le temps de génération et ne fait pas varier l'expression de la β -glucuronidase.

- * Lorsque l'on s'intéresse à l'activité β -glucuronidase en présence ou non d'acides aminés dans le milieu minimum complémenté en gluconate, on n'obtient pas de différence significative d'activité β -glucuronidase (entre le gluconate et le gluconate avec acides aminés). Les différences observées entre les résultats obtenus pour les cultures en galactose et en gluconate sont conservées avec l'ajout d'acides aminés. Cet ajout fait donc varier le temps de génération mais n'influence pas l'expression de la β -glucuronidase. Ce n'est donc pas le ralentissement de croissance qui explique les résultats obtenus pour le gluconate. Le gluconate a donc un rôle spécifique dans l'activation.

3. Effet de GanR sur l'expression des gènes *gan*

Le locus *gan* comprend le gène *ganR* codant un régulateur transcriptionnel semblable à LacI (62% de similarité) : le répresseur de l'opéron lactose chez *E. coli*. *ganR* est également présent chez *Y. pseudotuberculosis*, mais il est absent d'*E. carotovora*.

Afin de caractériser le rôle de GanR dans la régulation du locus, j'ai construit un mutant *ganR* (NFB3758). Ce mutant et la souche sauvage ont été déposés sur un milieu 63 complété en source de carbone et contenant en surcouche de l'AZCL galactan[®]. On observe alors une taille réduite du halo de dégradation de la souche *ganR* par rapport à la souche sauvage. De plus, l'expression de l'activité β -galactosidase de la souche *ganR* est également diminuée (nous considérons que l'expression de *lacZ* est négligeable par rapport à l'expression de *ganB*) (Tableau 3).

Parallèlement à notre étude, Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat a construit un mutant *ganR* (A4863). Elle s'est intéressée à l'impact de cette mutation sur les fusions *ganK::uidA* et *ganE::uidA* (Figure 38). L'activité β -glucuronidase des fusions a été mesurée dans un contexte sauvage et *ganR*. L'expression des fusions *ganE::uidA* et *ganK::uidA* est affectée par l'absence de GanR, puisque l'expression diminue respectivement d'un facteur 8 et 5. GanR active donc l'expression des gènes du locus *gan*.

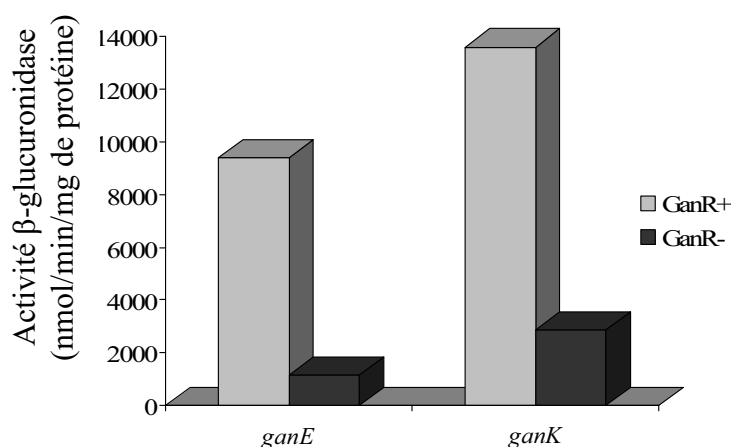


Figure 38 : Activité β -glucuronidase des fusions transcriptionnelles des gènes *ganE* et *ganK* avec le gène *uidA* dans un contexte sauvage ou dans un contexte *ganR::Cml* dans un milieu minimum contenant du glycérol comme source de carbone.

4. Rôle du locus *gan* dans l'infection de l'hôte

a) Impact sur la virulence

Des tests de virulence sur pomme de terre et sur feuille d'endives ont été réalisés afin de voir l'impact de chaque mutation du locus (*ganA*, *ganB*, *ganE*, *ganK*, *ganL* et *ganR*) sur la virulence. Aucune différence de macération n'a été observée chez les différents mutants et la croissance n'est pas affectée non plus. L'étude de l'impact des mutations sur la virulence a donc permis de montrer que ces gènes n'avaient pas une implication majeure dans la virulence dans les conditions testées en laboratoire. Une conclusion similaire a été tirée de l'étude des cellulases (endoglucanases) (Boccard et coll., 1994). Les principaux facteurs restent donc les pectinases qui sont nécessaires à la déstructuration de la paroi des cellules végétales. Cette pectinolyse permet alors de libérer différents oligomères qui entreront dans le périplasme, dont les galactanes qui seront donc utilisés grâce aux protéines Gan.

b) Expression du locus lors de l'infection

L'analyse de l'expression des fusions transcriptionnelles *ganA::uidA*, *ganE::uidA* a été réalisée après infection de feuilles d'endive pendant 24H et à 30°C. L'expression d'une fusion *pelD::uidA* (*pelD* codant une pectate-lyase) a été utilisée comme témoin, puisque il a été montré qu'elle était fortement exprimée *in planta* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992). *ganA* et *ganE* sont fortement transcrits dans le tissu macéré, respectivement 4 et 3 fois plus que *pelD* (Figure 39).

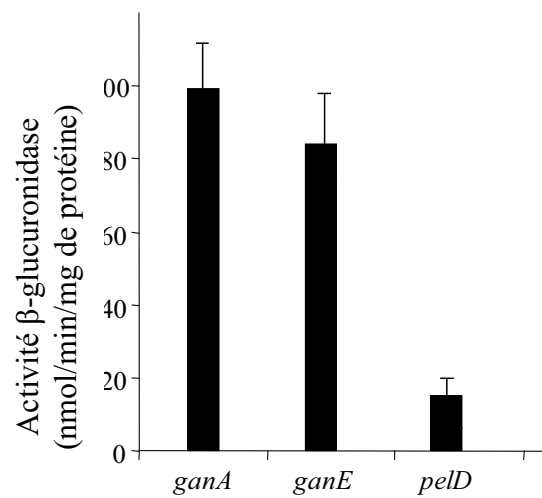


Figure 39 : Activité β -glucuronidase des fusions des gènes *ganA*, *ganE* et *pelD* après 24h de macération sur les feuilles d'endives, d'après Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (Delangle et coll., 2007)

C. Relation entre le locus *gan*, les OPG et le système RcsCDB

Lors de l'étude protéomique du mutant *opgG*, on a observé que la protéine GanA était surexprimée d'un facteur 4,4 dans un mutant *opgG* par rapport à la souche sauvage (Bouchart et coll., 2007) et sous exprimé dans le mutant *rscC2* d'un facteur 0,8 (Delangle, 2007). Cette protéine est très abondante. J'ai donc voulu voir si il existait un lien entre l'expression du gène *ganA*, les OPG et le système RcsCDB en regardant l'impact des mutations *opgG* et $\Delta rcsCBD$ sur l'expression de la fusion *ganA::uidA*.

Le dosage de l'activité β -glucuronidase a été effectué sur des bactéries perméabilisées (Cf. matériels et méthodes). Les cultures ont été effectuées en LB sans NaCl et arrêtées en phase stationnaire (Figure 40).

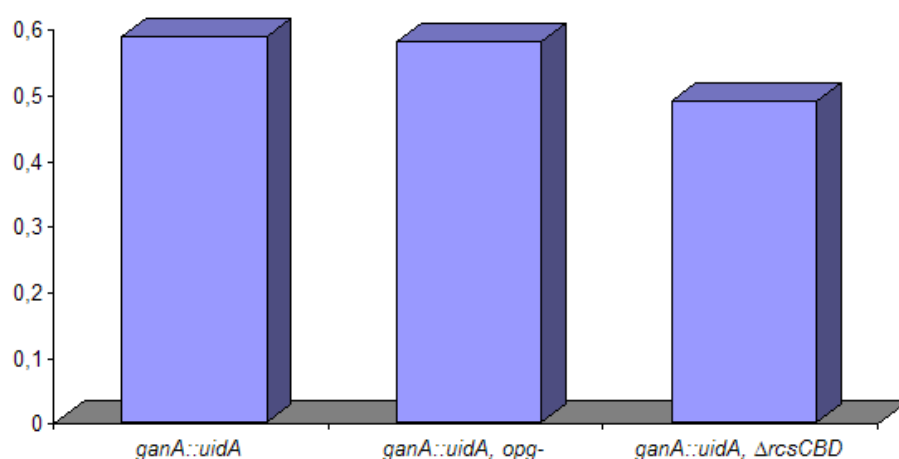


Figure 40 : Activité β -glucuronidase de la fusion *ganA::uidA* dans un contexte sauvage, *opgG* et $\Delta rcsCBD$ dans un milieu LB-NaCl. Les cellules ont été arrêtées en phase stationnaire et perméabilisées pour faire le dosage. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 dosages indépendants.

Nous avons observé le même niveau d'expression de la fusion *ganA::uidA* pour la souche NFB3678 (*ganA::uidA*) et NFB3718 (*opgG, ganA::uidA*). Par contre, nous observons que la fusion *ganA::uidA* est exprimée à 80% dans la souche NFB3843 ($\Delta rcsCBD, ganA::uidA$) par rapport à la souche NFB3678 (*ganA::uidA*).

Aurélié Delangle a réalisé le dosage de l'activité endo-1,4- β -galactanase et a trouvé des résultats similaires. Il semble donc qu'il y ait eu une différence d'expression du gène *ganA* lors de l'analyse protéomique du mutant *opgG*.

D. Conclusion et discussion

Ce travail constitue la première description du locus *gan* chez *E. chrysanthemi*. Nous avons supposé que ce locus était impliqué dans la dégradation et le transport d'oligogalactanes issus de la pectine de la paroi végétale (Figure 40). La dégradation de la paroi des cellules végétales est assurée par la production de différentes enzymes, principalement les pectinases ainsi que les cellulases et les protéases. Les pectinases sont les seules à être nécessaires pour le développement de la pourriture causée par *E. chrysanthemi* (Collmer et Keen, 1986). Elles sont nécessaires pour déstructurer la pectine afin d'en libérer des sous fractions qui seront utilisées comme source de carbone pour la croissance dans les tissus végétaux.

Le locus identifié comporte 9 gènes :

- cinq sont impliqués dans le transport dont quatre gènes (*ganE*, *ganF*, *ganG*, et *ganK*) codant un système de transport de type ABC et le gène *ganL* codant une porine. Le gène codant la porine a été initialement annoté *lamB*, cette annotation est inappropriée puisque *E. chrysanthemi* 3937 est résistante au phage λ et qu'elle est incapable d'utiliser le maltose ou les maltodextrines comme source de carbone.
- Deux sont impliqués dans la dégradation du substrat : les gènes *ganA* et *ganB* codant des glycosides hydrolases (endo β -1,4-galactanase et exo β -1,4-galactanase) intervenant dans la dégradation des β -1,4-galactanes en galactose.
- Le gène *ganC* code un fragment de l'enzyme IIBC de système PTS. Bien que cette protéine soit conservée parmi plusieurs espèces bactériennes, aucune fonction n'a pu lui être prédite, ni attribuée.
- Le dernier gène, *ganR*, code un régulateur transcriptionnel.

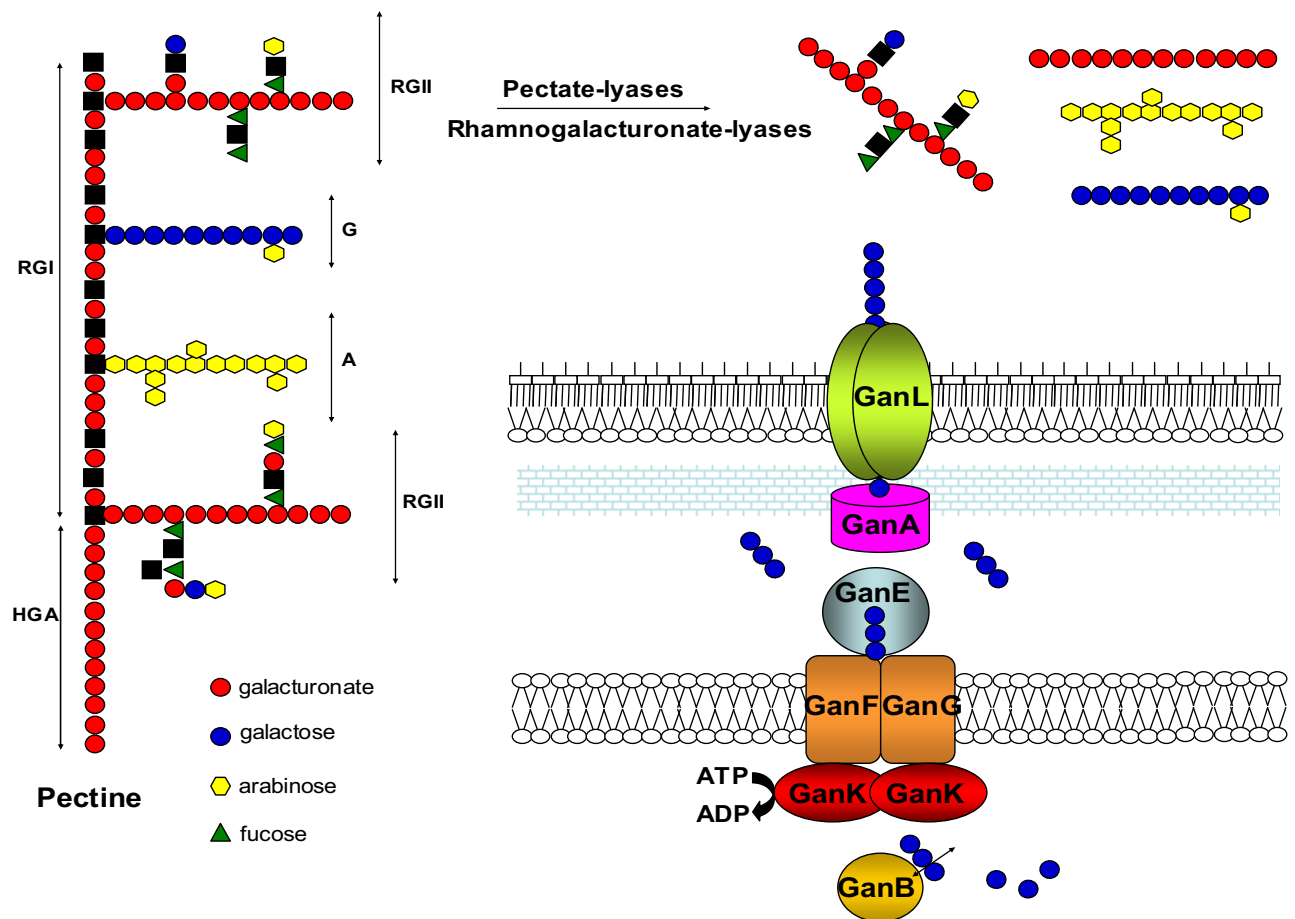


Figure 41 : Représentation schématique chez *E. chrysanthemi* du système *gan* impliqué dans le transport et le catabolisme des galactanes. Après l'action d'enzymes pectinolytiques, les galactanes (G) libérés traversent la membrane externe par la porine GanL, sont dégradés dans le périplasma par GanA en galactotriose puis pris en charge par la protéine affine GanE qui amène ces oligomères au système de transport de type ABC, GanFGK₂. Ces oligomères sont ensuite dégradés dans le cytoplasme en galactose.

Nous avons comparé la croissance des mutants *gan* en présence de galactanes, de gal₃ à gal₆ (issus de la dégradation des galactanes *in vitro* par GanA) et de galactose. Les mutants *gan* ne sont plus capables de croître en présence de galactanes comme seule source de carbone, seuls les mutants *ganL* et *ganA* sont capables de croître en présence des produits de dégradation des galactanes et enfin toutes les souches sont capables d'utiliser le galactose. Par contre, aucune souche n'est capable d'utiliser le galactobiose, y compris la souche sauvage.

Nous proposons donc le modèle suivant (Figure 41): les chaînes de galactanes diffusent à travers la membrane externe par la porine GanL, GanA capture les galactanes au cours de leur entrée par GanL et les clive dans le périplasma. Ces oligomères sont pris en charge par GanE, la protéine affine périplasmique qui les amènent au complexe GanFGK₂, permettant le transport à travers la membrane interne. GanB clive alors les oligomères en galactose qui seraient pris en charge par les protéines GalKTE, permettant ainsi la synthèse d'UDP-Galactose. L'activité de GanB est l'activité β -galactosidase majoritaire, alors que l'autre activité β -galactosidase codée par *lacZ* est minoritaire. *E. chrysanthemi* est incapable de métaboliser le lactose comme seule source de carbone bien qu'elle possède une activité β -galactosidase. Le rôle du gène *lacZ* reste donc peu clair.

La protéine GanA permet *in vitro* la production de gal₃ à gal₆ issus de la dégradation *in vitro* des galactanes, avec en majorité des gal₄. Cependant un mutant *ganL* ou *ganA* ne permet un rendement de croissance que de 20%, ce qui correspond à la proportion de gal₃, suggérant que la fraction utilisable par la bactérie est constituée des gal₃. La différence de taille des produits issus de la dégradation des galactanes *in vitro* (gal₃ à gal₆) et *in vivo* (potentiellement les gal₃) pourrait s'expliquer par l'absence des protéines GanL et GanE lors de la production *in vitro* des gal₃ à gal₆. Il pourrait donc y avoir un contrôle de GanA impliqué dans la dégradation des galactanes par ces protéines (GanL et GanE). Ainsi *in vivo*, GanA permettrait donc de produire des gal₃, qui sont transportés par GanFGK₂, les galactotrioses sont alors dégradés en galactose par l'exo β -1,4-galactanase GanB.

Les endo- β -1,4-galactanases présentent plusieurs localisations :

- Elle peut avoir une localisation extracellulaire, c'est le cas pour *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*. Cette localisation extracellulaire permet à l'endo- β -1,4-galactanase de dégrader directement les galactanes liés à la pectine (De Vries et coll., 2002 ; Shipkowski et Brenchley, 2006. ; Braithwaite et coll., 1997).
- Chez *Bifidobacterium longum*, cette enzyme est extracellulaire mais ancrée dans la membrane (Hinz et coll., 2005), ce qui la rapproche de celle d' *E. chrysanthemi*. Le substrat

ne sera utilisable que lorsque les galactanes seront libérés par d'autres enzymes qui auront dégradé la pectine et libéré les galactanes.

- Pour *E. chrysanthemi*, la localisation périplasmique de GanA implique un système de transport relativement complexe. Il nécessite d'abord les pectinases qu'elle synthétise afin de libérer les galactanes de la pectine, puis un système de transport et de dégradation pour cliver et transporter à travers l'enveloppe les oligogalactanes utilisable par la bactérie.

Ce système est complexe mais il peut présenter un avantage car la bactérie dégrade les galactanes uniquement pour sa propre utilisation. Une localisation extracellulaire entraînerait une dégradation directe des galactanes en oligosaccharides disponibles pour d'autres bactéries se trouvant aux alentours mais ne l'obligerait pas à avoir un système de transport aussi sophistiqué.

L'ensemble des gènes de ce locus est conservé avec la même organisation chez *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Cette conservation suggère que différentes espèces de *Yersinia* ont aussi les capacités de transporter et cataboliser les β -1,4-galactanes. Cela peut paraître surprenant puisque à ma connaissance, les galactanes ne sont présents que dans les plantes. Cependant des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques actives ont déjà été identifiées chez des entérobactéries qui ne sont pas phytopathogènes, comme une pectate-lyase chez *Y. pseudotuberculosis* (Manulis et coll., 1988), une pectate-lyase chez *Y. enterocolitica* (Liao et coll., 1999) ou une carboxyméthylcellulase chez *Salmonella typhimurium* (Yoo et coll., 2004). Ces enzymes pourraient alors servir à la nutrition des bactéries pour leur survie en tant que saprophytes.

L'étude de la régulation a permis de mettre en évidence l'implication de 3 facteurs :

- CRP comme pour de nombreuses enzymes pectinolytiques (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992 ; Bourson et coll., 1993). Un mutant *crp* présente bien une perte d'activation.
- la phase de croissance puisqu'on observe une augmentation en phase stationnaire.
- GanR : ces gènes sont également contrôlés par un régulateur spécifique. GanR appartient à la famille des répresseurs de type LacI, mais il semble agir comme activateur de l'expression des gènes *gan*. Cette régulation est peu significative chez *E. chrysanthemi*. De plus chez *E. carotovora*, tous les gènes *gan* sont présents à l'exception de *ganR*. Nous pouvons envisager une différence de régulation chez les bactéries pectinolytiques, ainsi qu'une expression et un rôle de GanR faibles chez *E. chrysanthemi*. Les régulateurs

transcriptionnels de type LacI sont connus pour reconnaître un site de fixation composé de deux séquences imparfaites répétées inversées de 9 nucléotides avec une paire centrale de GC (Gelfand et Laikova, 2003). Nous avons donc recherché l'existence de tels sites dans le locus *gan*. Un palindrome imparfait avec une paire centrale de GC a été reconnu dans les régions intergéniques *ganK-ganE* et *ganR-ganL*. La séquence consensus du site potentiel de fixation de GanR est la suivante : ATGTGAACGTAatACaT. La présence d'un consensus nous permet d'envisager que GanR régule directement l'expression des gènes du locus *gan*.

Deux études protéomiques ont montré que la souche EC3937 présentait une grande quantité de l'endo β -1,4-galactanase GanA pour des cultures en milieu riche (LB) ou en milieu minimum (M63) (Bouchart et coll., 2007 ; Babujee et coll., 2007). Nous ne pouvons donc exclure une dérégulation dans la souche EC3937.

Certaines études réalisées au laboratoire (Bouchart et coll., 2007 et Delangle, 2007) montraient que l'expression de la protéine semblait affectée dans un mutant *opgG* et un mutant *rcsC2*. Le système RcsCDB est connu pour réguler de nombreux gènes impliqués dans la virulence et l'absence d'OPG entraîne un phénotype pléiotrope dont l'absence de virulence et une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'exoenzymes. J'ai donc voulu voir l'impact des mutations *opgG* et Δ *rcsCBD* sur l'expression du gène *ganA*. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative d'expression du gène *ganA* dans ces deux contextes. Le régulon *gan* ne semble donc pas être sous le contrôle du système RcsCDB et ne semble pas affecté par l'absence d'OPG.

L'étude de l'impact des mutations sur la virulence a permis de montrer que ces gènes *gan* n'ont pas une implication majeure dans la virulence sur feuilles d'endive, tubercules de pomme de terre et *Saintpaulia ionantha* dans les conditions testées en laboratoire. Ces gènes *gan* sont exprimés pendant l'infection mais leur expression n'est pas essentielle pour la virulence d'*E. chrysanthemi*. Une conclusion similaire a été tirée de l'étude des cellulases (endoglucanases) (Boccaro et coll., 1994). Les principaux facteurs restent donc dans un premier temps, les pectinases qui sont nécessaires à la déstructuration de la paroi des cellules végétales. Cette pectinolyse permet alors de libérer différents oligomères qui seront dégradé par des enzymes de dégradation dans un second temps. Parmi celles-ci, les protéines Gan codées par le locus étudié qui permettront l'utilisation des galactanes. Ils pourraient être utilisés lorsque l'infection est bien établie, ce qui expliquerait l'expression plus abondante des gènes *gan* en phase stationnaire.

Résultats :

**Partie II – Rôle du système à deux composants RcsCDB
dans le pouvoir pathogène *d'Erwinia chrysanthemi* et
lien existant entre les OPG et le système RcsCDB.**

. Partie II - Rôle du système à deux composants RcsCDB dans le pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi* et lien existant entre les OPG et le système RcsCDB.

Afin de comprendre le rôle des OPG, une approche génétique a consisté en la recherche de mutations permettant la suppression du phénotype du mutant *opgG*. Pour cela, une mutagenèse à la N'-méthyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine (NTG) de la souche *opgG* a été effectuée. Franck Bouchart a recherché des bactéries ayant une restauration de la motilité (les bactéries *opgG* ayant une perte de motilité). Après avoir isolé des clones, il a ensuite analysé les autres phénotypes testés pour le mutant *opgG*. Il s'est intéressé particulièrement à un clone dont la mutation permettait de restaurer la quasi-totalité des phénotypes sauvages : restauration de la motilité, absence de mucosité, restauration partielle de la résistance aux sels biliaires, restauration de la sécrétion des exoenzymes, restauration de la virulence sur tubercules de pomme de terre mais pas sur feuilles d'endive. La mutation a ensuite été localisée dans le gène *rcsC* : *rcsC2*. Le gène *rcsC* est un gène présent dans un locus de 3 gènes : *rcsC-rcsBD*. Ce locus code un système à deux composants.

A. Impact du système RcsCBD sur le pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi*.

1. Effet des mutations dans le système Rcs (*rcsC2*, *rcsC*, *rcsD*, *rcsB*, Δ *rcsCBD* et *rcsF*) dans les contextes sauvage et *opgG*.

J'ai réalisé une comparaison phénotypique du mutant *rcsC2* avec des mutants affectés dans le locus *rcsCBD* (par insertion de cassette ou délétion totale du locus). Les tests phénotypiques réalisés sont ceux utilisés lors de la caractérisation du phénotype du mutant *opgG* : test de sécrétion enzymatique, test de motilité, test de mucosité et tests de virulence (feuille d'endive et tubercule de pomme de terre).

Les mutants *rcsC* et *rcsD* ont été construits par Franck Bouchart au cours de sa thèse, j'ai quant à moi construit les mutants *rcsB*, Δ *rcsCBD* et *rcsF* (Cf. Matériel et méthodes). Les phénotypes cités pour la souche sauvage (EC3937) et la souche *opgG* sont ceux décrits par Page et coll. en 2001.

L'ensemble des résultats présentés est récapitulé dans le tableau 8.

Souches	Mucosité	Diamètre des colonies sur gélose molle	Activité pectinase	Résistance aux sels biliaires	Virulence	
					Feuille d'endive	Tubercule de pomme de terre
EC3937 (sauvage)	-	++ (2,2)	++	++	+	+
NF3500 (<i>opgG</i>)	+	- (0,8)	-	-	-	-
NF3591 (<i>rcsC2</i> ; <i>opgG</i>)	-	+	+	+	-	+
NF3611 (<i>rcsC2</i>)	-	++ (2,3)	+++	+++	++	++
NF3683 (<i>rcsC</i> ; <i>opgG</i>)	-	+	++	ND	+	+
NF3682 (<i>rcsC</i>)	-	++ (2,3)	+++	+++	+	+
NF3670 (<i>rcsD</i> ; <i>opgG</i>)	-	+/- (1,2)	+	ND	-	+
NF3669 (<i>rcsD</i>)	-	- (0,6)	+	ND	+/-	+
NF3821 (<i>rcsB</i> ; <i>opgG</i>)	-	+/- (1)	+/-	ND	-	-
NF3820 (<i>rcsB</i>)	-	++ (2,5)	++	ND	+	+
NF3754 (Δ <i>rcsCBD</i> ; <i>opgG</i>)	-	+/- (1,2)	+/-	+	-	-
NF3753 (Δ <i>rcsCBD</i>)	-	++ (2,5)	++	+++	+	+
NF3786 (<i>rcsF</i> ; <i>opgG</i>)	-	+/- (1)	+/-	ND	-	-
NF3785 (<i>rcsF</i>)	-	++ (2,2)	++	ND	+	+

Tableau 8: Récapitulatif de tous les phénotypes testés en laboratoire des souches affectées dans le système Rcs et dans la synthèse des OPG (*opgG*). Les phénotypes de mucosité sont représentés par un (-) pour une souche non muqueuse et par (+) pour une souche muqueuse. La motilité est représentée par le diamètre de la colonie qui est exprimée entre parenthèse (cm). Les tests de résistances aux sels biliaires n'ont pas été effectués pour toutes les souches (ND= Non déterminé).

a) Effet des mutations sur la mucosité

La souche sauvage n'est pas muqueuse contrairement à la souche *opgG* qui présente un phénotype muqueux sur boîte. Comme attendu, les souches *rcsC*, *rcsD*, *rcsB* et $\Delta rcsCBD$ ne sont pas muqueuses et ceux dans un contexte sauvage ou *opgG*. Comme la souche *rcsF*, la souche *rcsF opgG* n'est pas muqueuse sur boîte, ce qui correspond au résultat obtenu par Shiba et coll. en 2004. La souche *rcsC2 opgG* n'est pas muqueuse, la mutation permet donc de supprimer le phénotype de la souche *opgG*. La souche *rcsC2* ne présente pas de phénotype muqueux.

b) Effet des mutations sur la motilité

La motilité est caractérisée par le diamètre des colonies sur gélose molle, que nous appelons ici halo de nage.

- La souche *opgG* présente une diminution de la motilité.
- La souche *rcsC2 opgG* présente un halo de nage de taille similaire voire légèrement inférieure à celui de la souche sauvage. La mutation permet donc de supprimer le phénotype *opgG*. La souche *rcsC2* présente un halo de nage de taille semblable voire légèrement supérieure à celui de la souche sauvage.
- Comme pour la mutation *rcsC2*, la mutation *rcsC* engendre une restauration de la motilité de la souche *opgG* (c'est-à-dire un halo de nage de taille semblable ou légèrement inférieur à celui de la souche sauvage) et pour le mutant *rcsC*, on observe un halo de nage de taille semblable voire légèrement supérieure à celui de la souche sauvage.
- La souche *rcsD opgG* présente un halo de nage de taille supérieur à celui de la souche *opgG* mais inférieur à celui de la souche sauvage. La mutation permet donc de supprimer partiellement le phénotype *opgG*. Cependant, la souche *rcsD* présente un halo de nage inférieur à celui de la souche *opgG*. La mutation *rcsD* présente un phénotype pas attendu, nous en discuterons par la suite.
- La délétion totale du locus $\Delta rcsCBD$ et les mutations *rcsB* et *rcsF* permettent dans un contexte *opgG* d'obtenir un halo de nage de taille intermédiaire entre la souche sauvage et la souche *opgG*. La mutation permet de supprimer partiellement le phénotype *opgG*. Les souches *rcsF*, *rcsB* et $\Delta rcsCBD$ présente un halo de nage de taille identique ou légèrement supérieur à celui de la souche sauvage.

c) Effet des mutations sur l'activité pectinase

- Contrairement à la souche sauvage, la souche *opgG* ne présente pas de halo de dégradation sur boîte PAG.
- La souche *rscC2 opgG* présente un halo de dégradation de taille inférieure à celui de la souche sauvage, mais supérieur à celui de la souche *opgG*. La mutation permet donc de supprimer partiellement le phénotype *opgG*. La souche *rscC2* présente un halo de dégradation supérieur à celui de la souche sauvage.
- La souche *rscC opgG* présente un halo de dégradation d'une taille similaire à celui de la souche sauvage. La mutation permet donc de supprimer le phénotype *opgG*. La souche *rscC* présente un halo de dégradation supérieur à celui de la souche sauvage.
- Les souches *rscD* et *rscD opgG* présente un halo de dégradation de taille inférieure à celui de la souche sauvage, mais supérieur à celui de la souche *opgG*. La mutation *rscD* permet donc de supprimer partiellement le phénotype *opgG*. La souche *rscD* contrairement au mutant *rscC* et *rscC2* présente un halo de dégradation inférieur à celui de la souche sauvage.
- Les souches *rscB*, *ΔrscCBD* et *rscF* présente un halo de dégradation semblable à celui de la souche sauvage. Ces mutations dans un contexte *opgG* permettent d'engendrer une diminution de la taille des halos de dégradation, les souches ont une taille de halo très inférieure à celle de la souche sauvage mais légèrement supérieure à celle de la souche *opgG*. La mutation permet donc de supprimer partiellement le phénotype *opgG*.

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des enzymes dégradant la paroi des cellules végétales chez *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) (Andresen et coll., 2007). Les auteurs ont alors montré qu'une mutation par insertion d'un mini transposon dans les gènes *rscC*, *rscD* et *rscB* permettait une augmentation de l'expression des enzymes de dégradation ainsi qu'une augmentation de la virulence. L'effet le plus marqué est observé pour le mutant *rscB*, alors que nous nous n'observons aucune différence entre la souche sauvage et le mutant *rscB*. Par contre, la mutation *rscF* n'engendre pas non plus de variations significatives de l'expression des enzymes dégradant la paroi des cellules végétales chez *Pectobacterium carotovorum* (Andresen et coll., 2007).

d) Effet des mutations sur la résistance aux sels biliaries

- La souche *opgG* présente une forte sensibilité aux sels biliaries (Page et coll., 2001).

- La mutation *rcsC2* permet une restauration partielle de la mutation *opgG* car le mutant *rcsC2 opgG* présente une résistance aux sels biliars supérieure à la souche *opgG* mais reste inférieure à celle de la souche sauvage EC3937. La mutation *rcsC2* seule engendre une résistance accrue aux sels biliars (supérieure à celle de la souche sauvage).

- La délétion du locus *rcsCBD* permet également une restauration partielle de la mutation *opgG* (le mutant Δ *rcsCBD opgG* présente une résistance aux sels biliars intermédiaire entre celle observée pour la souche *opgG* et celle observée pour la souche sauvage EC3937). Comme pour la mutation *rcsC2*, la délétion Δ *rcsCBD* et la mutation *rcsC* engendrent dans un contexte *opg+* une résistance accrue aux sels biliars (supérieure à celle de la souche sauvage).

- L'effet des autres mutations sur la résistance aux sels biliars n'a pas été testé.

e) Effet des mutations sur la virulence

- La souche *opgG* n'est pas capable de croître *in planta*, elle est donc non virulente (Page et coll., 2001).

- Le mutant *rcsC2 opgG* est virulent sur tubercule de pomme de terre mais pas sur feuille d'endive. La mutation *rcsC2* permet donc une restauration partielle de la virulence, dépendante de la plante infectée. Cette mutation seule (*rcsC2*) permet d'engendrer une hypervirulence sur feuille d'endive ainsi que sur tubercule de pomme de terre avec 3 fois plus de macération recueillie pour la souche *rcsC2* que pour la souche sauvage et pour un même inoculum (Bouchart, 2006).

- Le mutant *rcsC* est virulent sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive, avec une virulence similaire à celle de la souche sauvage EC3937. Le mutant *rcsC* ne présente pas d'hypervirulence comme la souche *rcsC2*. Cette mutation *rcsC* permet de supprimer le phénotype *opgG*, puisqu'une souche *opgG rcsC* est virulente sur tubercule de pomme de terre et faiblement virulente sur feuille d'endive.

- Le mutant *rcsD* présente une virulence sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive très atténuée. Cette mutation *rcsD* permet de supprimer partiellement le phénotype *opgG*, puisqu'une souche *opgG rcsD* est virulente sur tubercule de pomme de terre mais pas sur feuille d'endive.

- Les mutants *rcsB*, *rcsF* et Δ *rcsCBD* sont virulents sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive, par contre ces mutations ne permettent pas de supprimer le phénotype

opgG, puisque les souches *opgG rcsB*; *opgG rcsF* et *opgG ΔrcsCBD* ne sont pas virulentes ni sur tubercule de pomme de terre ni sur feuille d'endive.

f) Bilan des mutations

- La mutation *rcsC2* permet de restaurer la majorité des caractères phénotypiques sauvages chez la souche *opgG*. La mutation *rcsC2* dans un contexte *opg+* permet une augmentation de la virulence, de la résistance aux sels biliaires, de la motilité et de l'activité pectinase.
- La mutation *rcsC* permet de restaurer la totalité des caractères phénotypiques sauvages chez la souche *opgG*. Contrairement à la souche *rcsC2*, la mutation *rcsC* n'engendre pas une hypervirulence ni sur tubercule de pomme de terre ni sur feuille d'endive.
- La mutation *rcsD* permet de restaurer partiellement les caractères phénotypiques sauvages chez la souche *opgG*, mais pas autant que les mutations *rcsC2* et *rcsC*. Par contre, le mutant *rcsD* est très affecté dans la motilité et dans la virulence contrairement aux mutants *rcsC2* et *rcsC*. La mutation dans le gène *rcsD* a été construite par l'insertion de la cassette chloramphénicol (Cml). On ne peut exclure que cette cassette puisse avoir un effet sur la transcription du gène *rcsB* localisé en aval du gène *rcsD*. Le mutant *rcsB* ne présente pas les phénotypes observés pour le mutant *rcsD*, il semble donc que si la mutation dans le gène *rcsD* affecte la transcription de *rcsB*, alors on aurait plutôt une augmentation de sa transcription plutôt qu'une diminution.
- La délétion du locus *rcsCBD* et la mutation *rcsB* dans un contexte *opgG* engendrent une perte de mucosité, une légère augmentation de la motilité et de la sécrétion des pectinases (par rapport aux phénotypes de la souche *opgG*) mais ne permettent pas de restaurer la virulence de la souche *opgG*. De plus, la délétion du locus *rcsCBD* et la mutation *rcsB* engendrent une légère augmentation de la motilité et la délétion du locus *rcsCBD* engendre une résistance accrue aux sels biliaires. Les souches *ΔrcsCBD* et *rcsB* sont virulentes. Le locus *rcsCBD* et le gène *rcsB* ne sont pas essentiels à la virulence.
- Bien que les mutations *rcsC2* et *ΔrcsCBD* n'engendrent pas les mêmes phénotypes, ils permettent tout deux de supprimer la sensibilité aux sels biliaires de la souche *opgG* et d'engendrer une résistance accrue dans un contexte *opgG+*.
- La mutation du gène *rcsF* dans un contexte *opgG* engendre une perte de la mucosité et augmentation de la sécrétion des pectinases par rapport à la souche *opgG* mais ne permet pas

de restaurer sa virulence. De plus, cette mutation dans un contexte *opgG*⁺ n'engendre pas de phénotype différent de la souche sauvage.

- Nous pouvons donc dire que la mucosité est dépendante du système Rcs, toute mutation nulle dans les gènes *rscF*, *rscC*, *rscD* ou *rscB* engendre une perte de l'activation. La lipoprotéine RcsF est donc ici essentielle pour la mucosité.
- De plus, pour les autres phénotypes testés, les résultats obtenus diffèrent en fonction des mutations. La régulation des gènes est donc alors dépendante du système Rcs et d'autres composantes.

2. Caractérisation de la mutation *rscC2*

Nous venons de voir les différents phénotypes de la souche *rscC2*. Nous avons voulu caractériser plus précisément cette mutation. Pour cela, j'ai voulu voir l'impact des mutations *opgG*, *opgG rscC2* et *rscC2*, sur l'expression de fusions transcriptionnelles connues pour être régulées (positivement ou négativement) par le système Rcs et avec comme contrôle la souche sauvage et le mutant $\Delta rcsCBD$. Les fusions transcriptionnelles qui ont été réalisées sont les fusions : *flhD-uidA* et *ftsA-uidA*.

Les sites d'insertion des Tn5 ne sont pas encore définis, cependant nous avons vérifié que les différentes insertions des Tn5 comportant les fusions transcriptionnelles n'engendrent aucune variation des phénotypes observés (virulence, motilité, etc...).

a) Effets des mutations sur les fusions transcriptionnelles

- Fusion *flhD-uidA*

Le gène *flhD* est connu pour être réprimé par le système RcsCDB. J'ai mesuré l'expression de la fusion transcriptionnelle *flhD-uidA* pour des souches cultivées en LB-NaCl et arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7) (figure 42 et tableau 9).

Dans la souche *opgG*, la fusion transcriptionnelle *flhD-uidA* diminue d'un facteur 3 (34%) par rapport à la souche sauvage. Dans un contexte *rscC2 opgG*, la fusion est exprimée à 127%. Enfin les souches *rscC2* et $\Delta rcsCBD$ présentent respectivement 203% et 177% d'activité.

Ces résultats sont corrélés avec les phénotypes observés sur boîte. La souche *opgG* se caractérise par une motilité plus faible que la souche sauvage, la souche *opgG rscC2* présente une restauration de la motilité (crible utilisé pour isoler le clone), les souches *rscC2* et $\Delta rcsCBD$ présentent un halo de nage supérieur à celui de la souche sauvage.

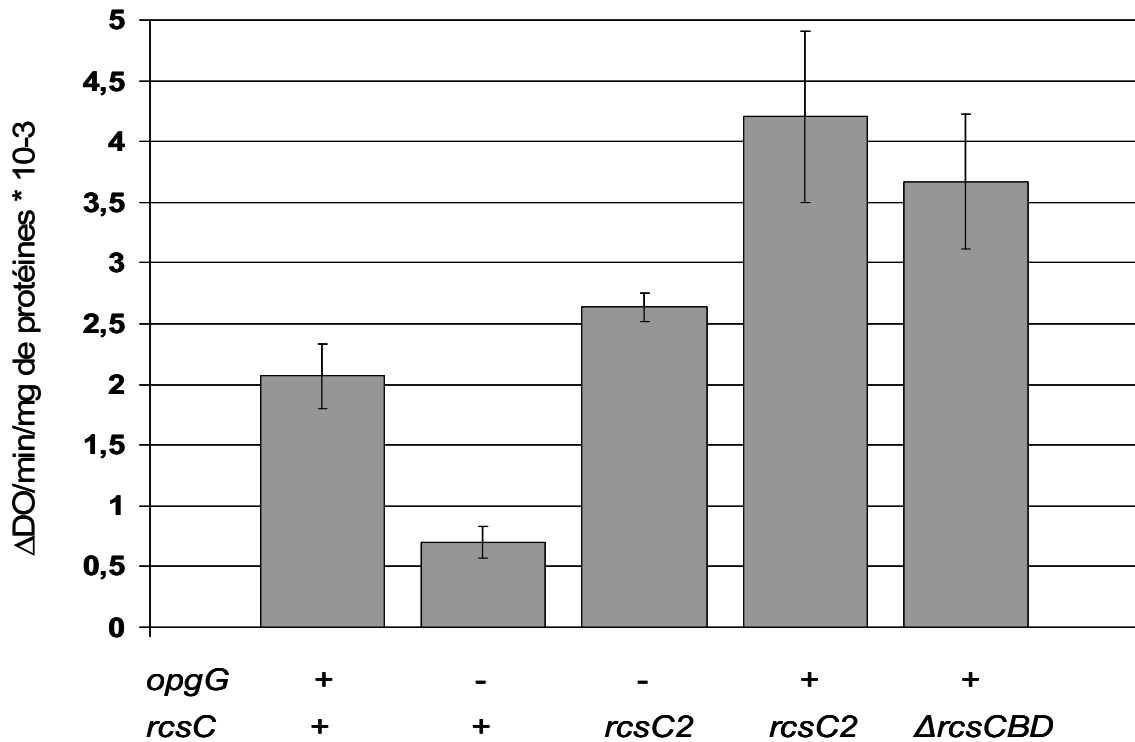


Figure 42: Expression de la fusion transcriptionnelle *flhD-uidA* dans un contexte sauvage (NFB3800), *opgG* (NFB3805), *opgG rcsC2* (NFB3806), *rcsC2* (NFB3807) et Δ *rcsCDB* (NFB3808). Les souches ont été cultivées en LB-NaCl, arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7), cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. L'activité observée est la moyenne de 3 mesures indépendantes, le résultat est exprimé en $\Delta DO_{410nm}/min/mg \text{ de protéines} * 10^{-3}$.

↪ Ainsi dans un contexte *opgG*, on observe une répression plus importante de la fusion (le système Rcs est activé en absence d'OPG).

↪ La mutation *rcsC2* permet dans un contexte *opgG* un retour proche au niveau sauvage (127%) dû à une compensation de la répression (engendrée par à l'absence d'OPG) par la diminution de la répression due à la mutation *rcsC2*. La mutation *rcsC2* dans un contexte sauvage engendre une augmentation de l'expression de la fusion (causée par une diminution de la répression du système Rcs).

↪ Enfin la délétion totale du locus engendre une perte de la répression.

- **Fusion *ftsA-uidA***

Le gène *ftsA* est connu pour être activé par le système RcsCDB. J'ai mesuré l'expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* pour des souches cultivées en LB-NaCl et arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7) (figure 43 et tableau 9).

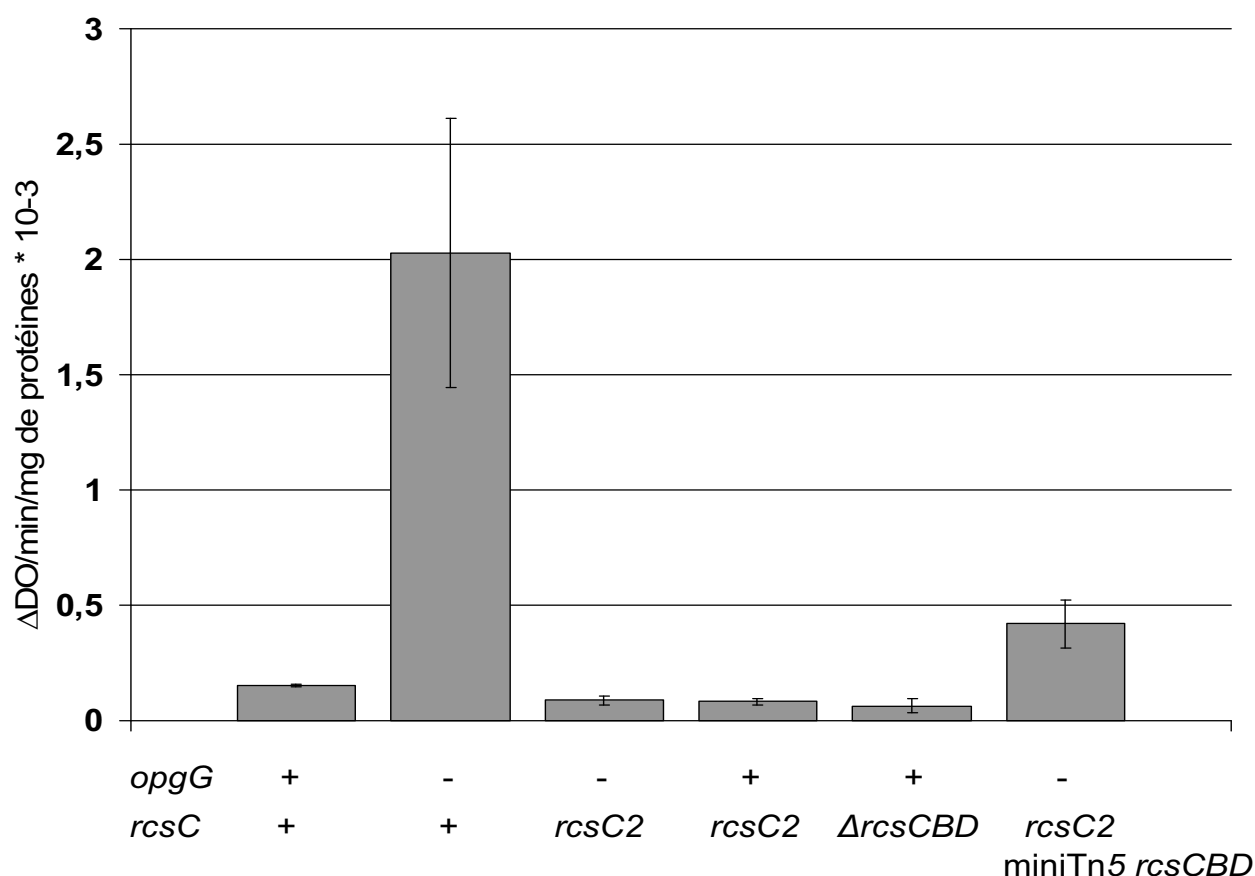


Figure 43: Expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage (NFB3809), *opgG* (NFB3810), *opgG rcsC2* (NFB3811), *rcsC2* (NFB3812), $\Delta rcsCDB$ (NFB3813) et *opgG, rcsC2, miniTn5rcsCBD* (3859). Les souches ont été cultivées en LB-NaCl, arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7), cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. L'activité observée est la moyenne de 3 mesures indépendantes, le résultat est exprimé en $\Delta DO_{410nm}/min/ mg \text{ de protéines} * 10^{-3}$.

Dans la souche *opgG*, la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* augmente d'un facteur 13,2 (1324%) par rapport à la souche sauvage. Dans un contexte *rcsC2 opgG*, la fusion est diminuée d'un facteur 1,72 (58%). Enfin les souches *rcsC2* et $\Delta rcsCBD$ présentent une diminution d'un facteur 1,85 (54%) et 2,38 (42%) respectivement.

↳ Ainsi dans un contexte *opgG*, on observe une augmentation très importante de l'expression de la fusion (le système Rcs est activé en absence d'OPG).

↳ Dans une souche *rcsC2 opgG*, l'activation engendrée par l'absence d'OPG est compensée par la mutation *rcsC2* (diminution de l'activation du système Rcs). La mutation *rcsC2* dans un contexte sauvage engendre une diminution de l'activation de l'expression de la fusion (causée par une diminution de l'activation du système Rcs).

↳ Enfin la délétion totale du locus engendre une perte d'activation.

Phénotype de la souche	Dosage de la fusion		Dosage de la fusion	
	<i>flhD- uidA</i>		<i>ftsA-uidA</i>	
Sauvage	2,07	(100%)	0,15	(100%)
<i>opgG</i>	0,70	(34%)	2,03	(1324%)
<i>opgG, rcsC2</i>	2,64	(127%)	0,09	(58%)
<i>rcsC2</i>	4,20	(203%)	0,08	(54%)
$\Delta rcsCBD$	3,67	(177%)	0,06	(42%)
<i>rcsC2, opgG, miniTn5rcsCBD</i>	ND		0,41	(270%)

Tableau 9: Récapitulatif des fusions transcriptionnelles *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG rcsC2*, *rcsC2* et $\Delta rcsCDB$. Les résultats sont exprimés en $\Delta DO_{410nm}/min/ng$ de protéines, le chiffre entre parenthèse représente le pourcentage d'activité par rapport à la souche sauvage.

Nous pouvons donc conclure que :

↳ la mutation *opgG* engendre une activation du système Rcs, c'est à dire une augmentation de la phosphorylation de RcsB.

↳ la mutation *rcsC2* entraîne donc un niveau de phosphorylation plus faible de la protéine RcsB.

b) La souche *rcsC2 opgG* ne perçoit plus le choc osmotique

Une mutation ponctuelle *rcsC2* supprime partiellement une mutation *opgG* en restaurant la majeure partie des caractères du mutant à l'exception de la virulence qui n'est pas complètement restaurée (absence de virulence sur feuille d'endive).

L'analyse de la fusion *ftsA-uidA* suite à un choc osmotique montre que la souche sauvage et la souche *opgG rcsC2* ne se comportent pas de la même façon face à un choc osmotique (figure

44). En effet, suite à un choc osmotique, on observe une augmentation de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* pour la souche sauvage alors que dans un contexte *opgG rcsC2*, on n'observe pas de variation de l'expression de la fusion.

La suppression de la mutation *opgG* par la mutation *rcsC2* permet un retour à un phénotype proche de la souche sauvage mais la souche présente quand même une altération dans la perception de son environnement. Cela peut être dû à l'impact de l'absence des OPG sur d'autres systèmes à deux composants, nous en discuterons par la suite.

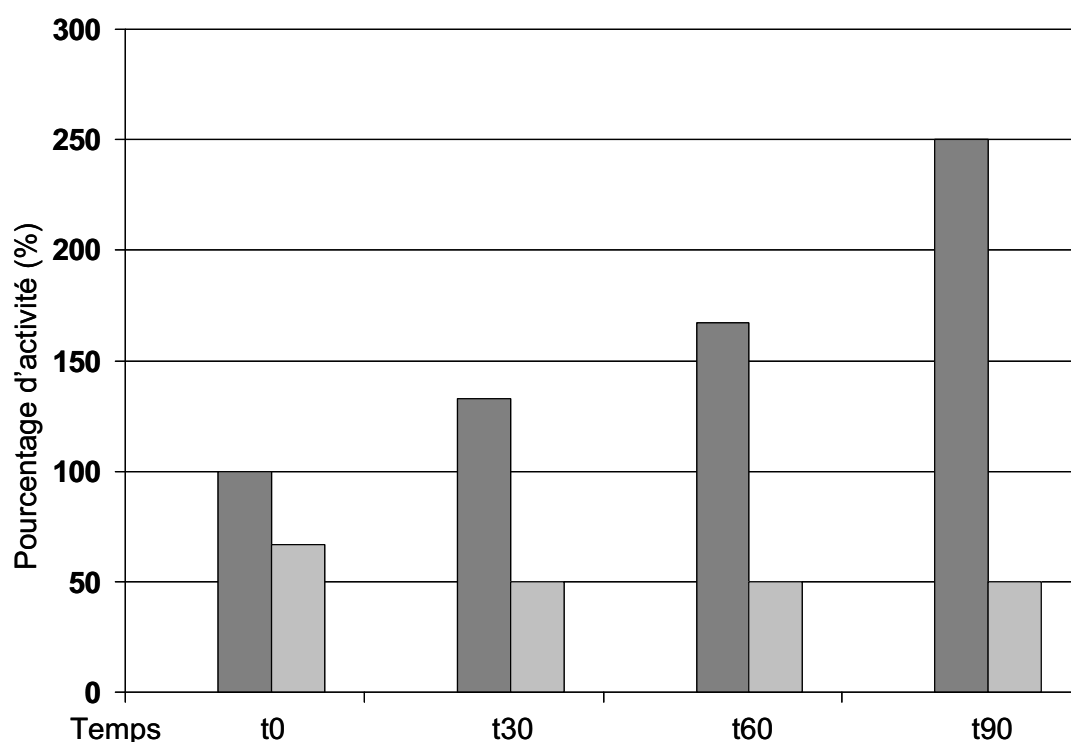


Figure 44: Expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage (NFB3809, en gris foncé), *opgG rcsC2* (NFB3811, en gris clair). Les souches ont été cultivées en LB-NaCl, prélevées en phase exponentielle (DO = 0,7) (t0), puis un choc osmotique a été réalisé par ajout de 0,4 M de NaCl dans le milieu, les bactéries ont alors été prélevées toutes les 30 minutes (t30, t60 et t90) puis cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. Le résultat est exprimé en pourcentage d'activité par rapport à la souche sauvage au temps t0.

Deux hypothèses ont alors été proposées pour expliquer le phénotype de la souche *rcsC2*. Cela peut être dû à une diminution de la phosphorylation de RcsB ou une augmentation de sa déphosphorylation. Afin de caractériser la mutation *rcsC2*, j'ai construit un mérodipléide par une insertion ectopique du locus *rcsCBD* dans la souche *rcsC2, opgG*.

c) **Dominance de la mutation *rcsC2***

- **Clonage du locus *rcsCBD***

Pour cloner le locus *rcsCBD* en entier, j'ai effectué un clonage direct en masse : j'ai digéré l'ADN génomique de la souche EC3937, récupéré les fragments de taille comprise entre 6 et 8kb (le fragment *rcsCDB* est de 7kb). J'ai ensuite cloné les fragments dans un vecteur : pUC18Not et j'ai sélectionné les clones sur LB+Amp+Xgal. J'ai obtenu plusieurs clones blancs dont certains présentaient un phénotype muqueux.

J'ai donc analysé ceux-ci : un de clones contenait un fragment d'ADN comportant le gène *rcsF*, et 2 autres clones comportaient le locus *rcsCBD* en entier. J'ai vérifié par digestion enzymatique et séquencé les bornes de l'insert pour confirmer la présence du locus *rcsCBD* en entier. Le plasmide portant le locus *rcsCBD* en entier est appelé pNFW257. J'ai ensuite sous cloné le fragment NotI contenant le locus dans un pUTminiTn5Sp (digéré par NotI) afin de pouvoir exprimer chez *E. chrysanthemi* le locus *rcsCBD* : pNFW261. La souche comportant ce pUT miniTn5 Sp *rcsCBD* est également muqueuse.

- **Phénotype du mérodipléide : *opgG, rcsC2, miniTn5rcsCBD***

Pour savoir si la mutation *rcsC2* est dominante ou récessive, j'ai introduit par conjugaison le miniTn5*rcsCBD* dans la souche NFB3811 (*rcsC2, opgG, miniTn5 ftsA-uidA*).

J'ai réalisé 2 conjugaisons indépendantes, j'ai analysé un clone pour chaque conjugaison (NFB3859 et NFB3860) et les résultats obtenus sont similaires. J'ai donc décidé de présenter uniquement les résultats d'une insertion.

J'ai analysé l'expression de la fusion *ftsA-uidA* dans ce contexte. Les bactéries sont prélevées en phase exponentielle (culture LB-NaCl), cassées à la presse de French. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 valeurs indépendantes (figure 43).

La mutation *opgG* entraîne une augmentation d'un facteur 13,2 de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* par rapport à l'expression de la fusion de la souche sauvage alors que la souche *rcsC2 opgG* entraîne une diminution d'un facteur 1,72 de l'expression de la fusion *ftsA-uidA*. Le rapport d'expression de la fusion entre la souche *opgG* et la souche *opgG rcsC2* est donc

d'un facteur 22,6 fois. Pour le mérodiplloïde (*rcsC2*, *opgG*, miniTn5 *rcsCBD*), l'expression de la fusion transcriptionnelle augmente de 2,7 fois par rapport à la souche sauvage. Le rapport d'expression de la fusion entre la souche *opgG* et la souche *opgG rcsC2* miniTn5 *rcsCBD* est alors d'un facteur 4,95 fois. L'expression de la fusion *ftsA-uidA* est donc intermédiaire pour la souche *opgG rcsC2* miniTn5 *rcsCBD*.

- **Test de motilité**

J'ai voulu voir la capacité de nage du mérodiplloïde (tableau 10). La souche *opgG rcsC2* présente un halo de nage (diamètre sur gélose molle des colonies) proche de celui de la souche sauvage. L'ajout du miniTn5*rcsCBD* permet d'obtenir une souche avec un diamètre supérieur à celui de la souche *opgG* mais inférieur à celui de la souche sauvage et du double mutant *opgG rcsC2*.

On observe donc une dominance de la mutation *rcsC2* sur la copie sauvage du gène *rcsC*.

Souche	EC3937	NFB3500 <i>opgG</i>	NFB3609 <i>opgG</i> , <i>rcsC2</i>	NFB3859 <i>rcsC2</i> , <i>opgG</i> , miniTn5 <i>rcsCBD</i>
Diamètre des colonies sur gélose molle (cm)	2,3	0,8	2	1,5

Tableau 10: Diamètre des colonies sur gélose molle (cm) des souches EC3937, NFB3500, NFB3609 et NFB3859.

- **Virulence du mérodiplloïde**

J'ai ensuite voulu savoir si l'ajout du locus *rcsCBD* allait permettre à la souche de rester virulente (l'allèle *rcsC2* est dominant sur l'allèle *rcsC*) ou si la souche allait perdre sa virulence et retrouver un phénotype *opgG* (l'allèle *rcsC2* est récessif par rapport à l'allèle *rcsC*). L'étude de la virulence a été effectuée sur les tubercules de pomme de terre. Lorsque l'on inocule les tubercules avec 10⁷ bactéries (*rcsC2*, *opgG*, miniTn5*rcsCBD*), on observe une pourriture dans la moitié des cas (15 inoculations ont engendrées une pourriture molle contre 15 inoculations qui n'ont pas engendrées de pourriture). Lorsque l'on inocule les tubercules avec 10⁸ bactéries, on observe une pourriture dans tous les cas (10 inoculations sur 10).

La complémentation de la mutation *rcsC2* par le locus *rcsCBD* dans la souche *opgG* n'engendre pas un retour au phénotype du mutant *opgG* (perte totale de virulence avec une inoculation de 10⁷ et 10⁸ bactéries).

De plus, cette souche *rcsC2*, *opgG*, miniTn5*rcsCBD* ne présente pas de phénotype muqueux.

L'expression de la fusion *ftsA-uidA* et le test de motilité nous permettent d'affirmer que la mutation *rscC2* est dominante. De plus, cette souche reste virulente. Cette dominance nous permet donc de proposer que la mutation *rscC2* entraîne une déphosphorylation accrue de RcsB par RcsC (et non une diminution de la phosphorylation de RcsB par RcsC), nous en discuterons par la suite.

3. Expression d'une version soluble de la lipoprotéine RcsF : TAT-RcsF

L'ensemble de cette partie du travail a été réalisé en collaboration avec Carmen Ödberg-Ferragut.

a) Construction de la version soluble : TAT-RcsF

Nous avons voulu caractériser la lipoprotéine RcsF. Cependant, les recherches de prédiction de structures ne nous ont pas permis de prédire des domaines structuraux bien définis (figure 45). Nous avons donc voulu déterminer la partie minimale active de la protéine qui permettait d'activer le système Rcs. Nous avons donc exprimé une version soluble (sans l'ancrage dans la membrane externe) de la lipoprotéine RcsF d'*E. chrysanthemi* dans le périplasme. L'ancrage dans cette membrane se fait par la présence de 3 acides gras en position N-terminale sur le premier résidu, une cystéine (surlignée en vert sur la figure 46), de la séquence protéique mature.

Carmen Ödberg-Ferragut a construit un vecteur contenant la séquence signal TAT d'OpgD de *Xylella fastidiosa* dans le plasmide pYZ4 sous le contrôle du promoteur placUV5. Ce vecteur, pXFD11, permet la sécrétion par le système TAT de diverses protéines et dans le cas de pXFD11, il permet la sécrétion de la β -lactamase (Figure 47). Elle a ensuite introduit dans ce vecteur, une version tronquée du gène de la lipoprotéine RcsF d'*E. chrysanthemi* codant une protéine dépourvue de sa séquence signal et du premier acide aminé de la lipoprotéine mature permettant l'ancrage à la membrane externe : la cystéine 16 (Figure 46 et 47). Ce plasmide s'appelle pNFW176.

La souche d'*E. coli* contenant ce plasmide pNFW176 (avec la version soluble de RcsF) est très fortement muqueuse indiquant une surexpression de la synthèse des exopolysaccharides. La surexpression de la version soluble de la lipoprotéine RcsF d'*Erwinia chrysanthemi* entraîne une activation du système Rcs d'*E. coli*.

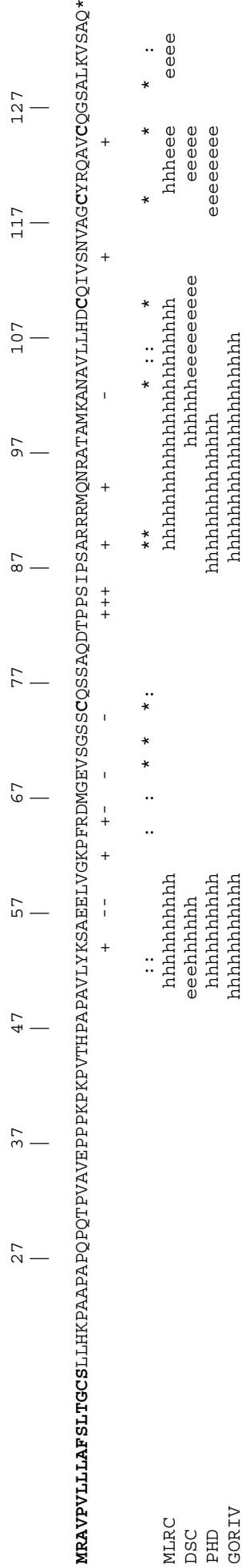


Figure 45 : Séquence de la lipoprotéine RcsF et prédictions de structure.

A

Séquence signal de RcsF
d'*E. chrvsanthemi*

MRAPVLLLAFLSLTGCSLLHKPAAPAPQPTPVAVEPPPKPKPVTHPAPAVLYKSAEELVGKPFPRDMGEVSG
SSCQSSAQDTTPPSIP SARRRMQNRATAMKANAVLLHDCQIVSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ

Remplacé par :

B

Séquence signal d'OpgD de *X. fastidiosa*

MGRDFLKSVTAAWVAFGLPNPLGGPFATNRRVIALRRLGQSQRFDYESLLHKPAAPAPQPTPVAVEPPPKPKPVTHPAPAVLYKSAEELVGKPFPRDMGEVSG
SSCQSSAQDTTPPSIP SARRRMQNRATAMKANAVLLHDCQIVSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ

Figure 46 : Séquence protéique de RcsF avec la séquence signal et le résidu cystéine, en vert, permettant l'ancrage dans la membrane (A) remplacée par la séquence signal d'OpgD de *X. fastidiosa* (B).

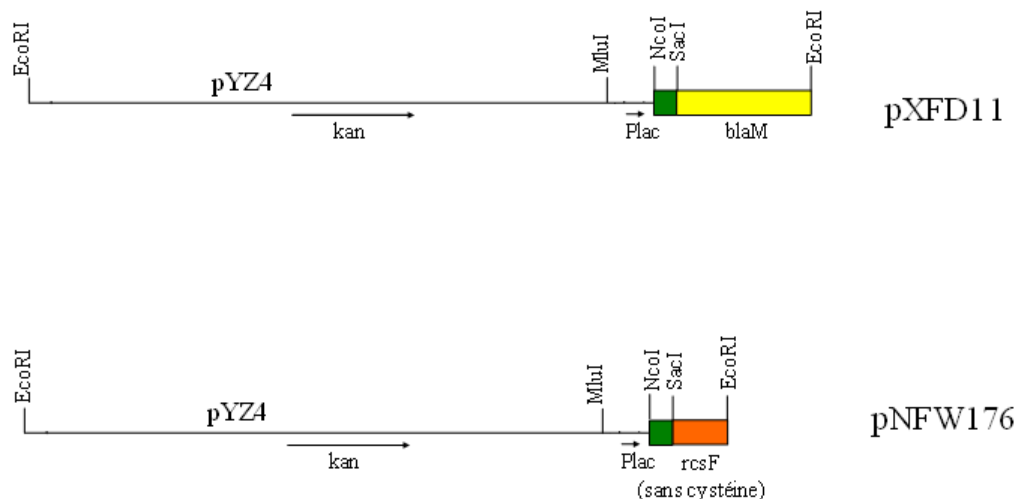


Figure 47 : Plasmide construit pour l'expression périplasmique de RcsF d'*E. chrysanthemi* en orange (pNFW176) à partir d'une construction du laboratoire avec *blaM* en jaune (pXFD11). En vert est représentée la séquence signal d'OpgD de *xylella fastidiosa*.

b) Caractérisation de la structure de la protéine : mutations des cystéines

Il a été montré que la lipoprotéine RcsF présentait au moins un pont disulfure puisque l'activité de RcsF est dépendante de DsbA, protéine périplasmique qui catalyse la formation de ponts disulfures (Kadokura et *coll.*, 2004). Les ponts disulfures sont réalisés grâce à la présence de cystéines. Nous avons donc réalisé des mutagenèses ponctuelles de chacune des 4 cystéines (les cystéines sont représentées en turquoise dans la figure 48). Nous avons remplacé chaque cystéine par une sérine, afin de voir les résidus impliqués dans la formation du pont disulfure, nous avons ainsi obtenu les plasmides comportant RcsF soluble avec les mutations : C75S, C110S, C119S et C125S. La mutation C125S a été introduite dans un plasmide comprenant une version raccourcie de RcsF (L18-K131) qui confère toujours un phénotype muqueux.

Les souches d'*E. coli* portant les plasmides avec les mutations C75S et C119S ont un phénotype muqueux contrairement aux souches portant les plasmides avec les mutations C110S et C125S qui ont un phénotype non muqueux sur boîte (figure 49).

	27	37	47	57	67	77	87	97	107	117	127	Mucosité
LLHKPAAPAPQPTPVAVEPPPKPKPVTHPAPAVLYKSAEELVGKPF												+
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----EELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----DMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
LLHKPAAPAPQPTPVAVEPPPKPKPVTHPAPAVLYKSAEELVGKPF*												-
-----FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												+
-----PAVLYKSAEELVGKPF												
FRDMGEVSGSSCQSSAQDTPPSIP												
PSARRRMQNRA												
TAMKANAVLLHDCQI												
VSNVAGCYRQAVCQGSALKVSAQ*												-

En turquoise, résidus cytéines mutés en sérines.

En gris, constructions donnant un phénotype muqueux

Figure 48 : Comparaison des différentes versions tronquées de TAT-RcsF et mutations des différentes cystéines de TAT-RcsF.

Les phénotypes de mucosité sont représentés par un (-) pour une souche non muqueuse et par (+) pour une souche muqueuse.

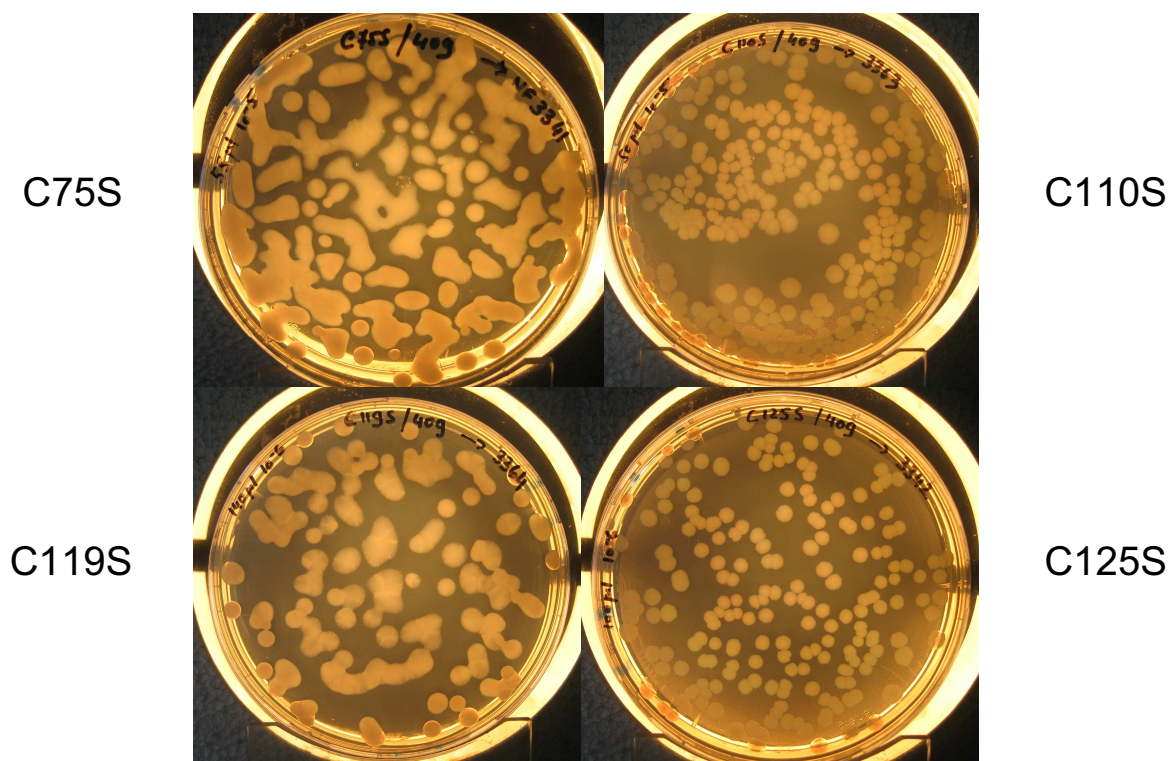


Figure 49: Représentation de la mucosité des souches d'*E. coli* portant les plasmides pNFW268 (C75S), pNFW246 (C110S), pNFW247 (C119S), pNFW269 (C125S).

Ces résultats montrent que les cystéines C110 et C125 sont nécessaires au bon fonctionnement de RcsF. Il existe donc bien un pont disulfure entre les cystéines C110 et C125.

c) Détermination par délétion de la partie active de RcsF

Par mutagenèse dirigée, Carmen Ödberg-Ferragut a déléteé progressivement le domaine périplasmique de RcsF du côté N-terminal et du côté C-terminal de la protéine afin de caractériser la partie minimale active. Le phénotype muqueux sur boîte permet ainsi de dire si la protéine est active ou non (tableau 11).

✎ Il a donc été déterminé que la protéine RcsF à l'état soluble présente une activité lorsque est maintenue la région comprise entre les résidus P49 et K131. De plus, une délétion au delà du résidu E57 (en N-terminal) ou une délétion à partir du résidu A129 (en C-terminal) abolit l'activité de la protéine RcsF à l'état soluble.

✎ Il faudrait donc construire d'autres mutations entre les résidus P49 et E57, ainsi que le mutant V130 afin de déterminer la partie minimale active (puisque'une souche ayant une

délétion à partir du résidu A129 est non muqueuse et qu'une souche ayant une délétion à partir du résidu K131 est muqueuse).

☞ Cette version soluble serait le domaine d'interaction de la protéine RcsF avec les protéines RcsC ou RcsD.

d) Impact des mutations et des délétions dans TAT-rcsF sur l'expression de la fusion *cpsB-lacZ*

Afin de confirmer ces résultats, les plasmides ont été introduits dans une souche d'*E. coli* portant une fusion *cpsB-lacZ* (Davalos-Garcia et coll., 2001). La souche SK1291 contenant la fusion *cpsB-lacZ* est résistante à la kanamycine, or le plasmide portant toutes les constructions permet également la résistance à la kanamycine. Carmen Ödberg-Ferragut a donc réalisé, pour chaque construction, l'interruption du gène permettant la résistance à la kanamycine en introduisant au niveau du site SspI une cassette permettant la résistance à l'ampicilline (fragment BspHI rendu bouts francs de pUC19).

Nous avons ainsi pu doser l'effet de la surexpression des différentes versions solubles de RcsF sur la fusion *cpsB-lacZ* de la souche SK1291 (tableau 11).

- La souche SK1291 présente une activité basale (de 11UM) due à l'activation de la fusion *cpsB-lacZ* par la protéine RcsF d'*E. coli*.
- Tous les phénotypes non muqueux (délétions en C-terminal jusqu'au résidu A129, la construction E57-Q135 et les mutations C110S et C125S) présentent une activité nulle proche de celui de la souche SK1291 (sans plasmide, 11UM) avec en moyenne une expression de 19UM +/- 4. Cette moyenne représente le niveau de base lorsque le plasmide est présent mais ne permet pas la synthèse d'une protéine active.
- La surexpression de la version soluble entière TAT-RcsF (L18-Q135) engendre une augmentation de l'expression de la fusion *cpsB-lacZ* d'un facteur 8,4 par rapport au niveau de base.
- Pour 2 mutations (C75S et P49-K131), on observe une expression plus faible que pour la version soluble mais supérieure au niveau de base, avec une augmentation de 2,5 fois par rapport au niveau de base. Cette augmentation de 2,5 fois est suffisante pour rendre la souche muqueuse.
- Pour le mutant muqueux C119S, on observe une expression plus importante que pour la version soluble avec une augmentation de l'expression de la fusion *cpsB-lacZ* d'un facteur 35,6 par rapport au niveau de base, soit 4 fois plus que pour la version soluble entière (L18-Q135).

- Pour le mutant muqueux P49-Q135, on observe une expression plus importante que pour la version soluble avec une augmentation de l'expression de la fusion *cpsB-lacZ* d'un facteur 46,5 par rapport au niveau de base.

Les plasmides L18-Q135 C119S et P49-135 engendrent, pour une raison inconnue, une activation très supérieure à la version soluble entière (5 fois environ).

	Mucosité	Fusion <i>cpsB-lacZ</i>
souche SK1291	-	11
L18-Q135	+	160
L18-Q135 C75S	+	47
L18-Q135 C110S	-	28
L18-Q135 C119S	+	676
L18-K131 C125S	-	12
P49-Q135	+	884
E57-Q135	-	21
L18-R65	-	14
L18-D109	-	18
P49-D109	-	22
P49-A117	-	19
P49-Q126	-	20
P49-G127	-	20
P49-A129	-	19
P49-K131	+	46

Tableau 11: Dosages de la fusion *cpsB-lacZ* de la souche SK1291 avec des plasmides contenant différentes versions de *TAT-rcsF*. Les phénotypes sur boîte sont représentés dans la colonne mucosité (- pour non muqueux et + pour muqueux). Les dosages ont été réalisés sur des souches perméabilisées à une DO=0,8. Les résultats présentés sont en Unité Miller.

e) Surexpression transitoire par le plasmide pNFW177 (contenant *TAT-rcsF*) chez *E. chrysanthemi*

J'ai électroporé différentes souches d'*E. chrysanthemi* affectées dans le locus *rcsCBD* avec le plasmide pNFW177 (permettant la synthèse de TAT-RcsF). Après une postincubation de 1 à 2 heures, j'ai ensuite étalé les électroporations sur boîte LB+Ampicilline afin de voir l'effet de la surexpression de TAT-RcsF. La surexpression est transitoire car *E. chrysanthemi* ne conserve pas les plasmides et le nombre de copies n'est pas contrôlé. Cependant après 48 heures d'incubation à 30°C, des clones résistants à l'ampicilline ont été obtenus. Il faut noter que 4 expériences d'électroporation ont été effectuées pour chacune des souches, nous obtenions en moyenne 200 colonies par boîte pour les souches EC3937, NFB3669, NFB3682, NFB3753 et NFB3820. Par contre, pour la souche NFB3611 (*rcsC2*), nous obtenions un rendement très faible avec en moyenne 4 colonies. La souche NFB3611 présente donc une sensibilité à l'électroporation pouvant refléter une fragilité de la souche.

La surexpression transitoire de *TAT-rcsF* dans la souche sauvage permet bien d'activer le système RcsCDB puisque les clones issus de l'électroporation de la souche sauvage EC3937 sont muqueux. Cette surexpression nécessite la présence de toutes les protéines du système : les protéines RcsC, RcsD et RcsB, puisque les mutants *rcsC*, *rcsD*, *rcsB* et $\Delta rcsCBD$ ne sont pas muqueux. La surexpression de *TAT-rcsF* ne permet pas non plus d'obtenir un phénotype muqueux dans une souche *rcsC2*.

Le signal dans un contexte *rcsC2* semble bloqué à un niveau faible : la protéine RcsB reste faiblement phosphorylée (tableau 12).

Souche	EC3937	NFB3611 (<i>rcsC2</i>)	NFB3669 (<i>rcsD</i>)	NFB3682 (<i>rcsC</i>)	NFB3753 ($\Delta rcsCBD$)	NFB3820 (<i>rcsB</i>)
mucosité	+	-	-	-	-	-

Tableau 12 : Phénotypes sur boîte des souches suite à l'électroporation du plasmide pNFW177 contenant le gène *TAT-rcsF* (- pour non muqueux et + pour muqueux).

4. Effet de la surexpression des gènes *TAT-rcsF*, *igaA*, *djlA*

J'ai faiblement surexprimé (insertion ectopique d'une copie) des gènes connus pour intervenir dans la régulation de la transmission du signal transitant via RcsCDB : les gènes *igaA*, *djlA* et celui codant la version soluble de RcsF (*TAT-rcsF*).

a) Surexpression chez *E. coli*

Lors de la construction des plasmides permettant la surexpression des différents gènes, j'ai pu observer des phénotypes de mucosité sur boîte LB après 24 heures de croissance à 37 (tableau 13).

	<i>TAT-rcsF</i>	<i>djlA</i>	<i>igaA</i>
pUC18Not	Muqueux (++)	Muqueux (++)	Non muqueux
pUTminiTn5	Muqueux (+)	Non muqueux	Non muqueux

Tableau 13 : Phénotype de mucosité observé lors du clonage des différents gènes (*TAT-rcsF*, *djlA* et *igaA*) dans différents vecteurs : pUC18Not (grand nombre de copies) et pUTminiTn5 (faible nombre de copie).

On observe que la surexpression chez *E. coli* des gènes *TAT-rcsF* et *djlA* dans un plasmide à grand nombre de copies (pUC18Not) permet d'engendrer un phénotype muqueux montrant une activation du système Rcs. On observe que la surexpression chez *E. coli* du gène *TAT-rcsF* dans un plasmide à faible nombre de copies (pUT) permet d'engendrer un phénotype muqueux montrant une activation du système Rcs. Par contre, la surexpression chez *E. coli* du gène *djlA* dans ce plasmide (pUT) ne permet pas d'engendrer un phénotype muqueux. Il a déjà été montré que la surexpression de *djlA* dans un plasmide à grand nombre de copies permettait une activation du système Rcs alors qu'une surexpression dans un plasmide à faible nombre de copies permettait une diminution de l'activité du système Rcs (Shiba et coll., 2006). Comme attendu, la surexpression d'*igaA* n'engendre pas de phénotype muqueux sur boîte ni pour un grand nombre de copie ni pour un faible nombre de copies du plasmide, puisque IgaA est connue pour inhiber le système Rcs.

b) Surexpression chez *E. chrysanthemi* : phénotypes sur boîte.

Les clones ont été obtenus par conjugaison des plasmides pNFW271 (miniTn5 *TAT-RcsF*), pNFW289 (miniTn5 *djlA*), pNFW265 (miniTn5 *igaA*) avec la souche NF3809 (miniTn5 *ftsA-uidA*).

Pour chaque surexpression, 4 mutagenèses indépendantes ont été réalisées pour analyser des insertions indépendantes (Tableau 14). Chaque résultat représenté est la moyenne des différentes insertions qui présentaient des résultats similaires.

	Mutagenèse 1	Mutagenèse 2	Mutagenèse 3	Mutagenèse 4
3809, miniTn5 <i>TAT-rcsF</i>	NFB3874	NFB3893	NFB3894	NFB3895
3809, miniTn5 <i>djlA</i>	NFB3875	NFB3896	NFB3897	NFB3898
3809, miniTn5 <i>igaA</i>	NF3B876	NFB3899	NFB3900	NFB3901

Tableau 14: Souches présentant les insertions des miniTn5 permettant la surexpression des gènes *TAT-rcsF*, *djlA* et *igaA*.

- **La mucosité**

Les souches ont été striées sur boîte de milieu 63+ glucose, la mucosité est observée après 24 heures d'incubation à 30° (figure 50).

On observe que la souche portant le miniTn5*TAT-rcsF* est muqueuse, les souches contenant les miniTn5*igaA* et miniTn5*djlA* ne présentent pas de phénotype muqueux.

↳ Ainsi la surexpression de *TAT-rcsF* par l'insertion ectopique d'une seule copie permet une activation du système Rcs engendrant un phénotype muqueux.

↳ La surexpression de *djlA* n'engendre pas de phénotype muqueux sur boîte, cette surexpression engendre une activation pas suffisante pour voir un phénotype ou permet une répression du système.

↳ La surexpression de *igaA* n'engendre pas de phénotype muqueux sur boîte, ce qui était attendu puisque IgaA est connue pour inhiber le système Rcs.

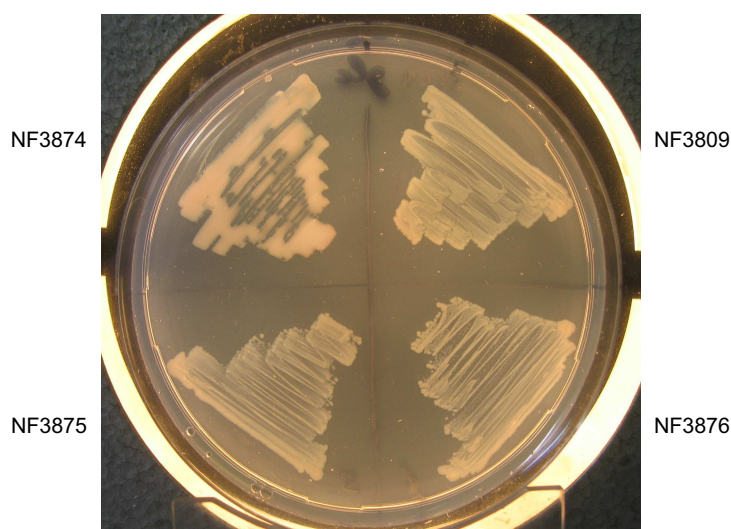


Figure 50: Représentation de la mucosité des souches NFB3809 (sauvage), NFB3874 (miniTn5 *TAT-rcsF*), NFB3875 (miniTn5 *djlA*), NFB3876 (miniTn5 *igaA*).

- **La motilité**

J'ai mesuré la taille des halos de nage des différents clones (diamètre sur gélose molle des colonies) (figure 51). La souche sauvage présente une moyenne de halo de nage de 2,4 cm de diamètre et la souche *opgG* un halo de 0,8 cm de diamètre. La surexpression de *TAT-rcsF* et de *djlA* engendre un halo d'une moyenne de 2,16 cm de diamètre et la surexpression de *igaA* engendre un halo d'une moyenne de 2,64 cm de diamètre.

⇒ La surexpression de *TAT-rcsF* et de *djlA* engendre une légère diminution de la taille du halo.

⇒ La surexpression de *igaA* engendre une légère augmentation de la taille du halo.

⇒ Cependant les variations de la taille des halos de nage ne permettent pas de montrer une différence suffisamment significative de motilité.

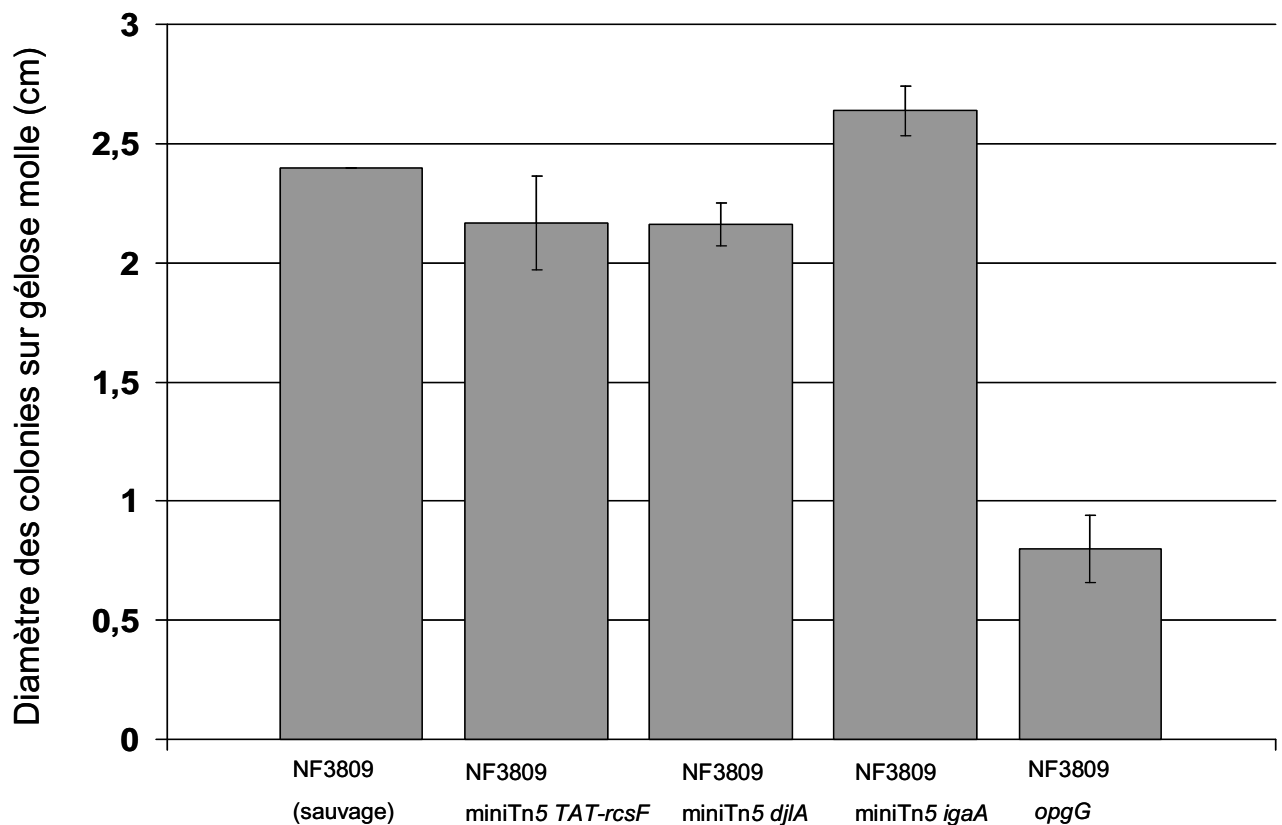


Figure 51: Test de motilité. Mesure du diamètre sur gélose molle des colonies dans un contexte sauvage (NFB3809), NFB3809 miniTn5 *TAT-rcsF*, NFB3809 miniTn5 *djlA*, NFB3809 miniTn5 *igaA* et NFB3810 (3809, *opgG*). Les souches ont été cultivées en LB, les gouttes de 2µl de bactéries (soit $4 \cdot 10^6$ bactéries) ont été déposées sur une boîte faiblement gélosée (0,3%). Ces résultats représentent la moyenne de 2 mesures pour chaque insertion (4 insertions indépendantes), soit la moyenne de 8 dépôts.

c) Surexpression chez *E. chrysanthemi* : dosage de la fusion *ftsA-uidA*

J'ai mesuré l'expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* pour des souches cultivées en LB-NaCl et arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7). L'activité observée est la moyenne de dosages réalisés sur 4 clones issus de mutagénèses indépendantes par conjugaison, le résultat est exprimé en $\Delta DO_{410nm}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines $\cdot 10^{-3}$ (figure 52).

Pour les souches présentant l'insertion ectopique de *TAT-rcsF*, la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* augmente d'un facteur 2,8 (282%) par rapport à la souche sauvage. Pour les souches présentant l'insertion ectopique de *igaA* et de *djlA*, la fusion est exprimée respectivement à 98% et 86%. Le dosage de la fusion *ftsA-uidA* de la souche présentant l'insertion ectopique de *igaA* a un grand écart type dû à une variation importante entre les différentes insertions.

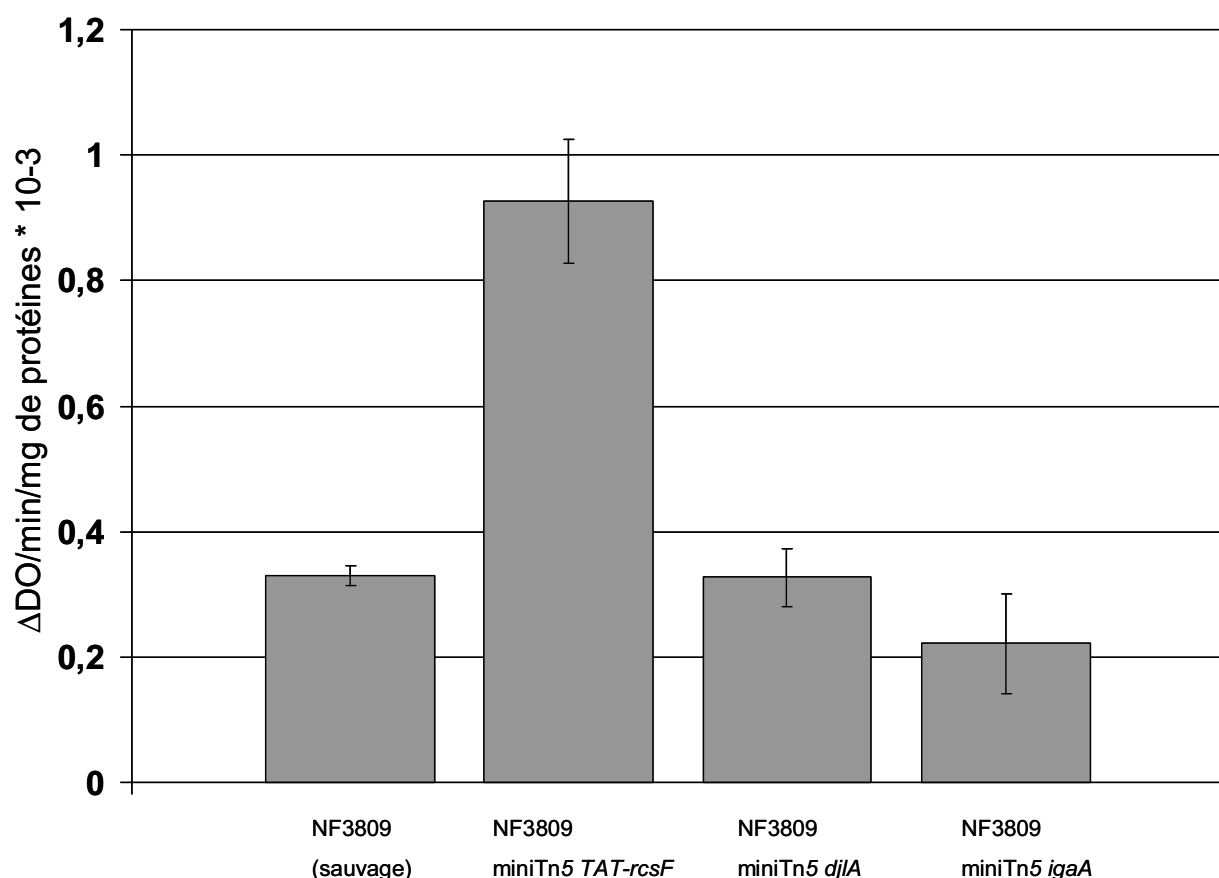


Figure 52: Expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage (NFB3809), NFB3809 miniTn5 *TAT-rcsF*, NFB3809 miniTn5 *djlA*, NFB3809 miniTn5 *igaA*. Les souches ont été cultivées en LB-NaCl, arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7), cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. L'activité observée est la moyenne de dosages réalisés sur 4 clones issus de conjugaisons indépendantes (insertions indépendantes), le résultat est exprimé en $\Delta DO_{410nm}/\text{min}/\text{ng}$ de protéines.

↪ Ainsi la surexpression ectopique de *TAT-rcsF* permet d'activer la fusion *ftsA-uidA* causée par une activation du système Rcs.

↪ La faible surexpression ectopique de *igaA* et *djlA* n'affecte pas la fusion *ftsA-uidA* ni dans un sens ni dans l'autre.

d) Virulence

J'ai voulu voir si la surexpression des protéines impliquées dans la régulation du système Rcs allait engendrer des variations de virulence. Les tests de virulence ont été effectués sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive pour chaque insertion.

- **Test de virulence sur les tubercules de pomme de terre.**

Pour vérifier l'impact des surexpressions sur la virulence, il a fallu comparer la masse de macération produite suite à l'infection des différentes souches (10^7 bactéries). La macération a été recueillie après 48H d'incubation des souches NF3809 (sauvage) et des différentes insertions. Les résultats obtenus représentent la moyenne de 2 infections indépendantes pour chaque insertion (soit la moyenne de 8 valeurs par surexpression) (figure 53).

La macération recueillie pour la souche sauvage (NF3809) est de 4,9g. La surexpression de *TAT-rcsF* engendre une légère diminution de la macération (3,9g de macération, soit 80% de la macération sauvage). Par contre, ni la surexpression de *djlA* ni celle de *igaA* n'engendre de variation significative de macération (respectivement 5g de macération, soit 102% de la macération sauvage et 5,25g de macération, soit 107% de la macération sauvage).

↪ Seule la surexpression de *TAT-rcsF* permet de dégager un phénotype avec ici une légère diminution de la macération, provoquée par une activation accrue du système RcsCDB qui participe à la régulation de la virulence.

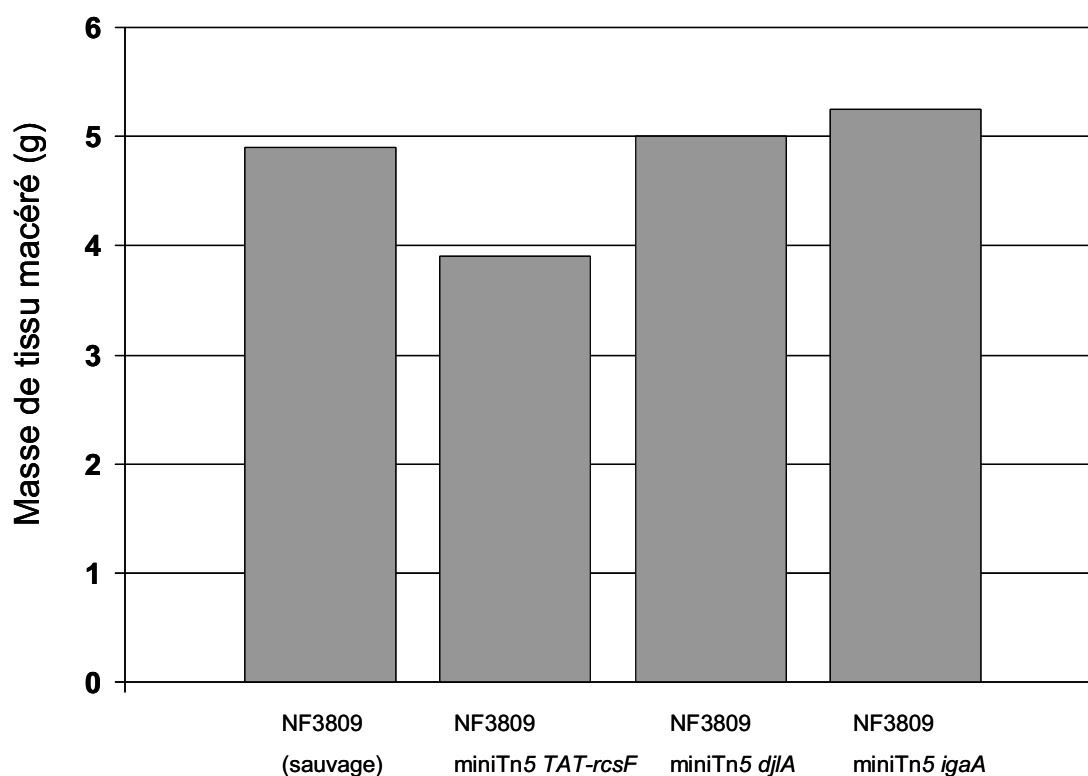


Figure 53: Macération engendrée par la souche NF3809 (sauvage), la souche surexprimant *TAT-rcsF*, *djlA* ou *igaA* sur tubercules de pommes de terre. 10^7 bactéries ont été inoculées et après 48h d'incubation, la macération est récupérée et pesée. Les résultats indiqués correspondent à la moyenne obtenue par l'inoculation de 8 tubercules de pommes de terre (2 infections pour les 4 insertions indépendants et pour chaque contexte).

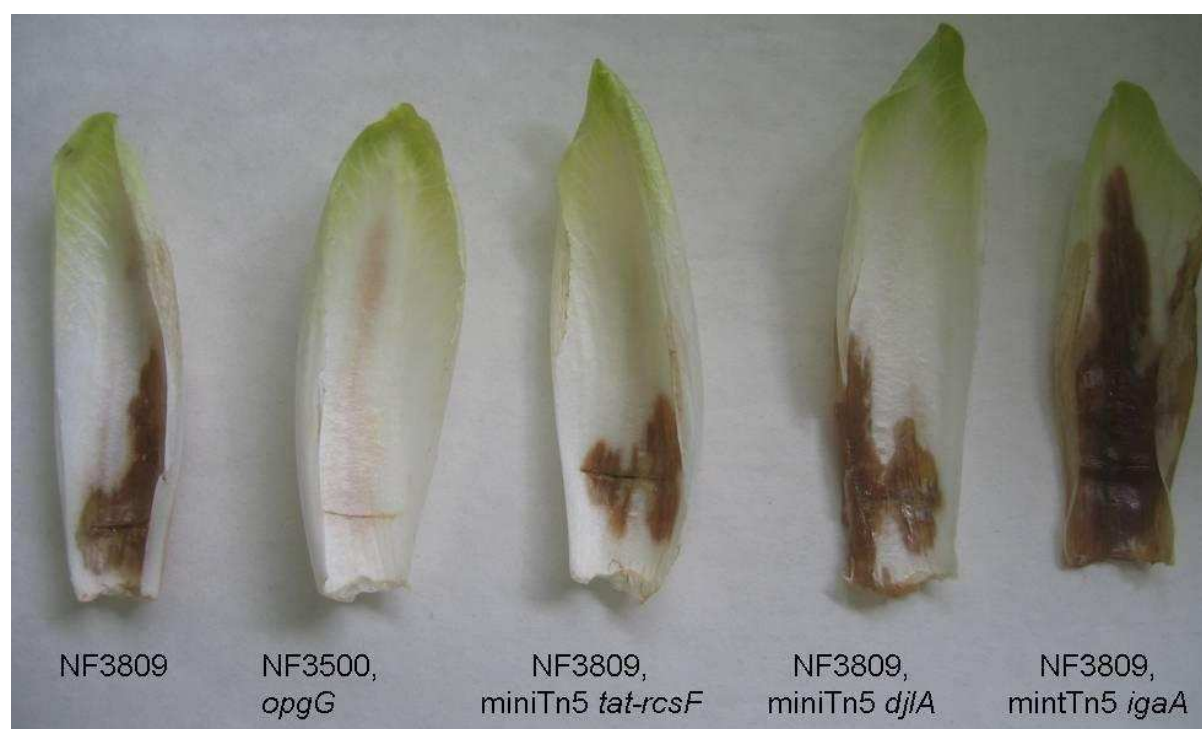


Figure 54 : Test de virulence sur feuille d'endive de la souche NFB3809 (sauvage), de la souche NFB3500 (*opgG*) et des souches surexprimant *TAT-rcsF*, *djlA* ou *igaA*.

- **Test de virulence sur les feuilles d'endive.**

Les tests de virulence ont également été effectués sur les feuilles d'endive puisqu'ils permettent d'observer des différences de virulence plus marquées. En effet, alors qu'un mutant *rscC2 opgG* est virulent sur tubercule de pomme de terre, il ne l'est pas sur feuille d'endive.

Les feuilles d'endive sont scarifiées au scalpel, perpendiculairement à la feuille. L'inoculation est réalisée au niveau de l'incision avec 10^7 bactéries dans un volume de 5 μ l, les feuilles sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h, pour la souche NF3809 (sauvage) et les différentes insertions. J'ai effectué 2 infections indépendantes pour chaque insertion (soit 8 infections par surexpression).

La surexpression de *TAT-rscF* a engendré une diminution de la macération pour 7 infections sur 8, dont 4 avec une virulence fortement réduite et 3 avec une virulence atténuée (cas représenté sur la figure 54).

La surexpression de *djlA* a engendré une diminution de la macération pour 3 infections sur 8 avec une virulence atténuée et dans les 5 autres cas, aucune différence significative n'a pu être observée (cas représenté sur la figure 54).

La surexpression de *igaA* engendre une augmentation de la macération pour 4 infections sur 8 avec une virulence accrue (cas représenté sur la figure 54), pour les autres infections aucune différence significative n'a pu être observée.

↪ La surexpression de *TAT-rscF* permet de dégager un phénotype avec une diminution de la macération. La surexpression de *djlA* ne permet pas de dégager un phénotype avec aucune différence de macération sur feuille d'endive. La surexpression d'*igaA* permet de dégager un phénotype avec une augmentation de la macération sur feuille d'endive. Cependant la différence de virulence sur feuille d'endive ne peut être évaluée que d'une façon visuelle.

e) Bilan des surexpressions

↪ La surexpression de *TAT-rcsF* permet d'engendrer une augmentation de l'expression de la fusion *ftsA-uidA*, une augmentation de la synthèse des exopolysaccharides (aspect muqueux des colonies dû à une activation du gène *cps*). Ces deux gènes sont activés par le système Rcs. De plus, les souches présentant une insertion ectopique de *TAT-rcsF* semble présenter une diminution de la virulence sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. Il a été montré qu'une activation constitutive du système RcsCDB engendrait une atténuation de la virulence chez *Salmonella* (Garcia-Calderon et coll., 2005). La surexpression de *TAT-rcsF* permet donc d'activer le système Rcs. Par contre, cette surexpression n'a pas permis de montrer un effet suffisamment significatif sur la motilité dans les conditions testées en laboratoire.

↪ La surexpression de *djlA* et *igaA* n'a pas permis de montrer une différence significative pour l'expression de la fusion *ftsA-uidA*, la synthèse des exopolysaccharides, la motilité. Cependant, la surexpression du gène *igaA* a permis de montrer une légère augmentation de la virulence sur feuille d'endive. La surexpression de *igaA* permet donc une légère répression du système Rcs.

Il faut noter que les gènes *djlA* et *igaA* sont sous le contrôle de leur promoteur, contrairement à *TAT-rcsF* qui est sous le contrôle du promoteur *placUV5*. Afin de voir un effet suffisamment significatif de la surexpression de ces gènes, il faudrait cloner les gènes sous le contrôle d'un promoteur inductible. De plus, il serait intéressant de voir l'effet de mutations dans les gènes *igaA* et *djlA*.

B. Relation entre les OPG et le système Rcs

Nous avons montré que l'expression des différentes fusions variaient en présence et en absence d'OPG (figure 42 et 43). Nous avons voulu savoir si la quantité d'OPG influençait l'expression des fusions transcriptionnelles. Nous savons que la quantité d'OPG varie en fonction de l'osmolarité (les OPG sont fortement synthétisés lorsque l'osmolarité du milieu est faible), mais pour pouvoir faire uniquement varier la quantité d'OPG, il a fallu construire une souche dont l'expression de l'opéron *opgGH* était inductible.

1. Construction de p_{araBAD} *opgGH*

Au cours de sa thèse, Gilles Boussemart s'intéresse à la relation qui existe entre les systèmes à deux composants et les OPG. Il a construit une souche permettant de moduler la synthèse des OPG indépendamment de l'osmolarité. Il a construit un plasmide dans lequel l'opéron *opgGH* d'*E. chrysanthemi* est sous le contrôle d'un promoteur inductible, le promoteur utilisé est celui du locus *araBAD* d'*E. coli* impliqué dans l'utilisation de l'arabinose : p_{araBAD} (Guzman et coll., 1995). Il a ensuite sous cloné cette construction dans un pUTminiTn5Sp, puis il l'a introduit par conjugaison afin de pouvoir exprimer chez *E. chrysanthemi* la construction. Le miniTn5 p_{araBAD} *opgGH* est inséré dans la région intergénique entre les CDS14775 et CDS16288. Ce système permet donc en faisant varier la quantité d'inducteur (arabinose) de moduler le niveau de transcription des gènes *opgGH*.

Avec Gilles Boussemart, nous avons analysé l'expression de la fusion *ftsA-uidA* en fonction d'une quantité croissante d'inducteur. Il a en parallèle dosé la quantité d'OPG synthétisés dans chaque condition. Les résultats représenteront donc le dosage de la fusion *ftsA-uidA* en fonction de la quantité d'OPG.

Nous avons choisi d'étudier l'effet sur la fusion *ftsA-uidA* puisque c'était la fusion transcriptionnelle qui variait le plus en absence d'OPG. En effet, dans la souche *opgG*, la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* augmente d'un facteur 13,2 par rapport à la souche sauvage alors que la fusion transcriptionnelle *flhD-uidA* diminue d'un facteur 3 pour des cultures en LB-NaCl (figure 42 et 43).

2. Effet de la variation de la quantité des OPG

a) Sur un des gènes cibles du système Rcs : la fusion *ftsA-uidA*

Avec Gilles Boussemart, nous avons analysé l'expression de la fusion *ftsA-uidA* en fonction d'une quantité croissante de l'inducteur (arabinose). Les dosages ont été effectués sur la souche NFB3837 (*opgG* ::Cml, miniTn5 *p_{araBAD} opgGH*, miniTn5 *ftsA-uidA*) cultivée en milieu 63 complémenté de glycérol (2 g/L) et d'une quantité croissante d'arabinose (de 0 à 0,3%).

Pour chaque dosage, une culture de 300 mL a été réalisée. 50 mL étaient destinés au dosage de la fusion *ftsA-uidA* (quantité cassée à la presse de french) et 250mL étaient utilisés pour le dosage des OPG.

On observe une diminution de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* en fonction de la concentration croissante d'arabinose (figure 55).

Gilles Boussemart a mesuré la quantité d'OPG synthétisés pour chaque concentration d'inducteur. Il a ainsi montré que pour une quantité croissante d'arabinose, on observait une quantité croissante OPG synthétisés, dépendante du niveau de synthèse des protéines OpgG et OpgH (figure 56). La figure 56 nous montre donc que l'expression de la fusion *ftsA-uidA* diminue lorsque la quantité d'OPG synthétisés augmente (causée par une augmentation de la quantité d'arabinose).

Lorsque l'on analyse l'expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* en fonction de la quantité d'OPG (figure 57), on observe que l'expression de la fusion est inversement proportionnée à la quantité d'OPG présents dans le périplasme. La quantité d'OPG présents dans le périplasme permet donc de moduler l'expression des gènes cibles du système à deux composants : le système RcsCDB.

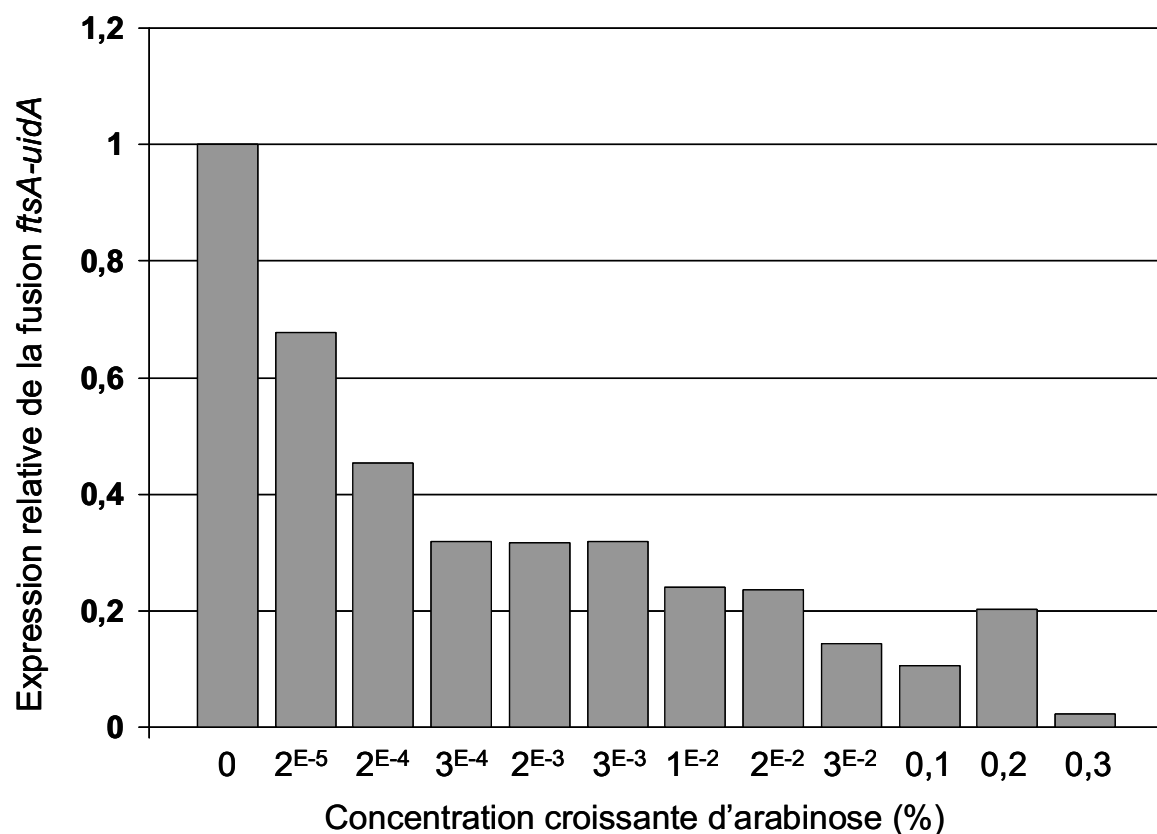


Figure 55 : Expression de la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* de la souche NFB3837 (*opgG* ::Cml, miniTn5 *p_{araBAD}* *opgGH*, miniTn5 *ftsA-uidA*). La souche a été cultivée en milieu 63 complémenté de glycérol (2 g/L) et d'une quantité croissante d'arabinose (de 0 à 0,3%), les cultures ont été arrêtées en phase exponentielle (DO = 0,7), cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU.

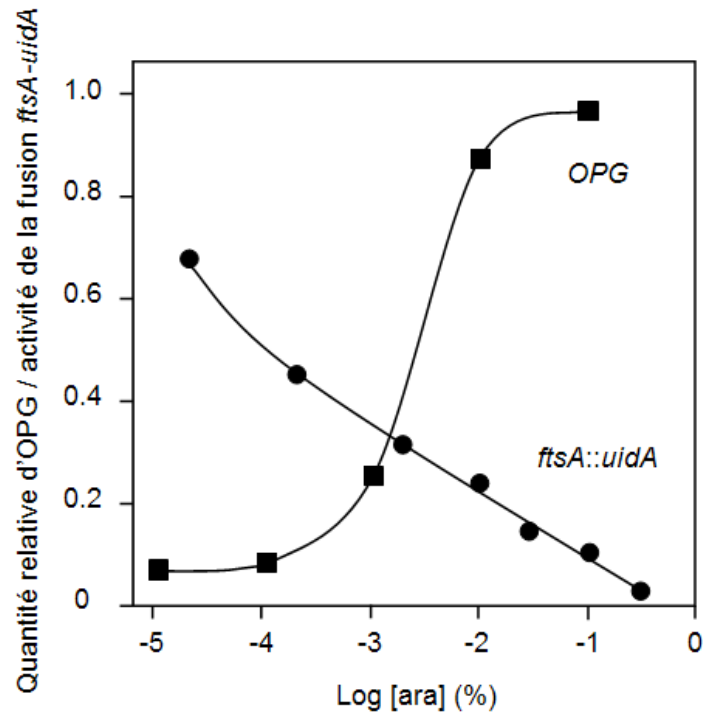


Figure 56: Expression de la quantité relative d'OPG et de l'activité de la fusion *ftsA-uidA* en fonction du logarithme de la concentration en arabinose.

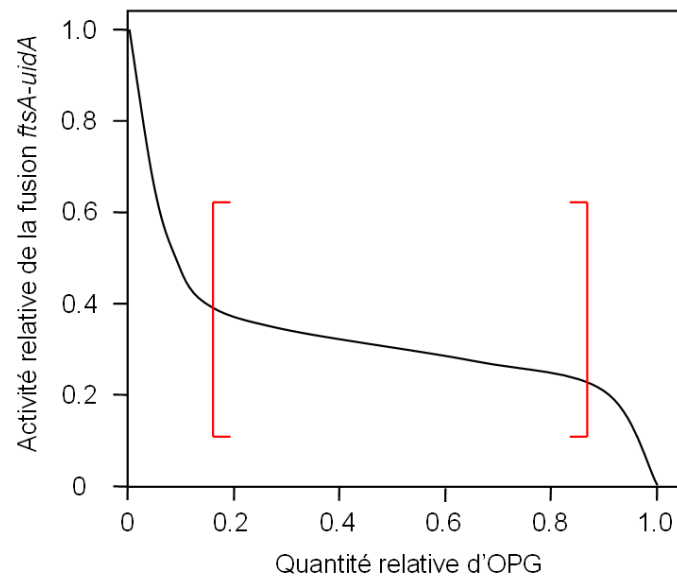


Figure 57: Expression de l'activité de la fusion *ftsA-uidA* en fonction de la quantité relative d'OPG. Les crochets montrent la zone de la quantité d'OPG dans laquelle il existe une relation quasi linéaire entre cette quantité d'OPG et l'activation du système Rcs.

b) Sur la fusion *opgG-uidA*

J'ai voulu voir si la présence d'OPG influençait la transcription de l'opéron *opgGH*. Pour cela, j'ai dosé l'activité β -glucuronidase de la fusion *opgG-uidA* de la souche NFB3839 (*opgG-uidA*, miniTn5 *p_{araBAD} opgGH*) dans 2 conditions : 63+glucose et 63+arabinose.

En présence de glucose, il n'y a pas de transcription de l'opéron *p_{araBAD} opgGH* (induit en présence d'arabinose uniquement), il n'y a donc pas d'OPG synthétisés. En présence d'arabinose, il y a transcription de l'opéron *p_{araBAD} opgGH*. La souche produit des OPG.

↪ Nous avons observé que la fusion *opgG-uidA* pour la souche qui a synthétisé des OPG (culture en présence de l'inducteur : l'arabinose) s'exprime à 70% par rapport à la souche cultivée en présence de glucose (OPG non synthétisés).

↪ Ces résultats semblent donc montrer que la souche qui possède des OPG présente une activité transcriptionnelle de l'opéron *opgGH* plus faible que celle qui n'en possède pas. Il semble donc exister un rétrocontrôle négatif des OPG sur la transcription de l'opéron.

C. Conclusion et Discussion

Au sein du laboratoire, nous nous intéressons aux glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Chez *E. chrysanthemi*, un mutant *opgG*, incapable de synthétiser les OPG, présente un phénotype pléiotrope caractérisé par la diminution de la synthèse et de la sécrétion d'exoenzymes, un aspect muqueux des colonies dû à la surproduction d'exopolysaccharides, la diminution de la motilité, une hypersensibilité aux sels biliaries et la perte de la virulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive (Page et coll., 2001). Cette perte de virulence est due à l'incapacité de la bactérie à croître *in planta*. Une étude protéomique du mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*, réalisée au sein du laboratoire (Bouchart et coll., 2007), a permis de montrer qu'un mutant *opgG* présente une forte perturbation du métabolisme général (augmentation du catabolisme reflétant une augmentation d'un besoin d'énergie) ainsi qu'une surexpression de protéines impliquées dans la mise en conformation et la dégradation des protéines. Cette perturbation du métabolisme est observée chez les bactéries lors de la réponse à divers stress environnementaux. Sachant qu'une relation entre les OPG et le facteur σ^E (stress de l'enveloppe) a déjà été décrite (Dartigalongue et coll., 2001), l'absence d'OPG chez *E. chrysanthemi* pourrait entraîner une activation des voies impliquées dans la réponse au stress de l'enveloppe. L'absence d'OPG engendre également une augmentation de la rigidité des membranes (Bohin et coll., 2005). Tous ces phénotypes laissent penser que la bactérie présente une perturbation des propriétés de l'enveloppe. L'absence d'OPG va engendrer une perturbation de la perception par la bactérie de son environnement et en particulier des interactions entre les bactéries et la plante hôte, ce qui expliquerait l'incapacité à croître *in planta*. Ces oligosaccharides sont donc des constituants du périplasme essentiels.

En 1997, Ebel et coll ont montré qu'une mutation dans le gène *opgH* d'*E. coli* conduit à un état constitutivement activé du système à deux composants RcsCDB, ce mutant présente un phénotype muqueux. Ce phénotype est supprimé par l'ajout d'une mutation dans *rscC*, *rscB* ou *rscA*. Ces auteurs ont alors émis l'hypothèse que les OPG pourraient être le signal perçu par le système Rcs.

Au cours de sa thèse, Franck Bouchart par une approche de recherche de mutation suppressive a également montré qu'il existe un lien entre le système Rcs et les OPG. En effet, il a isolé une mutation permettant de restaurer la quasi-totalité du phénotype sauvage : restauration de la motilité, absence de mucosité, restauration partielle de la résistance aux

sels biliaires, restauration de la sécrétion des exoenzymes, restauration de la virulence sur tubercules de pomme de terre mais pas sur feuilles d'endive. Cette mutation se situe dans le gène *rscC* : *rscC2*. Cette mutation conduit à l'échange d'une alanine en valine (A463V) dans la partie cytoplasmique de la protéine, entre le domaine PAS et le domaine histidine kinase. Ces deux approches génétiques permettent donc de mettre en avant un lien étroit entre les OPG et le système Rcs.

Impact de la mutation *opgG* et caractérisation de la mutation *rscC2*

Le premier objectif de ce travail a été de montrer l'impact des mutations *opgG* et *rscC2* sur les gènes cibles du système Rcs. J'ai ainsi pu mettre en évidence que deux gènes cibles du système Rcs (les gènes *flhD* et *ftsA*) sont influencés par l'absence des OPG (figure 42 et 43). Une mutation *opgG* engendre une diminution de l'expression de la fusion *flhD-uidA* et une augmentation de l'expression de la fusion *ftsA-uidA*. Ces résultats sont corrélés avec les observations phénotypiques du mutant *opgG* : diminution de la motilité (*flhD*) et trouble dans la division cellulaire (*ftsA*) puisque lorsque les bactéries *opgG* sont cultivées en milieu riche, elles sont de plus petites tailles et plus rondes que la souche sauvage (Franck Bouchart, communication personnelle). Sachant que le système Rcs réprime les gènes *flh* (impliqués dans la synthèse du flagelle) et active les gènes *fts* (impliqués dans le contrôle de la division cellulaire), nous sommes amené à conclure que la mutation *opgG* engendre bien une activation du système Rcs causée par une phosphorylation accrue de RcsB (Figure 58).

Nous avons donc émis l'hypothèse que la mutation *rscC2* conduit à une diminution du transfert du signal due à l'absence d'OPG afin de revenir à un niveau proche de celui de la souche sauvage. Les résultats obtenus nous permettent de confirmer cette hypothèse. En effet, la mutation *rscC2* dans un contexte *opgG* permet de diminuer la répression de la fusion *flhD-uidA* et de diminuer l'activation de la fusion *ftsA-uidA* pour revenir à un niveau proche de celui observé pour la souche sauvage (Figure 42 et 43). De plus dans un contexte *rscC2* *opg*⁺, on observe une augmentation de l'expression de la fusion *flhD-uidA* et une diminution de la fusion *ftsA-uidA*. L'ensemble des données obtenues avec les fusions confirme les phénotypes obtenus pour les mutants *rscC2* (dans un contexte *opg*⁺ ou *opg*). L'analyse des fusions dans les contextes où *rscC2* est muté (pour les souches *opg*⁺ et *opg*) nous permet de dire que la mutation *rscC2* engendre une diminution de la signalisation du système Rcs par un niveau faible de phosphorylation de RcsB (figure 58).

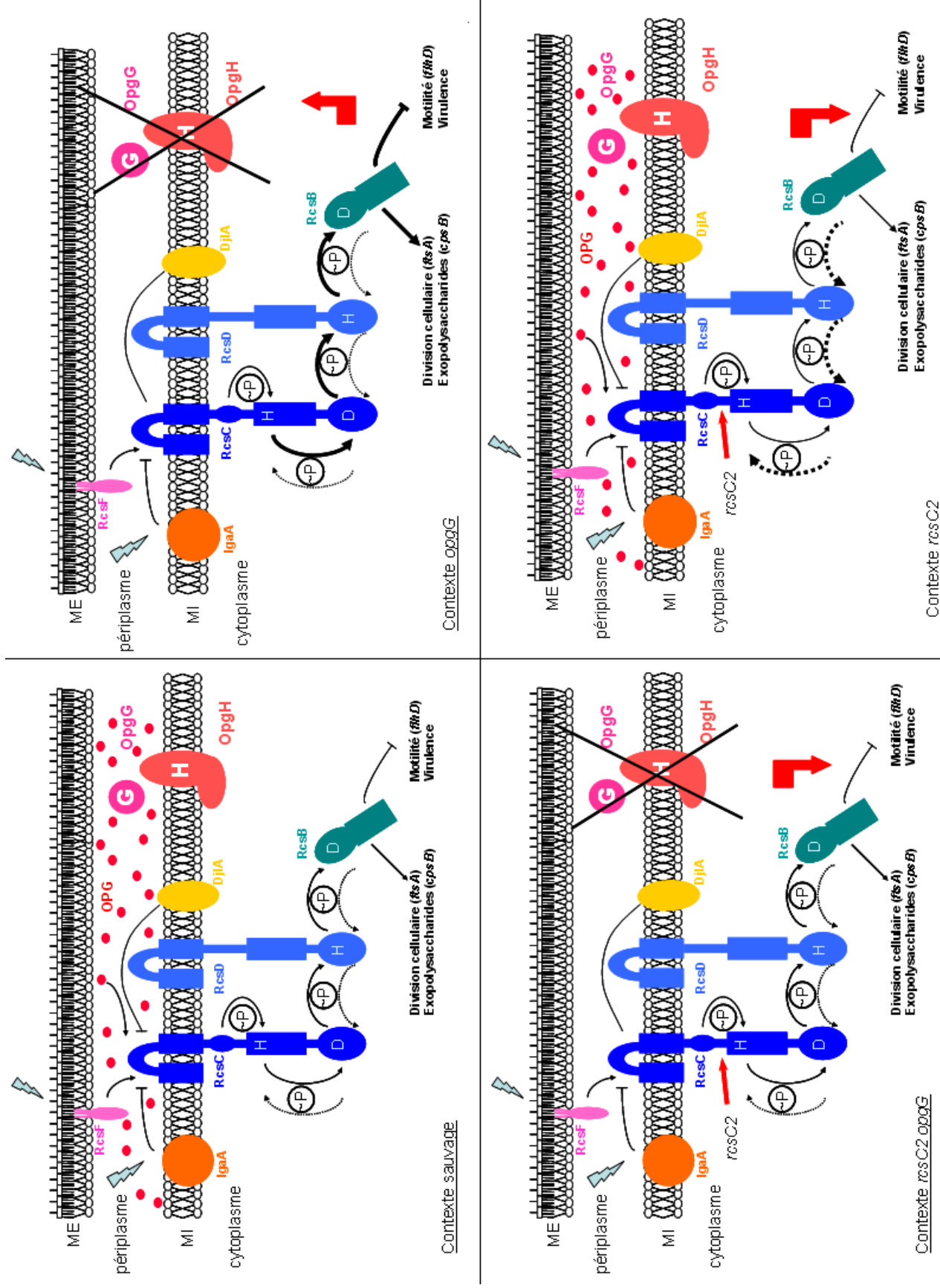


Figure 58 : Représentation de l'effet des mutations *opgG* et *rcsC2* sur le niveau de phosphorylation du système à deux composants et conséquences sur la transcription des gènes cibles.

De plus, l'hypervirulence de la souche *rscC2* nous conforte dans l'idée que cette mutation conduit à un niveau faiblement phosphorylé de RcsB. Il existe une différence entre la souche *rscC2* et la souche *rscB*, c'est-à-dire que le phénotype observé pour un niveau faiblement phosphorylé de RcsB (*rscC2*) ne correspond pas au phénotype de la souche *rscB*. On peut donc envisager l'existence d'une phosphorylation de RcsB indépendante de RcsCD qui expliquerait les différences de phénotype obtenu. Une telle hypothèse a déjà été formulée par Fredericks et coll. en 2006 (les auteurs ont observé, chez *E. coli*, une phosphorylation de RcsB indépendamment de RcsC) et par Castanie-Cornet et coll. en 2007 (les auteurs ont observé que RcsB régule l'expression de certains gènes indépendamment de RcsC/RcsD). Une autre hypothèse envisageable est que la protéine RcsB puisse agir lorsqu'elle est non phosphorylée, cette hypothèse a d'ailleurs été suggérée par Andresen et coll. en 2007, lors de l'étude du phosphorelais chez *E. carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum*). A l'heure actuelle, c'est la première mutation dans *rscC* qui conduit à une diminution du rapport RcsB phosphorylé/RcsB non phosphorylé (mise à part celles modifiant l'histidine phosphorylable du domaine histidine-kinase ou l'aspartate phosphorylable du domaine receveur où il n'y a pas de phosphorylation possible de capteur).

La mutation *rscC2* est dominante

Deux hypothèses ont alors été proposées pour expliquer ce phénotype *rscC2*. Cela peut être dû à une diminution de la phosphorylation de RcsB par RcsC ou une augmentation de sa déphosphorylation. Afin de caractériser la mutation *rscC2*, un mérodiplode a été construit par une insertion ectopique du locus *rscCBD* dans la souche *rscC2, opgG*. L'analyse des phénotypes de ce mérodiplode nous montre que la souche *rscC2, opgG, miniTn5 rscCBD* présente un phénotype proche de celui de la souche *rscC2, opgG* (restauration de la virulence, de la motilité et de l'expression de la fusion *ftsA-uidA*). Puisque la mutation est dominante, on peut alors dire que le faible niveau de phosphorylation est causé par une déphosphorylation accrue de RcsB par RcsC. Si la mutation avait été récessive, ce faible niveau aurait été dû à une diminution de la phosphorylation de RcsB par RcsC. De tels résultats ont déjà été obtenus chez *E. coli* où une mutation ponctuelle dans la région correspondante de la protéine BarA (située entre le segment transmembranaire et le domaine histidine kinase de la protéine) du système à 2 composants BarA/UvrY crée une activité kinase affaiblie et une augmentation de son activité phosphatase (Tomenius et coll., 2006). Les différents phénotypes testés pour le mérodiplode montrent tout de même une légère différence entre la souche *rscC2 opgG* et ce mérodiplode. En effet, l'expression de la fusion *ftsA-uidA* (du mérodiplode) bien que faible est supérieure à celle du double mutant (*fig rsc2*), la motilité est inférieure à celle du double

mutant (tableau 10) et la virulence n'est pas forcément restaurée (pour 10^7 bactéries, nous avons 50% des inoculums qui engendrent la pourriture molle et pour 10^8 bactéries, 100% des inoculums provoquent la pourriture molle). L'ensemble de ces résultats pourrait s'expliquer par la formation d'hétérotétramère (ou de l'association de 2 dimères $2RcsC + 2RcsD$). La différence pourrait alors être due à la formation de 3 combinaisons : $(2RcsC2 + 2RcsD)$, $(RcsC2RcsC + 2RcsD)$ ou $(2RcsC + 2RcsD)$. Dans ce dernier cas, le capteur fonctionnerait normalement et permettrait d'atténuer l'effet de la mutation *rscC2*. Nous ne pouvons également exclure la possibilité que la mutation *rscC2* pourrait changer l'affinité du régulateur (RcsB) pour le capteur (RcsC ou RcsC2 et RcsD).

Les autres mutants du locus *rscCBD*

Nous avons construit des mutants par insertion de cassette (mutant *rscC*, *rscD* et *rscB*) ou par délétion totale du locus ($\Delta rscCBD$). Les différents mutants ne présentent pas les mêmes phénotypes (Cf. g. Bilan des mutations). La mutation *rscC* permet de restaurer la totalité des caractères sauvages de la souche *opgG* (alors que la mutation *rscC2* restaure la quasi-totalité). La mutation *rscC* dans un contexte *opg+* permet une augmentation de l'activité pectinase et une résistance accrue aux sels biliaires (par rapport à la souche sauvage).

La mutation *rscD* permet de restaurer partiellement les caractères phénotypiques de la souche *opgG*. Par contre, le mutant *rscD* est très affecté (perte de la motilité et virulence atténuée). La mutation par insertion de cassette (Cml) dans le gène *rscD* pourrait avoir un effet polaire sur *rscB* étant donné qu'ils font partie de la même unité transcriptionnelle (Cf. Introduction figure 21a). Aux regards des phénotypes observés pour le mutant *rscB*, l'effet de la mutation dans *rscD* ne semble pas entraîner une absence de la protéine RcsB, la cassette chloramphénicol (Cml) pourrait alors entraîner une augmentation de la synthèse de la protéine RcsB. On ne peut également exclure que l'insertion de la cassette dans le gène *rscD* génère une protéine résiduelle RcsD suffisamment grande pour permettre un caractère dominant de la mutation *rscD*. Une mutation de *rscD* par insertion d'un miniTn10 chez *E. coli* présentait déjà un phénotype inattendu (Shiba et coll., 2004). Cette mutation permettait une activation du système Rcs. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'activation serait due à la production d'une protéine tronquée stable, qui pourrait interagir avec RcsC et serait douée d'une capacité d'autophosphorylation qui entraînerait une activation du système sans stimulus. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le phénotype est observé à 30°C mais ne l'est pas à 42°C, température où la protéine tronquée serait instable (Shiba et coll., 2004). Le mutant *rscD* d'*E. chrysanthemi* étudié ici ne présente pas de phénotype de mucosité particulier mais présente une absence de motilité qui pourrait résulter d'une répression accrue engendrée par

une activation du système Rcs. Il serait donc intéressant de construire un autre mutant *rscD* avec une délétion en phase du gène *rscD* et qui n'affecterait pas *rscB*.

La délétion du locus $\Delta rcsCBD$ et la mutation *rscB* permettent de restaurer partiellement certains des caractères phénotypiques de la souche *opgG*, mais ne permettent pas de restaurer la virulence de la souche *opgG*. De plus, la délétion du locus *rscCBD* et la mutation *rscB* engendrent une légère augmentation de certains caractères phénotypiques : motilité et résistance aux sels biliaires pour la souche $\Delta rcsCBD$. Les souches $\Delta rcsCBD$ et *rscB* sont virulentes. Le locus *rscCBD* et le régulateur RcsB ne sont donc pas essentiels pour la virulence d'*E. chrysanthemi*. Par contre, les résultats obtenus montrent que RcsB doit être présent pour restaurer la virulence du mutant *opgG* et que quand RcsB est présent, il doit être faiblement phosphorylé pour pouvoir engendrer la virulence. Garcia-Calderon et coll en 2005 ont montré qu'une hyper activation du système Rcs engendrait la non-virulence de *S. enterica*. De plus, les auteurs ont montré qu'un certain niveau de phosphorylation de RcsB est nécessaire pour la virulence, grâce à l'étude de différentes mutations ponctuelles dans RcsC qui activent le système Rcs. Les auteurs ont alors montré une corrélation entre le degré d'atténuation de la virulence et l'activation du système Rcs (Garcia-Calderon et coll., 2005). Chez *E. chrysanthemi*, ce sont donc les mutations dans les gènes codant les protéines composant le capteur (RcsC et RcsD) qui ont un effet sur la suppression du phénotype *opgG*.

L'expression des gènes soumis à la régulation du système RcsCDB est influencée par la quantité d'OPG.

Il a été montré que la synthèse des polysaccharides extracellulaires répond aux différences d'osmolarité du milieu avec une augmentation de la biosynthèse à haute osmolarité. Cette réponse est dépendante du système Rcs puisque la synthèse n'est possible que lorsque le système est intact (Sledjeski et Gottesman, 1996). En 1997, Ebel et coll. ont montré qu'une mutation dans le gène *opgH* d'*E. coli* conduit à un état constitutivement activé du système à deux composants RcsCDB, en découle l'hypothèse que les OPG pourraient être le signal perçu par le système Rcs. Nous savons que la biosynthèse des OPG varie également en fonction de l'osmolarité. Nous avons donc voulu savoir si le système Rcs perçoit les variations de l'osmolarité par l'intermédiaire des OPG. Pour cela, Gilles Boussemart, au sein du laboratoire, a construit une souche permettant de contrôler la synthèse des OPG indépendamment de l'osmolarité. L'opéron *opgGH* d'*E. chrysanthemi* a été placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose (*p_{araBAD}*). En modulant la quantité d'arabinose dans le milieu, on a ainsi pu faire varier le niveau d'expression des protéines OpgG et OpgH. Ces travaux ont permis à Gilles Boussemart de montrer que la quantité

d'OPG variait avec la quantité d'arabinose et donc de l'expression des protéines OpgG et OpgH. Plus il y a d'enzymes synthétisées, plus la quantité d'OPG augmente (figure 56). Ensemble, nous avons montré que plus la quantité d'OPG était importante, plus l'expression de la fusion *ftsA-uidA* diminuait. Le gène *ftsA* est activé par le système Rcs. Dans un contexte Opg⁻ (sans arabinose), le système Rcs est très activé. Avec une augmentation croissante de la quantité d'arabinose, on observe donc une augmentation progressive de la quantité d'OPG et une diminution corrélée de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* (figure 56). Nous avons ainsi montré que l'expression de la fusion régulée par RcsB est inversement proportionnée à la quantité d'OPG synthétisée dans le périplasme (figure 56 et 57). La quantité d'OPG détermine donc le niveau d'expression de certains gènes, par l'intermédiaire des systèmes à deux composants. Bouchart et *coll* ont montré que l'absence d'OPG induit une réponse au stress (Bouchart et *coll.*, 2007). Les OPG influencent l'expression des gènes cibles du système Rcs. Nous sommes donc amené à nous demander si le système Rcs ne jouerait pas un rôle dans le contrôle permanent de l'état de l'enveloppe.

Contrairement à la souche sauvage, la souche *rscC2 opgG* ne perçoit plus le choc osmotique. La suppression de la mutation *opgG* par la mutation *rscC2* permet un retour à un phénotype proche de la souche sauvage mais la souche présente quand même une altération dans la perception de son environnement. Cette altération pourrait s'expliquer par l'absence d'OPG qui pourrait affecter d'autres systèmes à deux composants comme EnvZ/OmpR impliqué dans la perception de l'osmolarité du milieu. De plus, il avait déjà été postulé que les OPG seraient le signal capté par le capteur du système à deux composants EnvZ/OmpR par l'intermédiaire des boucles périplasmiques de EnvZ (Fiedler et Rotering, 1988).

Dans la construction où l'opéron *opgGH* est sous le contrôle du promoteur *paraBAD*, l'expression de l'opéron ne devrait plus varier en fonction de l'osmolarité. Il reste donc à déterminer si en faisant varier l'osmolarité du milieu sans faire varier la quantité d'arabinose, on peut faire varier ou non l'expression des fusions, en vérifiant qu'alors la quantité d'OPG ne varie pas. Si elles ne varient plus, le système RcsCDB capterait alors bien les variations de l'osmolarité uniquement par l'intermédiaire des OPG.

Les OPG font donc varier par l'intermédiaire du système RcsCDB l'expression des gènes cibles. Cependant la délétion *ΔrscCBD* ou une mutation *rscB* ne permet pas de restaurer le phénotype *opgG*. Ces résultats nous laissent donc penser que les OPG pourraient interagir avec d'autres systèmes à deux composants.

Rôle des protéines interagissant avec le système RcsCDB

La première protéine interagissant avec le système RcsCDB est la lipoprotéine RcsF. La mutation du gène *rcsF* permet de restaurer partiellement certains des caractères phénotypiques de la souche *opgG* (sécrétion des pectinases), abolit la mucosité mais ne permet pas de restaurer la virulence. Shiba et coll en 2004 avait déjà montré qu'une mutation *rcsF* permettait également de supprimer l'induction du gène *cpsB*. De plus, cette mutation dans un contexte *opg+* n'engendre pas de phénotype différent de la souche sauvage observable en laboratoire. La lipoprotéine RcsF est donc essentielle pour la synthèse des exopolysaccharides.

Avec Carmen Ödberg-Ferragut, nous avons surexprimé une version soluble de cette protéine : TAT-RcsF. Chez *E. coli*, nous avons analysé sa surexpression en multicopie et observé un phénotype extrêmement muqueux de la souche portant le plasmide. Ce crible nous a permis de déterminer les régions et les résidus importants de la protéine. Il a été montré que la lipoprotéine RcsF présentait au moins un pont disulfure puisque l'activité de RcsF est dépendante de DsbA, protéine périplasmique qui catalyse la formation de ponts disulfure (Kadokura et coll., 2004). Nous avons donc entrepris la mutagenèse dirigée des cystéines potentiellement impliquées dans la formation de ponts disulfures. Nous avons ainsi pu montrer que seule la mutation des cystéines C110 et C125 engendre la perte de mucosité et donc montrer l'implication de ces cystéines dans un pont disulfure. De plus, Carmen Ödberg-Ferragut a pu mettre en évidence par délétions successives une version soluble raccourcie active. Cette partie minimale active pourra alors être analysée par RMN afin d'essayer d'en déterminer la structure. Certains mutants présentent une activation beaucoup plus importante que la version soluble entière (tableau 11). Il faudrait reconstruire ces mutations dans la séquence codant la lipoprotéine, afin de voir si ces mutations conduiraient également à une activation aussi importante.

Chez *E. chrysanthemi*, j'ai surexprimé faiblement cette version soluble TAT-RcsF et j'ai montré qu'elle permettait d'activer le système Rcs. L'activation est beaucoup plus faible que celle observée pour une mutation *opgG*. Chez *E. chrysanthemi*, j'ai également surexprimé les protéines connues pour interagir avec le système Rcs. J'ai surexprimé faiblement les protéines DjIA et IgaA. Cette surexpression n'a pas eu d'impact significatif sur les différents phénotypes étudiés en laboratoire. Contrairement à la protéine TAT-RcsF, les gènes codant DjIA et IgaA sont sous le contrôle de leur propre promoteur (le gène *TAT-rcsF* est sous le contrôle du promoteur *placUV5*). L'insertion ectopique d'une seule copie n'apparaît pas suffisante pour observer un effet. Il faudrait alors mettre ces gènes sous le contrôle d'un promoteur inductible afin de pouvoir l'exprimer différenciellement pour observer

éventuellement un effet. De plus, il faudrait également surexprimer faiblement une version de la lipoprotéine RcsF, pour voir si l'effet observé lors de la surexpression de la version soluble (TAT-RcsF) est dû au changement de sa localisation dans le périplasme.

Il serait également intéressant de voir l'effet de mutations (par insertion de cassette) dans les gènes *djlA* et *igaA*.

Perspectives et modèle d'action des OPG

Les OPG sont des glucanes présents dans le périplasme. Nous avons montré qu'une variation de leur quantité permettait de moduler l'expression des gènes cibles du système RcsCDB. Cependant nous ne savons pas encore si cette interaction est directe ou non. Si l'interaction est directe, elle devrait s'effectuer avec les boucles périplasmiques de RcsC ou de RcsD. Cette interaction pourrait également interférer dans la relation entre le capteur et les protéines interagissant avec celui-ci dont RcsF. On peut alors envisager de cloner les séquences codant les boucles périplasmiques de RcsC et RcsD et étudier les interactions entre RcsC et ou RcsD avec la version soluble TAT-RcsF mais aussi avec les OPG. L'étude comporterait une partie physiologique en observant les phénotypes lors de la surexpression des boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD en présence ou non des OPG et en présence de la version soluble de TAT-RcsF et une étude biochimique afin de déterminer les interactions entre les boucles de RcsC et de RcsD avec une version soluble de RcsF et les OPG par Biacore.

Il a été récemment montré que le gène *rcaA* de *Y. pseudotuberculosis* a évolué chez *Y. pestis* pour devenir un pseudogène (Sun et coll., 2008). Lorsque l'on remplace le pseudogène *rcaA* d'*Y. pestis* par *rcaA* de *Y. pseudotuberculosis*, on observe une diminution de la formation de biofilms dans la puce (hôte intermédiaire). L'évolution de *rcaA* en pseudogène permet à *Y. pestis* de produire un biofilm pour mieux coloniser sa niche. Chez *Y. pestis*, le gène *rcaD* était prédit comme étant un pseudogène causé par un décalage de phase de lecture. Cependant sa délétion engendre une diminution de la formation des biofilms. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que la partie N-terminal de RcsD pourrait interagir avec RcsC.

Lorsque l'on s'intéresse à la conservation des protéines RcsC et RcsD chez les entérobactéries, on observe que la séquence codant la boucle périplasmique de RcsD est plus conservée que celle codant la boucle périplasmique de RcsC (figure 59 et 60). C'est pourquoi il faudrait envisager de faire de la mutagenèse sur la boucle périplasmique de RcsD pour voir si cela affecte l'interaction potentielle avec RcsF et les OPG.

	Transmembranaire ↓
RcsDEch	-----MPAAIVR FLLLFILLLLMTGAYSINYV NSWMTEKKSALT DIAEGM
RcsDEco	MRQKETTATTRFSLLPGSITRFFLLLIIVLLVTMGVMVQSAVNAWLKDKSYQIVDITHAI
RcsDYpe	-----MQNNSSTHSAANITRYFWLFIVLLMTVGLYAYNYTNAYLTEKKHALTNIANGL
RcsDStm	MSQSDTTVSTRFSLLPGSITRFFLLLIIVLLVTMGVMVQSAVNAWLKDKSYQIVDITHAI
RcsDEca	-----MMPAIIILRYFSLLTVLSILITGTFGYSYINDLLADKKHSLTTIAQGV
	.. * * : * : : : * . * : : * . : * : . :
	Périplasmique
RcsDEch	QKRIDAYRFFTDQIYKNLISDPTQPDTP-NINLITLMPNVFYVEKSGHKTDALIFGPHDK
RcsDEco	QKRVDTWRYVTWQIYDNIAATTSPSSGE-GLQETRLKQDVYYLEKPRRKTEALIFGSHDN
RcsDYpe	QQRIDDYRYHTYQIYDLVNNPIKASEPPPVVQETRLRPDVYYIEKPRRKTDALIFGNHEP
RcsDStm	HKRVDTWRYVTWQIYDNIAATTTPSTGE-GLQETRLKQDVYYLEKPRRKTEALIFGSHDS
RcsDEca	QKRIDTYRFFTYQIYGSLSNESPASDAS--ITAINLMPNVFYVEKNGQKTDALIFGQHDK
	: : * : * : * * : : . : : * : * : * : * : * : * : * :
	Périplasmique
RcsDEch	TTLGAMHRISQYLDVLWGAKTDIYSMYLNGQDNSLTMVSTQPLKDISSQFRGSYLSSMV
RcsDEco	STLEMTQRMSTYLDTLWGAENVPWSMYLNGQDNSLVLISTPLKDLTSGFKESTVSDIV
RcsDYpe	ATLTMALQISDYLDNLWGPQNDTYSMYLNGQDNSLLITQALKEVTSRFKESYLTAFA
RcsDStm	ATLEMTQRMSTYLDTLWGAENVPWSMYLNGQDNSLILISTPLKDLSSGFKESTIGNIV
RcsDEca	GTLTSTVRRISRYLDILWGAENNVYSMYLNGIDNSLTMISTQTLKDISSQFRGNYITVIA
	** : : * * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
	Périplasmique
RcsDEch	ESRKTEMLQQANTLDERESFSPLRKLRFYNDYYFTLRRTTFNQPGLHATVIAFDLSINDLI
RcsDEco	DSRRAEMLQQANALDERESFSNMRLAWQNGHYFTLRRTTFNQPGLHATVIAFDLPINDLI
RcsDYpe	ESRRAEMLQQVNTLDERESFSPLRKLRFQNAYYFTLRRTTFNRPGLHATVIAFDLPINDLI
RcsDStm	DSRRAEMLQQANALDERESFSRLKLAWQNGHYFTLRRTTFNQPGLHATVIAFDLPINDLI
RcsDEca	EARRTEMLQQANVLDERESFSPLRKLRFYNDYYFTLRRTTFNQPGLHATILAFDLPINDLI
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
	Périplasmique
RcsDEch	PRNMSRDNFMLRQQTTPPVNADANA-DNDIPTDIRREGALLEISAQLMNSPIKLVYAIPLG
RcsDEco	PPGMPLDSFRLEPDATATGNNEKEGTDSVSIHFNSTKIEISSALNSTDMRLVWQVPYG
RcsDYpe	PPNMARSNFLQPKVPLNEGATP-EDIAATSVSLNGSWVEFSAPLANVTLKIIYRVPVS
RcsDStm	PPGMPLDSFRIEPDATQATGRSSEKEAPDSVTISFNGSKIEISSALNSTGMRLIWQVPFG
RcsDEca	PDTIPREFLMLKPDTP-AASNMD-SNGEGTADVQLHGSNLEISATLVNAPIKIVFQVPVK
	* : . :
	↓ Transmembranaire
RcsDEch	RLVTDMLRN NIWVIALNLALLTSLMGFYALRRYYAR----PKDDLSHHLKEQORMYGE
RcsDEco	TLLDQLNILLPLLLNIGLLALALFGYTTFRHFSSRSTESVPSTAVNNELRILRAINEE
RcsDYpe	HLIIDLLINNFWLILANIVLLALTILAAYFVRHQYGR----PSADVTGQLEAQRLLSQE
RcsDStm	TLLDQLNILLPLLLNIGLLALALFGYATFRHQPGRSTESTSGNAANNELRVLRRAINEE
RcsDEca	TLIVDSLNNIWLNNLNLVLLSASIAFGYLFRRKYAH----PGEDLSHQLEKKLDIYRE
	* : * * * : : * : * : : . . * : : . . . * . : *
	Cytoplasmique
RcsDEch	IVSRIPVGVLVYDFSNNKVMANALAERLYPHLSLKKISTLAEEHQGVIAQATVDNEMYEV
RcsDEco	IVSLLPLGLLVHDQESNRTVISNKIADHLLPHLNLQNITMAEQHQGIQATINNELYEI
RcsDYpe	IITNLPQGLLIYDFSNSTVIASNKIAENLLPHLNLQKIATMAEQHHGVIQGTVNNEVYEI
RcsDStm	IVSLLPLGLLVYDQEGNRTVISNKIADHLLPHLNLQNITSMAEQHQGVIAQATINNELYEI
RcsDEca	TTGKIPMGVLVYDFSNNKVVIQNERAEHLLPHLSLQKITNMADEHQGVIAQVTINNEMYEI
	: * * : * : * . . : * * : * * * : * : * : * : * : * : * : * :

Figure 60 : Comparaison de la séquence du domaine périplasmique (en bleu) de la protéine RcsD d'*E. chrysanthemi* (RcsDEch) avec celle d'*E. coli* (RcsDEco), de *Yersinia pestis* (RcsDYpe), de *Salmonella typhimurium* (RcsDStm) et *Erwinia carotovora ssp atroseptica* (RcsDEca). En jaune sont représentés les deux domaines transmembranaires prédits par le logiciel Toppred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

Discussion globale

. Discussion globale

L'enveloppe des Protéobactéries est composée de deux membranes, la membrane interne et la membrane externe, délimitant un compartiment aqueux : le périplasme. Ce compartiment contient le peptidoglycane, les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) et des protéines. Les protéines du périplasme jouent un rôle dans de nombreuses fonctions comme dans la sécrétion de protéines ou de polysaccharides extracellulaires, dans la détoxification par la dégradation et/ou le transport sortant de toxiques, ou encore dans la nutrition par le transport entrant et la dégradation de nutriments. L'enveloppe est donc un lieu d'échanges. L'enveloppe est également un lieu de perception par la bactérie du milieu extérieur. La bactérie va pouvoir grâce à la perception de son environnement engendrer des mécanismes lui permettant de s'adapter à celui-ci. Cette perception va notamment s'effectuer par les systèmes à deux composants formés d'un capteur transmembranaire situé dans la membrane interne et d'un régulateur transcriptionnel cytoplasmique.

Ma thèse a comporté deux parties distinctes visant toutes deux à comprendre comment la bactérie va percevoir son milieu et s'y adapter en faisant varier la transcription des gènes nécessaires pour le bon déroulement de l'infection. Cette thèse est une contribution à la compréhension du rôle du périplasme dans la perception de l'environnement par la bactérie.

Le périplasme est donc un compartiment très complexe de la bactérie, avec un aspect de gel et permettant d'effectuer un « sas » entre le cytoplasme de la bactérie et le milieu externe par l'intermédiaire des membranes externe et cytoplasmique. Ce compartiment comprend de nombreuses protéines essentielles pour le transport à travers l'enveloppe, ou depuis le cytoplasme vers le milieu extérieur. A la surface de la membrane cytoplasmique, on retrouve les boucles périplasmiques de nombreux capteurs permettant à la bactérie de percevoir son environnement afin de s'y adapter.

Le périplasme contient 2 types de glucanes spécifiques des bactéries : la couche de peptidoglycane permettant la formation d'un réseau dense autour de la cellule donnant ainsi la forme de la bactérie et les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG).

L'étude protéomique du mutant *opgG* (Bouchart et coll., 2007) nous a amené à nous intéresser à une protéine périplasmique très abondante dans le périplasme : une endo-1,4- β -galactanase périplasmique (GanA) (Delangle et coll., 2007). Il s'est avéré que cette protéine fait partie d'un système de transport et de dégradation des β -galactanes, produits issus de la dégradation de la pectine. Ce système Gan permet donc le transport

d'oligosaccharides à travers l'enveloppe de la bactérie afin de les utiliser comme source de carbone. Ce transport nécessite plusieurs étapes de dégradation indispensables dont une qui a lieu dans le périplasme où GanA dégrade les chaînes de galactanes (entrant par l'intermédiaire de la porine GanL, et en collaboration avec GanE) en oligomères (gal₃) qui sont alors transportables par le système de transport de type ABC (GanFGK₂) vers le cytoplasme de la bactérie. Lors de l'infection de la plante, les gènes codant ce système Gan sont fortement induits. La bactérie, une fois dans la plante hôte, va percevoir son environnement et activer l'ensemble des gènes codant les enzymes qui permettront la déstructuration de la paroi et l'utilisation des produits de dégradation comme source de nutriments pour un développement optimal de la bactérie dans la plante hôte.

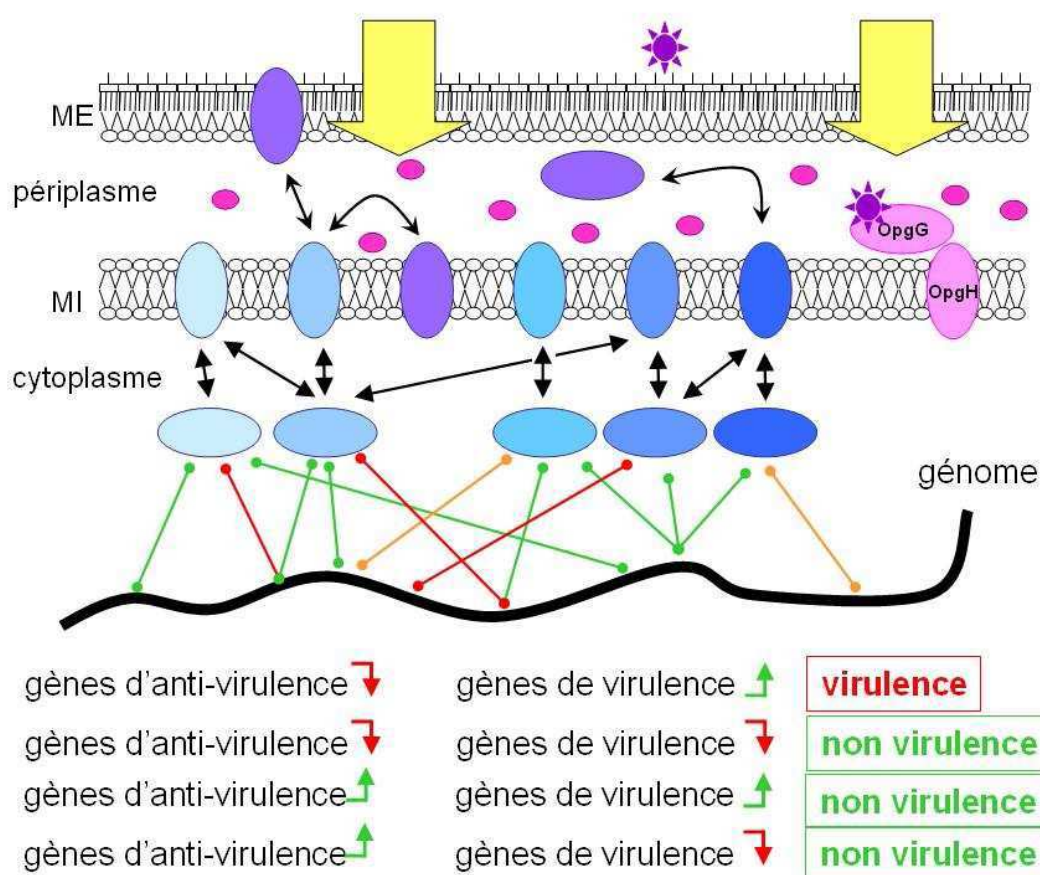


Figure 59 : Représentation de plusieurs systèmes à deux composants agissant sur les gènes cibles, en interagissant ou non avec les OPG (ronds rose). La virulence va résulter de l'activation des gènes de virulence et de l'inactivation des gènes d'antivirulence. Une perturbation de l'action des systèmes à deux composants peut engendrer des variations d'expression des gènes conduisant à une absence de virulence (activation des gènes d'antivirulence ou inactivation des gènes de virulence). Un inhibiteur de la synthèse des OPG (étoile violette) pourrait faire varier la perception des systèmes à deux composants, il en résulterait une diminution du pouvoir pathogène de la bactérie.

Les OPG sont des oligosaccharides essentiels pour la virulence d'*E. chrysanthemi*. Leur absence conduit à un stress pour la bactérie qui ne percevrait plus la réalité de son environnement. Chez *E. coli*, il a été montré que ces OPG, présents dans le périplasme, pouvaient interagir avec des systèmes à deux composants (présents dans la membrane interne) qui sont impliqués dans la perception de changements environnementaux. Les OPG seraient le signal capté par les capteurs de systèmes à deux composants par l'intermédiaire de leurs boucles périplasmiques : EnvZ (Fiedler et Rotering, 1988) et RcsC (Ebel et coll., 1997). Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la mutation *opgG* engendrait une activation du système Rcs, qu'une mutation ponctuelle *rscC2* supprime la mutation *opgG*. Cette mutation *rscC2* diminue la signalisation du système Rcs par une déphosphorylation accrue du régulateur RcsB par le capteur RcsC (un niveau faible de phosphorylation de RcsB). De plus, nous avons montré que l'expression des gènes soumis à la régulation du système RcsCDB est influencée par la quantité des OPG.

De nombreux travaux ont montré l'importance du système Rcs dans la virulence, comme pour *Salmonella* (Mouslim et coll., 2004), pour les souches pathogènes d'*E. coli* (Tobe et coll., 2005), pour *E. amylovora* (Bereswill et Geider, 1997) ou encore *Y. enterocolitica* (Venecia et Young, 2005). Il a ainsi été suggéré que les bactéries pathogènes diminuaient l'expression de certains gènes lors de l'infection, gènes incompatibles avec le bon déroulement de l'infection (diminution de l'expression des gènes d'antivirulence) (Mouslim et coll., 2004). Chez *E. chrysanthemi*, la délétion *ArcsCBD* ou une mutation *rscB* ne permet pas de supprimer la mutation *opgG*. Ces résultats nous laissent penser que les OPG pourraient interagir avec d'autres systèmes à deux composants que le système RcsCDB. C'est pourquoi Gilles Boussemart cherche à identifier de nouveaux systèmes à deux composants dont l'activité serait modulée par les OPG. Ainsi les OPG pourraient agir sur une série de gènes cibles par l'intermédiaire des systèmes à deux composants. La virulence serait donc la résultante complexe de l'activation des gènes de virulence et de l'inhibition des gènes d'antivirulence (figure 59) par les régulateurs des systèmes à deux composants qui sont eux même phosphorylés par un plusieurs capteurs des différents systèmes à deux composants.

Park & Forst en 2006 ont proposé un modèle dans lequel le système à deux composants EnvZ/OmpR est impliqué notamment dans la régulation des gènes *flhDC* impliqués dans la motilité, tout comme le système Rcs. La relation entre les OPG et le système EnvZ/OmpR serait donc également à approfondir.

De plus, une étude récente chez *E. carotovora* (Cui et coll., 2008) a montré que les protéines FlhDC régulent l'expression de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la virulence et la production d'exoenzymes et notamment la protéine GacA qui fait partie du système à deux composants GacS/GacA. Nous avons montré que l'expression de l'opéron *flhDC* varie en absence d'OPG et ce par l'intermédiaire du système Rcs.

L'interaction des OPG avec d'autres systèmes à deux composants pourrait donc être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'autres systèmes à deux composants.

Enfin à plus long terme, de nombreuses recherches sont menées afin de trouver de nouvelles cibles pour des agents antibactériens. Les systèmes à deux composants permettent de réguler l'expression coordonnée de gènes impliqués dans la virulence. C'est pourquoi les systèmes à deux composants sont considérés comme des cibles privilégiées pour lutter contre les pathogènes. Les OPG sont des constituants périplasmiques importants pour la virulence de nombreuses bactéries, phytopathogènes ou zoopathogènes. L'absence des OPG rend les bactéries peu ou pas virulentes. Le lien étroit qui existe entre les OPG et le système Rcs connu pour réguler la virulence ainsi que le lien possible avec d'autres systèmes à deux composants nous conforte dans l'idée que les OPG sont une cible à privilégier. Des recherches d'inhibiteurs de synthèse pourraient ouvrir de nombreuses perspectives (figure 59).

Matériels et Méthodes

• Matériels et méthodes

A. Souches et milieux

1. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

Les souches d'*E. coli* et d'*E. chrysanthemi* sont cultivées respectivement à 37°C et à 30°C, et sous agitation à 140 rpm et 125 rpm.

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Une densité optique de 1 correspond à 10⁹ bactéries/mL.

Les milieux de culture utilisés sont :

- Le milieu LB (Luria Broth), le milieu LB est aussi utilisé sans NaCl (LB-NaCl) afin d'avoir un milieu d'osmolarité réduite (150 mosM) (Miller, 1992).
- Le milieu 63 (Miller, 1992) est un milieu minimum complémenté par les métabolites nécessaires à la croissance des différentes souches : les acides aminés et bases azotées à 40 mg/mL, la thiamine à 2 mg/mL et la source de carbone à 2 g/L. Par contre, le polygalacturonate est ajouté à une concentration de 4 g/L. Les extraits de pommes de terre (épluchées) ou de feuilles d'endive sont obtenus en broyant les produits au robot ménager puis en centrifugeant à 4°C pendant 10 min à 4000 g. Le surnageant est ensuite stérilisé sur filtre de 0,45 µm (Millipore). Ces extraits sont ajoutés dans le milieu de culture à une concentration de 10 % (vol/vol).
- Ces milieux sont solidifiés par l'ajout d'agar à 15 g/L. La motilité des bactéries est testée sur boîte de milieu LB gélosé à 4g/L.
- Le milieu bas phosphate se compose de Tris HCl (120 mM), NaCl (90 mM), KCl (40 mM), NH₄Cl (21 mM), CaCl₂ (0,1 mM), Na₂SO₄ (25 µM), KH₂PO₄ (0,5 mM), bactopectone (0,25%), pH 7,4. Ce milieu carencé en phosphate est utilisé pour favoriser la perte des plasmides introduits chez *E. chrysanthemi* par électroporation, Il est complémenté par une source de carbone et l'antibiotique adéquats (Torriani, 1968).
- Pour la détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice) en sels biliaires, les bactéries sont étalées sur des boîtes de milieu LB gélosé contenant des concentrations variables de sels biliaires (Bile salts N°3, Difco laboratories).
- Les souches sont conservés à -20°C et -80°C avec du glycérol 15%.

- Le X-Gal (5bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside) et le X-Gluc (5bromo-4chloro-3indolyl-β-D-glucuronide) sont utilisés à une concentration de 20 µg/mL.

- L’AZCL-galactane (« Azurine-crosslinked galactan », Megazyme, Bray, Irlande) est composé de particules en suspension qui sont étalées en surcouche à 2 g/l sur un milieu solide contenant du glycérol comme source de carbone. La dégradation de ce substrat génère un halo bleu diffusible.

- Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes (tableau 15):

Antibiotique	<i>E. coli</i>	<i>E. chrysanthemi</i>
Ampicilline (Amp)	50 µg/mL	25 µg/mL
Chloramphénicol (Cml)	25 µg/mL	12,5 µg/mL
Kanamycine (Kan)	50 µg/mL	25 µg/mL
Spectinomycine (Sp)	100 µg/mL	50 µg/mL
Tétracycline (Tet)	25 µg/mL	12,5 µg/mL

Tableau 15: Concentration des antibiotiques.

2. Génotypes des souches utilisées

Les souches d’*E. coli* K12 et d’*E. chrysanthemi* utilisées sont décrites respectivement dans les tableaux 16 et 17.

Souche	Génotype	référence
JM83	$\Delta(lac-pro)$, <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ($\phi 80\Delta lacZ-M15$)	Vieira et Messing, 1982
Top10	<i>F⁻ mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) $\Phi 80lacZ\Delta-M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>mupG</i>	Invitrogen
S17-1pir	<i>recA1</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR⁻M⁺</i> , <i>RP4:2-Tc::Mu-Kan::Tn7</i> , λ <i>pir</i>	Lazzaroni
SM10 pir	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lacY</i> , <i>recA::cat-aadA</i> (<i>CmlR</i>), <i>pho-510</i> , λ <i>recA+</i>	De lorenzo et coll., 1994
BW25141	Δ (<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ</i> 4787 Δ (<i>::rrnB-3</i>), Δ (<i>phoB-phoR</i>)580, λ -, <i>galU</i> 95, <i>uidA3</i> (Δ):: <i>pir</i> ⁺ \$, <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (Δ -ins):: <i>FRT</i> , <i>rph-1</i> , <i>DE(rhaD-rhaB)</i> 568, <i>rrnB-3</i> , <i>hsdR514</i>	Datsenko & Wanner 2000
SK1291	<i>F⁻ λ rph-1</i> $\Delta lacIZ$ (<i>MLuI</i>) Φ (<i>cps-lacZ</i>)	Davalos-Garcia et coll., 2001

Tableau 16 : Souches d’*E. coli*.

Souche	Génotype	source ou référence
EC3937	Wild type	Collection du laboratoire
NFB3500	<i>opgG::uidA-Kan</i>	Page et coll., 2001
NFB3591	<i>opgG::uidA-Kan, rcsC2</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3602	<i>opgG::Cml, ura</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3609	<i>opgG::Cml, ura, rcsC2</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3611	<i>rcsC2</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3669	<i>rcsD::Cml</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3670	<i>opgG::uidA-Kan, rcsD::Cml</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3682	<i>rcsC::Cml</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3683	<i>opgG::uidA-Kan, rcsC::Cml</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3753	$\Delta rcsCBD::Cml$	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3754	<i>opgG::uidA-Kan, $\Delta rcsCBD::Cml$</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3800	<i>Tn5flhD-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3805	<i>opgG::Cml, ura, Tn5flhD-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3806	<i>opgG::Cml, ura, rcsC2, Tn5flhD-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3807	<i>rcsC2, Tn5flhD-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3808	$\Delta rcsCBD::Cml, Tn5flhD-uidA$	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3809	<i>Tn5ftsA-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3810	<i>opgG::Cml, ura, Tn5ftsA-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3811	<i>opgG::Cml, ura, rcsC2, Tn5ftsA-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3812	<i>rcsC2, Tn5ftsA-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3813	$\Delta rcsCBD::Cml, Tn5ftsA-uidA$	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3862	<i>Tn5cpsB-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3863	<i>opgG::Cml, ura, Tn5cpsB-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3864	<i>opgG::Cml, ura, rcsC2, Tn5cpsB-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3865	<i>rcsC2, Tn5cpsB-uidA</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3866	$\Delta rcsCBD::Cml, Tn5cpsB-uidA$	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3859	<i>opgG::Cml, ura, rcsC2, Tn5ftsA-uidA, Tn5rcsCDB</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3874	<i>Tn5ftsA-uidA, Tn5TAT-rcsF clone 1</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3893	<i>Tn5ftsA-uidA, Tn5TAT-rcsF clone 2</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3894	<i>Tn5ftsA-uidA, Tn5TAT-rcsF clone 3</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3895	<i>Tn5ftsA-uidA, Tn5TAT-rcsF clone 4</i>	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3875	<i>Tn5ftsA-uidA, Tn5djlA clone 1</i>	Cette étude, partie RcsCDB

NFB3896	Tn5ftsA-uidA, Tn5djlA clone 2	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3897	Tn5ftsA-uidA, Tn5djlA clone 3	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3898	Tn5ftsA-uidA, Tn5djlA clone 4	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3876	Tn5ftsA-uidA, Tn5igaA clone 1	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3899	Tn5ftsA-uidA, Tn5igaA clone 2	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3900	Tn5ftsA-uidA, Tn5igaA clone 3	Cette étude, partie RcsCDB
NFB3901	Tn5ftsA-uidA, Tn5igaA clone 4	Cette étude, partie RcsCDB
A4807	ganB::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
A4809	ganA::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
A4810	ganE::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
A4863	ganR::Cml	Cette étude, partie Gan
A4868	ganL::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
NFB3677	ganA::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3674	ganB::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3677	crp::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3679	ganA::uidA-Kan, crp::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3680	lacZ::Cml	Collection du laboratoire
NFB3681	ganB::FRT	Cette étude, partie Gan
NFB3687	lacZ::Cml, ganB::FRT	Cette étude, partie Gan
NFB3701	ganK::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
NFB3703	ganK::uidA-Kan, crp::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3758	ganR::uidA-Kan	Cette étude, partie Gan
NFB3792	ganL::uidA-Kan, crp::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3793	ganE::uidA-Kan, crp::Cml	Cette étude, partie Gan
NFB3718	opgG, ganA::uidA	Cette étude, partie Gan
NFB3843	ΔrcsCBD, ganA::uidA	Cette étude, partie Gan

Tableau 17 : Souches d’*E. chrysanthemi*.

3. Plasmides utilisés

Souche	Génotype	source ou référence
pBSK	Amp ^R	Stratagene
pUC18Not	Amp ^R	Yanisch-Perron et <i>coll.</i> , 1985
pUC19	Amp ^R	Yanisch-Perron et <i>coll.</i> , 1985
pNFCml	Cml ^R	Collection du laboratoire
pUIDK11	Cml ^R , portant la cassette <i>uidA</i> -Kan	Bardonnet & Blanco, 1992
pOK	<i>sacB</i> , <i>sacR</i> , <i>mobRK2</i> , <i>oriRK6</i> , Spe ^R	Huguet et <i>coll.</i> , 1998
pCP20	FLP ⁺ , λ cI857 ⁺ , λ prRep ^{ts} , Amp ^R , Cml ^R	Cherepanov & Wackernagel. 1995.
pUTminiTn5-Tet ^R	Amp ^R , Tet ^R	De Lorenzo et <i>coll.</i> , 1990
pUTminiTn5-Sp ^R	Amp ^R , Sp ^R	De Lorenzo et <i>coll.</i> , 1990
pUTminiTn5-Kan ^R	Amp ^R , Kan ^R	De Lorenzo et <i>coll.</i> , 1990
pXfd11	pYZ4, séquence signal d'OpgD de <i>Xylella fastidiosa</i> entre NcoI et SacI devant <i>blaM</i> entre SacI et EcoRI	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW137	pUC18, <i>resC</i>	Franck Bouchart
pNFW149	pUC18, <i>resC</i> ::Cml	Franck Bouchart
pNFW161	pOK, <i>resC</i> ::Cml	Franck Bouchart
pNFW134	pUC18, <i>resD</i>	Franck Bouchart
pNFW135	pUC18, <i>resD</i> ::Cml	Franck Bouchart
pNFW155	pOK, <i>resD</i> ::Cml	Franck Bouchart
pNFW170	pUC18, Δ (<i>resCB resD</i>)	Cette étude
pNFW173	pUC18, Δ (<i>resCB resD</i>)::Cml	Cette étude
pNFW257	pUC18Not, <i>resCBD</i>	Cette étude
pNFW261	pUTminiTn5-Sp ^R , <i>resCBD</i>	Cette étude
pNFW230	pUC18Not, <i>resCB</i> ::Cml- <i>resD</i>	Cette étude
pNFW183	pBSK, <i>resF</i>	Cette étude
pNFW184	pBSK, <i>resF</i> ::Cml	Cette étude
pNFW181	pUC18Not, <i>flhD</i>	Cette étude
pNFW203	pUC18Not, <i>flhD-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW204	pUC18Not, <i>flhD-uidA</i>	Cette étude

pNFW215	pUTmini-Tn5Kan, <i>flhD-uidA</i>	Cette étude
pNFW182	pUC18Not, <i>ftsA</i>	Cette étude
pNFW193	pUC18Not, <i>ftsA-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW201	pUC18Not, <i>ftsA-uidA</i>	Cette étude
pNFW220	pUTmini-Tn5Kan, <i>ftsA-uidA</i>	Cette étude
pNFW205	pUC18Not, <i>cpsB</i>	Cette étude
pNFW206	pUC18Not, <i>cpsB-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW207	pUC18Not, <i>cpsB-uidA</i>	Cette étude
pNFW262	pUTmini-Tn5Kan, <i>cpsB-uidA</i>	Cette étude
pNFW258	pUC18Not, <i>djlA</i>	Cette étude
pNFW289	pUTminiTn5-Sp ^R , <i>djlA</i>	Cette étude
pNFW259	pUC18Not, <i>igaA</i>	Cette étude
pNFW265	pUTminiTn5-Tet ^R , <i>igaA</i>	Cette étude
pNFW175	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW177	pUC18Not, <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135)	Cette étude
pNFW271	pUTminiTn5-Tet ^R , <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135)	Cette étude
pNFW268	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135, C75S)	Cette étude
pNFW246	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135, C110S)	Cette étude
pNFW247	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-Q135, C119S)	Cette étude
pNFW269	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-K131, C125S)	Cette étude
pNFW225	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-Q135)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW238	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (E57-Q135)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW226	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (D66-Q135)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW223	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-R65)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW224	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (L18-D109)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW227	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-D109)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW228	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-A117)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW229	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-Q126)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW239	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-G127)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW240	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-A129)	Carmen Ödberg-Ferragut
pNFW241	pYZ4, <i>TAT-rcsF</i> (P49-K131)	Carmen Ödberg-Ferragut

pI2872	pGEM-T, <i>ganA</i>	Cette étude
pI2873	pGEM-T, <i>ganA::uidA</i> -Kan	Cette étude
pI2874	pGEM-T, <i>ganB</i>	Cette étude
pI2876	pGEM-T, <i>ganB::uidA</i> -Kan	Cette étude
pI2866	pGEM-T, <i>ganE</i>	Cette étude
pI2867	pGEM-T, <i>ganE::uidA</i> -Kan	Cette étude
pI2868	pGEM-T, <i>ganL</i>	Cette étude
pI2869	pGEM-T, <i>ganL::uidA</i> -Kan	Cette étude
pI2870	pGEM-T, <i>ganR</i>	Cette étude
pI3136	pGEM-T, <i>ganR::Cml</i>	Cette étude
pNFW130	pBluescript, <i>ganA</i>	Cette étude
pNFW140	pBluescript, <i>ganA::Cml</i>	Cette étude
PNFW142	pBluescript, <i>ganB</i>	Cette étude
PNFW145	pBluescript, <i>ganB::Cml</i>	Cette étude
PNFW154	pOK, <i>ganB::Cml</i>	Cette étude
PNFW162	POK, <i>ganB::FRT</i>	Cette étude
pNFW158	pBluescript, <i>ganK</i>	Cette étude
pNFW163	pBluescript, <i>ganK::uidA</i> -Kan	Cette étude

Tableau 18 : Plasmides utilisés.

B. Techniques génétiques

1. Transduction

Les transductions chez *E. chrysanthemi* ont été effectuées en utilisant le phage ϕ EC2 d'après Résibois et coll. (1984).

2. Conjugaison (pUT et pOK)

Des volumes égaux (0,2 mL) de souches donatrices S17-1 et réceptrices (*E. chrysanthemi*) sont mélangés et déposés sur boîte de milieu 63 sans source de carbone pendant 1h à 30°C. Les bactéries sont ensuite reprises dans 1,5 mL de milieu 63. Des échantillons de 0,1 mL de cette suspension (diluée à 10^{-1} ou non) sont étalés sur milieux sélectifs :

- Pour pUT : sur boîtes de milieu 63 + antibiotique du miniTn5. Les colonies apparues sont repiquées sur boîte 63 + antibiotique et boîte 63 + antibiotique + ampicilline (résistance apportée par le plasmide pUT). Seuls les clones sensibles à l'ampicilline sont utilisés.
- Pour pOK : dans un premier temps, les bactéries sont étalées sur boîtes de milieu 63 + glycérol + antibiotique (cassette interrompant le gène d'intérêt). Puis les cellules sont reprises dans 2mL de 63 et étalées à différentes dilutions sur boîtes de milieu 63 + saccharose (5%) + antibiotique (cassette interrompant le gène d'intérêt). Cela permet une sélection associée à la perte du plasmide. En effet, le vecteur contient le gène *sacB* qui rend la souche sensible au saccharose (Huguet et al., 1998).

3. Transformation

Les cellules d'*E. coli* sont rendues compétentes et transformées selon la méthode au chlorure de rubidium d'Hanahan (1983).

4. Electroporation

Cette technique est notamment utilisée pour la construction de mutants par insertion de cassette. Les cellules d'*E. chrysanthemi* ont été transformées par électroporation d'après Sambrook et coll (1989). Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB + antibiotique (cassette interrompant le gène d'intérêt) permettant la sélection des bactéries ayant reçu le plasmide. Des cultures successives dans un milieu carencé en phosphate complémenté par une source de carbone et l'antibiotique adéquat sont utilisées pour favoriser la perte des plasmides et observer la recombinaison homologue (Torriani, 1968).

C. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction et purification d'ADN : plasmide, bande, ADNg

- La préparation de l'ADN plasmidique est effectuée par lyse alcaline selon la méthode de Birnboim & Doly (1979). L'ADN est finalement précipité par un volume d'isopropanol, centrifugé, lavé à l'éthanol froid 70%, centrifugé, séché et remis en solution dans l'eau. Lorsqu'il était nécessaire (sous-clonage, séquençage), la purification de l'ADN plasmidique est obtenue en utilisant le kit Nucleospin plasmid (Macherey Nagel).

- L'ADN chromosomique est préparé selon la méthode de Davis et al (1980).
- L'extraction de bande dans des gels s'effectue grâce au kit Nucleospin Extract II (Macherey Nagel).

2. Enzymes de restriction et de modification

- Les endonucléases de restriction (New England Biolabs, Takara, Boehringer Mannheim, Eurogentec, Gibco BRL) ont été utilisées selon les recommandations des fabricants. Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% en présence de bromure d'éthidium (1µg/mL) et de RNase (4µg/mL, Sigma) dans du TAE (Tris 200mM, EDTA 5 mM, ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique). Le marqueur de masse moléculaire est le « Smart ladder » d'Eurogentec.

- Certains fragments sont rendus bouts francs grâce au fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) utilisée dans les conditions spécifiées par le fabricant. Pour permettre l'activité ADN-polymérase (5'→3'), les dNTP sont ajoutés à une concentration de 2 mM et la réaction s'effectue 10 minutes à température ambiante. Si le site nécessite d'être traité par l'activité exonucléase (3'→5'), la réaction a lieu 5 minutes sans dNTP à température ambiante puis l'ajout des dNTP (concentration finale 2mM) permet de terminer par une activité ADN-polymérase (5'→3'). L'enzyme est ensuite inactivée 20 minutes à 65°C.

- L'ADN-ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs) a été utilisée dans le tampon fourni par Biolabs, pendant la nuit à 4°C ou une heure à température ambiante.

3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR et PCR inverse)

L'ADN polymérase (Taq DNA polymerase, Eppendorf) a permis de réaliser des PCR dans les conditions standard préconisées par le fabricant. Les réactions sont réalisées dans un volume de 50µL. Les PCR sont faites avec 100 ng d'ADN génomique ou sont effectuées avec une colonie. Le tableau 19 récapitule les amorces utilisées.

Amorce	Séquence
ganRG	GCGGATCCGGACCAGCTGTTACAATC
ganRD	CGTCTAGATGCGCCGCAACATGCTAC
ganLG	GCAGATCTGGATTGTAACAGCTGGTCC
ganLD	CGTCTAGATAACCGGTCGGTGAGCGG
ganK1	AAACTGCAGGCCCGGCATGACAAACCCCTTTCGCCAGAA
ganK2	AAACTGCAG CGCGTCGGTGAAGCTGTCTTGCTCGGCCTT
ganEG	GCGGATCCTCAACGGGTTATCAATACGG
ganED	CGTCTAGAGTTGTCCTTGCTCCAGGTCG
ganA1	AAGGATCCCCAGTTACACCACCTACGC
ganA2	AATCTAGACGACCAGTCGCTGTAGGTA
ganAG	GCGGATCCTGACCTCAGGCAGTACCAAAG
ganAD	CGTCTAGACGGATTCAAAGGCGTAAATCG
ganB1	AAGGATCCGCCTGCCTATCGAAATAGAG
ganB2	AATCTAGACCCAAGAGAAAACGCCCATG
ganBG	GCGGATCCTATGCTCTCTGCCTATTCAG
ganBD	CGTCTAGATCAGATCAGACGGCGGCGAATC

Tableau 19 : Amorces utilisées pour l'étude du système Gan

Amorce	Séquence
delrcs1	AAGGTACCTTGCCGGAAGCGAGCCGCGGCTCGCGGT
delrcs2	AACCCGGGTCAAAGGCATACCGTAAAGGTTGTCAGCAA
delrcs3	AACCCGGGCGCAGGCATGAAATCAGGCTCCTGATGAAC
delrcs4	AAAAGCTTTACCCCGTAATAACCTGCTTACCCACCCGC
RcsC1	GCTGAACCGGTGGAAGACGATGAGCTCGACAGCGTG
RcsC4	CTGAAAGGTGTCTTTGCCATGCTGAATCTTCATCCC
YojN1	CTGTGACAAAGCCTTCGATCTG
YojN8	GTTCATCAGGAGCCTGATTTC
flhD1	CACTGCGGGGTAAAGGATCCGTGAAATATTATG
flhD2	GCATCGAGCTCGATGCGTCTGAGGTGCCGGCTCTTCA
ftsA1	GATCGAGGATCCGCCCTGGATTAAACAGGCCAGCG
ftsA2	CGGCATGAGCTCATTGCCGATGCGCTCAGCCGGC
cpsB1	TTAACTGAATTTTAAAAGTCATATCGCA
cpsB2	CCTGCAGCATGGAATTCTGACCGTGG
RcsF1 sma	AACCCGGGATCCTGCTGGTGGTTCTGGTTTATCTCATT
RcsF2 Xba	AATCTAGACTGCGCCAGCACCTGGCTGATGAAACGCCG
rcsFTAT1	CAGGGAGCTCCCTGCTGCACAAACCTGCTGC
rcsFTAT2	GCAGAATTCGCTCATTGCGCGGAACTTTCAGTGCG
rcsF-xho-C75SF	GGCTCCTCGAGTCAGTCCAGCGCGCAAG
rcsF-xho-C75SR	GACTGACTCGAGGAGCCAGACACTTCAC
RcsF-C110S-F	TGCCGTACTGCTGCATGACAGCCAGATC
RcsF-C110S-R2	GACGATCTGGCTGTCATGCAGC
RcsF-BamC119S-R	GACGGTAGGATCCTGCGACATTACTG
RcsF-BamC119S-F	TCGCAGGATCCTACCGTCAGGCCGTC
RcsF-C125S-R	ATTGCGAATTCATTTCAGTGCGGAACCCTGGCTGACGG
pYZ4-R	GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTC
PYZ4FOR	CTTAGGAGGGTTTTTACCATG
RcsF-R65-R	CTTCACGAATTCAGCGGAACGGCTTGCCTAC
RcsF-P49-F	CACGCAGAGCTCTCCTGCCGTGCTGTATAAAAGTG
RcsF-D66-F	CAAGCCGAGCTCCGATATGGGTGAAGTGTC
RcsF-D109-R	CTGACGAATTCTCAGTCATGCAGCAGTACG
RcsF-A117-R	GACGGTGAATTCATGCGACATTACTGACGATC
RcsF-Q126-R	CAGTGCGGAATTCTAGCAGACGGCCTGACGG
RcsF-Xba-R	CGGTAGCATTCTAGAACATTACTGACG
RcsF-Xba-F	CCGTCAGGCCGTTCTAGAGGGTTCCGCACTG
RcsF-S55-F	GTATAAGAGCTCTGAAGAACTGGTAGG
RcsF-A129-R	CGCGGAGAATTCCTATGCGGAACCCTGGCAG
RcsF-K131-R	CATTGCGAATTCTATTTCAGTGCGGAACCCTG
RcsF-G127-R	GGAAACTTTGAATTCCTAACCCCTGGCAGAC
djlA1-Ech	GTCATCCCGGGAAACGGTCAGAGACTATATCA
djlA2-Ech	GCGTTGAGCTCGCCGATGCATTTTCGCTGCGA
igaA1-Ech	TGCTCCCGGGCAATTATTAATAATTCATCAGA
igaA2-Ech	CCGGTGAGCTCATCCGGGAGTGAGTACTGAG
jep132	CTAGGCGGCCAGATCTGATCAA
omegaC2	TCAAAAGGTCATCCACCGGATC

Tableau 20: Amorges utilisées pour l'étude du système Rcs.

4. Séquençage

Le séquençage des plasmides et des produits de PCR a été réalisé par la société GenoScreen.

D. Clonage moléculaire : Etude du système Gan

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, Lyon) qui a notamment participé aux constructions génétiques.

Les différents plasmides sont récapitulés dans le tableau 19. Les amorces permettant le clonage des gènes sont listées dans le tableau 19. Des sites de restriction ont été ajoutés dans les amorces (sites soulignés) pour faciliter le clonage dans les vecteurs. La cassette chloramphénicol est obtenue à partir du plasmide pNFCml digéré par EcoRV et la cassette *uidA*-Kan est issue de la digestion de pUIDK11 par EcoRV. L'orientation de la cassette *uidA*-Kan a été déterminée par restriction.

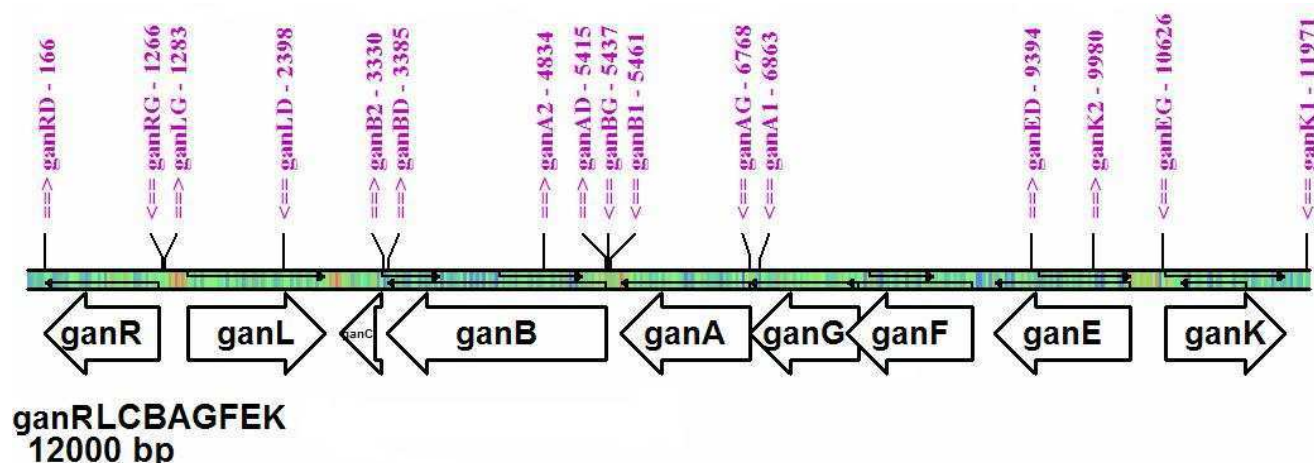


Figure 60 : Représentation du locus *gan* d'*E. chrysanthemi*.

1. Construction des mutants *ganA*

* La PCR *ganA1-ganA2* contenant le gène *ganA* a été cloné dans pBluescript (pNFW130), l'inactivation de *ganA* a été réalisée par insertion de la cassette chloramphénicol Cml au niveau du site *AfeI* (pNFW140).

* La PCR *ganAG-ganAD* contenant le gène *ganA* a été cloné dans pGEM-T (pI2872), la fusion a été réalisée par insertion de la cassette *uidA*-Kan au niveau du site *EcoRV* (pI2873).

2. Construction des mutants *ganB*

* La PCR *ganB1-ganB2* contenant le gène *ganB* a été cloné dans pBluescript (pNFW142), l'inactivation de *ganB* a été réalisée par insertion de la cassette chloramphénicol Cml au niveau des sites NruI (pNFW145). Cette cassette est bornée par des sites de recombinaison (site FRT) de la FLP recombinaise qui va permettre l'excision de la cassette. La FLP recombinaise est exprimée à partir du plasmide pCP20. Elle reconnaît un site FRT, permet l'excision de la cassette et laisse en place le site FRT. L'excision de la cassette Cml se fait chez *E. coli* et laisse un site comportant un codon stop dans les 6 phases de lecture (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Cela a été utilisé pour obtenir la mutant *ganB* Cml^S. En effet, le gène *ganB::Cml* est ensuite sous cloné dans un plasmide pOK (pNFW154) qui permettra la conjugaison du plasmide de la cellule donatrice *E. coli* S17-1λpir à la réceptrice *E. chrysanthemi*. L'excision de la cassette chloramphénicol (pNFW162) a été obtenue pour construire le mutant *ganB* Cml^S.

* La PCR *ganBG-ganBD* contenant le gène *ganB* a été cloné dans pGEM-T (pI2874), la fusion a été réalisée par insertion de la cassette *uidA-Kan* au niveau du site HpaI (pI2876).

3. Construction du mutant *ganL*

La PCR *ganLG-ganLD* contenant le gène *ganL* a été cloné dans pGEM-T (pI2868), la fusion a été réalisée par insertion de la cassette *uidA-Kan* au niveau du site BamHI (pI2869).

4. Construction du mutant *ganE*

La PCR *ganEG-ganED* contenant le gène *ganE* a été cloné dans pGEM-T (pI2866), la fusion a été réalisée par insertion de la cassette *uidA-Kan* au niveau du site BglI (pI2867).

5. Construction du mutant *ganK*

La PCR *ganK1-ganK2* contenant le gène *ganK* a été cloné dans pBluescript II SK (+)(pNFW158), la fusion a été réalisée par insertion de la cassette *uidA-Kan* au niveau du site ZraI (pNFW163).

6. Construction des mutants *ganR*

La PCR *ganRG-ganRD* contenant le gène *ganR* a été cloné dans pGEM-T (pI2870), l'inactivation de *ganR* a été réalisée par insertion de la cassette chloramphénicol Cml au niveau du site PstI (pI3136) et de la cassette *uidA-Kan* au niveau du même site.

7. La mutation *crp*

La mutation *crp* ::Cml a été transduite par l'intermédiaire du lysat de la souche A2507.

E. Clonage moléculaire : Etude du système Rcs

Les différents plasmides sont récapitulés dans le tableau 18. Les amorces permettant le clonage des gènes sont listées dans le tableau 19.

1. Clonage du locus *rscCBD*

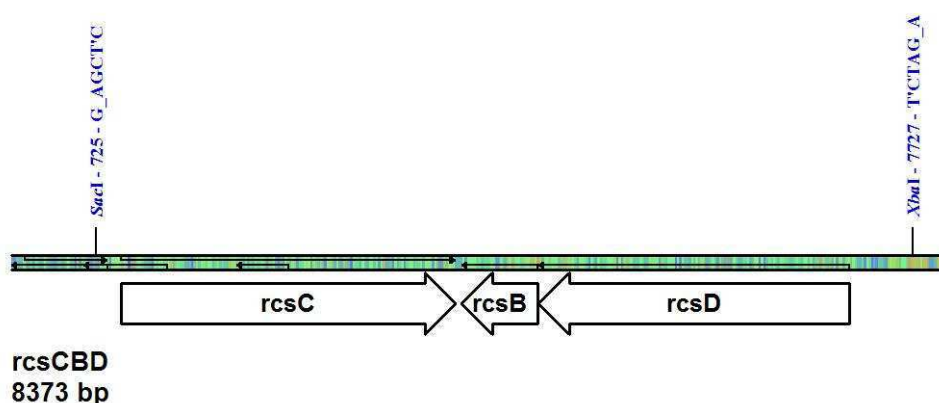


Figure 61 : Représentation du locus *rscCBD* d'*E. chrysanthemi*.

Afin de cloner le locus *rscCBD* en entier, j'ai effectué une digestion d'ADN génomique de la souche EC3937. J'ai digéré 5µg d'ADN par l'enzyme *SacI* puis l'enzyme *XbaI*. Après séparation en gel d'Agarose des fragments de l'ADNg digéré et j'ai récupéré l'ADN présent de 6 à 8kb (le fragment *rscCDB* est de 7kb). J'ai ensuite cloné les fragments *SacI*-*XbaI* dans pUC18Not digéré par *SacI*-*XbaI*. J'ai sélectionné sur LB+Amp+Xgal. J'ai obtenu plusieurs clones blancs dont certains présentaient un phénotype muqueux. J'ai donc analysé ceux-ci par séquençage: un de clones contenait un fragment d'ADN comportant le gène *rscF*, et deux autres clones comportait le locus *rscCBD* en entier. J'ai vérifié par digestion enzymatique et séquencé les bornes de l'insert pour confirmer la présence du locus *rscCBD* en entier.

2. Constructions des mutants (*rscC*, *rscD*, Δ *rscCBD*, *rscB*, *rscF*)

a) Construction des mutants *rscC* et *rscD*

Ces mutants ont été réalisés par Franck Bouchart.

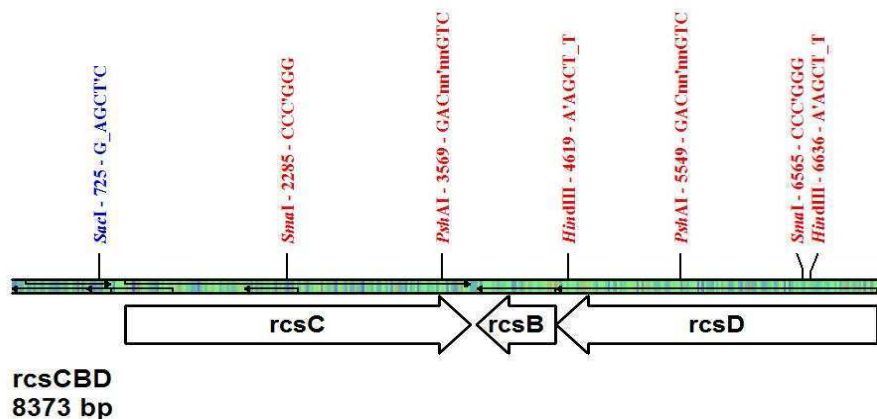


Figure 62 : Représentation du locus *rscCBD* d'*E. chrysanthemi* avec les amorces et les sites de restriction utilisés pour la construction des mutants *rscC* et *rscD*.

Afin de construire le mutant *rscC*, Franck Bouchart a cloné le fragment de PCR RcsC1-RcsC4 (SacI-HindIII) dans pUC18 digéré par les mêmes enzymes (pNFW137). Il a ensuite délété le fragment SmaI-PshAI et inséré une cassette chloramphénicol (issue de la digestion EcoRV de pNFCml) dans ce plasmide délété (pNFW149). Enfin, il a sous-cloné le fragment Sall-HpaI dans le plasmide pOK digéré par Sall-SmaI (pNFW161). Le plasmide a été introduit chez *E. chrysanthemi* par conjugaison.

Afin de construire le mutant *rscD*, Franck Bouchart a cloné le fragment de PCR YojN1-YojN8 (HindIII) dans pUC18 digéré par HindIII (pNFW134). Il a ensuite inséré une cassette chloramphénicol (issue de la digestion EcoRV de pNFCml) dans le plasmide digéré par PshAI (pNFW135). Enfin, il a sous-cloné le fragment SmaI dans le plasmide pOK digéré par SmaI (pNFW155). Le plasmide a été introduit chez *E. chrysanthemi* par conjugaison.

b) D  letion du locus *rscCBD* : $\Delta rscCBD$

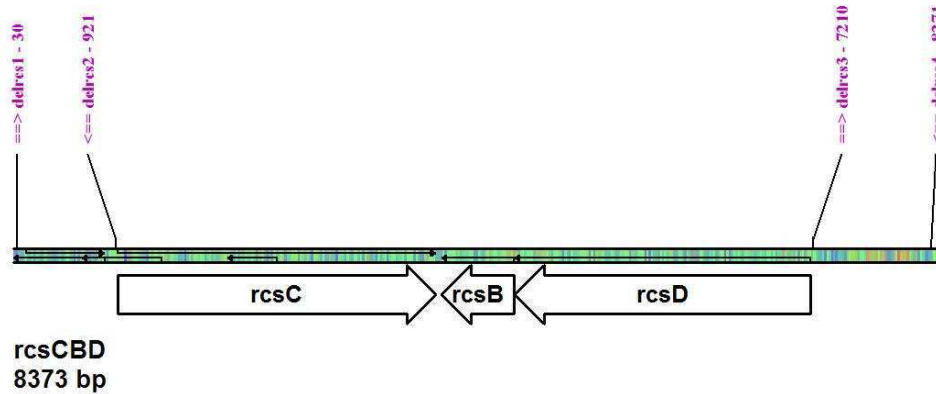


Figure 63 : Représentation du locus *rscCBD* d'*E. chrysanthemi* avec les amorces pour la déletion du locus.

Afin de d  l  ter le locus *rscCBD*, j'ai cloné dans pUC18Not (KpnI-HindIII), les fragments de PCR delres1-2 (KpnI-SmaI) et delres3-4 (SmaI-HindIII) (=pNFW170= pUC18, '*gyrA* $\Delta(rscCB\ rscD)\ menF$ '). Une cassette chloramphénicol (Cml) a été introduite au niveau du site SmaI de pNFW170. Ce plasmide (pNFW173) a été électroporé dans EC3937.

c) Construction du mutant *rscB*

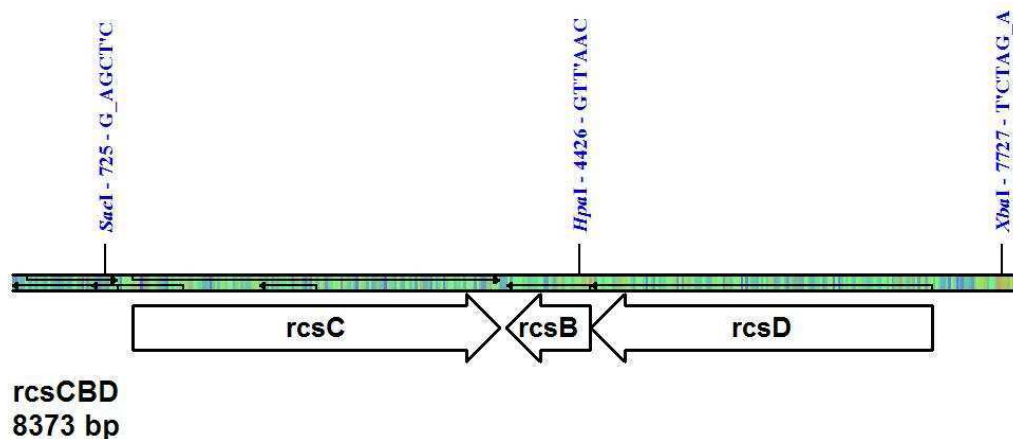


Figure 64 : Représentation du locus *rscCBD* d'*E. chrysanthemi* et du site de restriction HpaI permettant l'insertion de la cassette pour la construction du mutant *rscB*.

Afin de construire le mutant *rscB*, j'ai inséré une cassette chloramphénicol au niveau du site HpaI de pNFW257 (pUC18Not *rscCBD*). J'ai ensuite électroporé la construction (pNFW230) dans EC3937.

d) Construction du mutant *rscF*

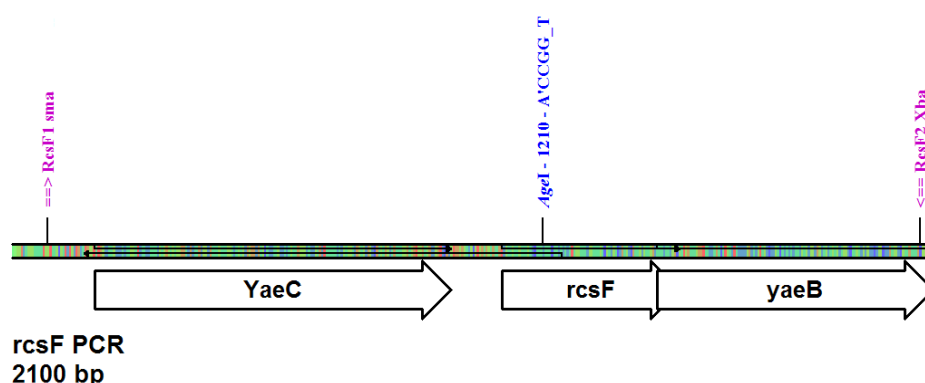


Figure 65 : Représentation du gène *rscF* d'*E. chrysanthemi* et du site de restriction AgeI permettant l'insertion de la cassette pour la construction du mutant *rscF*.

Afin de construire le mutant *rscF*, j'ai cloné le fragment de PCR *rscF1-rscF2* (BamHI-PvuII) dans pBSK digéré par BamHI et EcoRV (pNFW183). J'ai ensuite inséré une cassette chloramphénicol au niveau du site AgeI de pNFW183. Enfin, j'ai électroporé la construction dans EC3937.

3. Construction des fusions transcriptionnelles

Pour la construction des fusions *uidA*, la cassette *uidA*-Kan provenant du plasmide pUIDK11 a été utilisée (Bardonnnet & Blanco, 1992). Pour chaque construction, l'étape de l'insertion de la cassette a été effectuée dans la souche BW25141 afin de cribler des souches ayant une activité glucuronidase (BW25141 en étant dépourvue).

a) Construction de la fusion *ftsA-uidA*

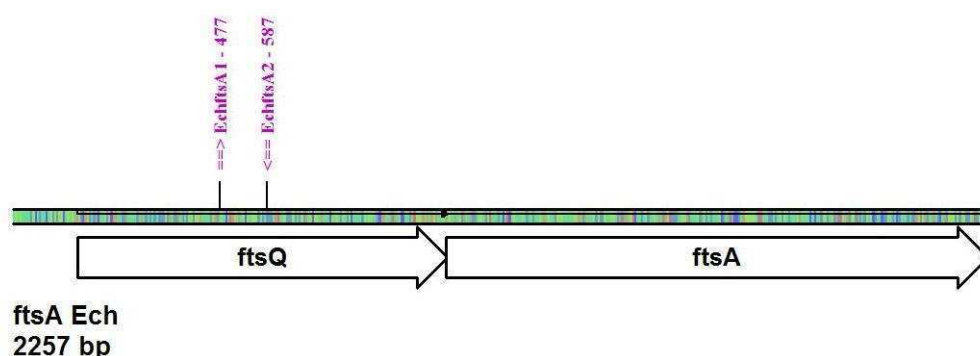


Figure 66 : Représentation de l'opéron *ftsQA* d'*E. chrysanthemi* et les amorces permettant la construction de la fusion *ftsA-uidA*.

Afin de construire la fusion *ftsA-uidA*, j'ai cloné le fragment de PCR *ftsA1-ftsA2* (BamHI et SacI) dans pUC18Not digéré par BamHI et SacI (pNFW182). J'ai ensuite inséré une cassette

uidA-Kan (issue de la digestion par SmaI du plasmide pUIDK11) au niveau du site NgoMIV rendu bout franc de pNFW182 (pNFW193). La cassette Kan a été enlevée par digestion NcoI+HpaI, le plasmide a été rendu bout franc et refermé (pNFW201). Le fragment NotI comprenant la fusion *ftsA-uidA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Kan (pNFW220). Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

b) Construction de la fusion *flhD-uidA*

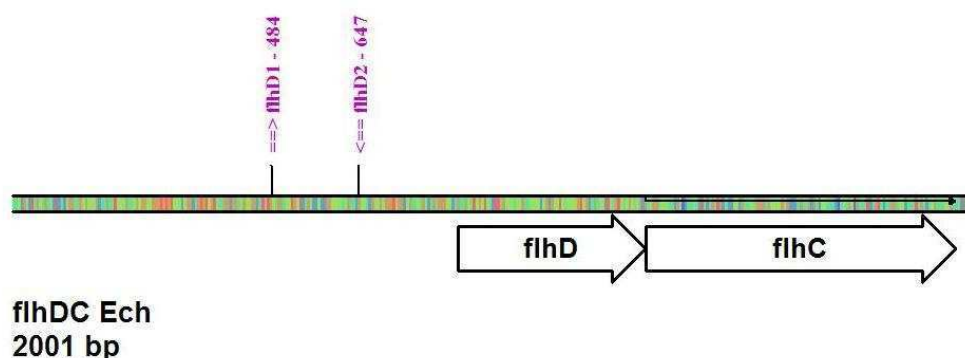


Figure 67 : Représentation de l'opéron *flhDC* d'*E. chrysanthemi* et les amorces permettant la construction de la fusion *flhD-uidA*.

Afin de construire la fusion *flhD-uidA*, j'ai cloné le fragment de PCR flhD1-flhD2 (BamHI et SacI) dans pUC18Not digéré par BamHI et SacI (pNFW181). J'ai ensuite inséré une cassette *uidA*-Kan (issue de la digestion par SacI du plasmide pUIDK11) au niveau du site SacI de pNFW181 (pNFW203). La cassette Kan a été enlevée par digestion NcoI+HpaI, le plasmide a été rendu bout franc et refermé (pNFW204). Le fragment NotI comprenant la fusion *flhD-uidA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Kan (pNFW215). Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

c) Construction de la fusion *cpsB-uidA*

Afin de construire la fusion *cpsB-uidA*, j'ai cloné le fragment de PCR cpsB1-cpsB2 (DraI et EcoRI) dans pUC18Not digéré par SmaI et EcoRI (pNFW205). J'ai ensuite inséré une cassette *uidA*-Kan (issue de la digestion par EcoRI du plasmide pUIDK11) au niveau du site EcoRI de pNFW205 (pNFW206). La cassette Kan a été enlevée par digestion NcoI+HpaI, le plasmide a été rendu bout franc et refermé (pNFW207). Le fragment NotI comprenant la fusion *flhD-uidA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Kan (pNFW262). Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

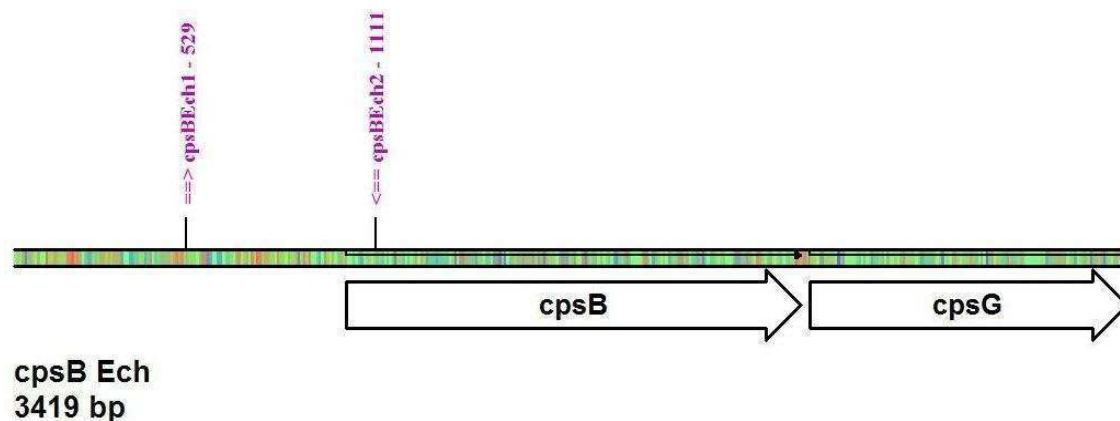


Figure 68 : Représentation de l'opéron *cpsBG* d'*E. chrysanthemi* et les amorces permettant la construction de la fusion *cpsB-uidA*.

4. Clonage de *TAT-rcsF*, *djlA*, *igaA*

a) Clonage de *TAT-rcsF*

Le fragment de PCR *rcsFTAT1-rcsFTAT2* digéré par *EcoRI* *SacI* a été cloné dans *pXfd11* digéré par les mêmes enzymes. La souche contenant ce plasmide (*pNFW176*) présente un phénotype muqueux. Cette construction a été réalisée par Carmen Ödberg-Ferragut . La construction permet de remplacer le gène *blaM* du plasmide *pXfd11* par le gène *rcsF* (dépourvu de la partie permettant l'ancrage de la lipoprotéine).

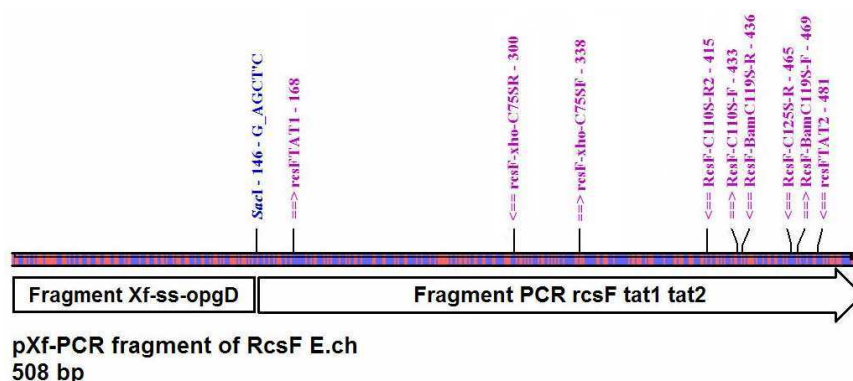


Figure 69 : Représentation de la construction *TAT-rcsF* d'*E. chrysanthemi*, les amorces permettant la construction du plasmide (*pNFW176*) les amorces permettant la construction des mutations : C75S, C110S, C119S et C125S.

J'ai sous-cloné le fragment *EcoRI*-*MLuI* de ce plasmide *pNFW176* dans *pUC18Not* digéré par *SmaI* (*pNFW177*). Le fragment *NotI* (comprenant *TAT-rcsF*) a été sous-cloné dans le *pUTminiTn5Tet* digéré par *NotI* (*pNFW271*). Toutes ces souches présentent également un phénotype muqueux.

Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

b) Clonage de *djlA*

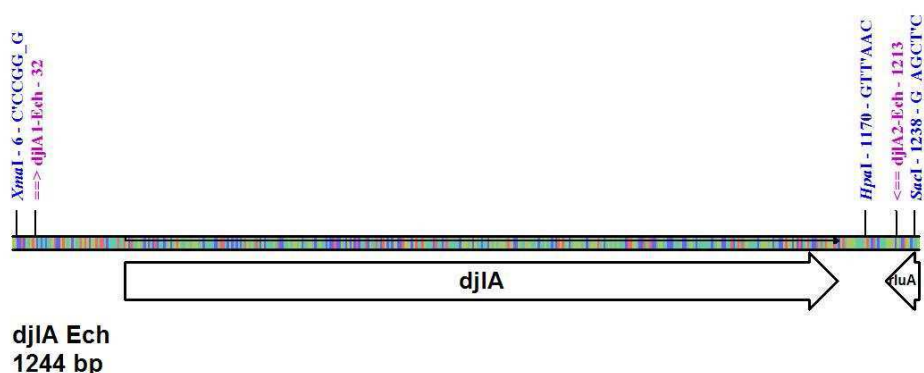


Figure 70 : Représentation du gène *djlA* d'*E. chrysanthemi* et les amorces permettant le clonage du gène.

J'ai cloné le fragment de PCR *djlA1-djlA2* (*Xma*I et *Sac*I) dans pUC18Not digéré par les mêmes enzymes (pNFW258). Cette souche présente un phénotype muqueux chez *E. coli*.

Le fragment *Pvu*II comprenant le gène *djlA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Sp digéré par *Not*I et rendu bout franc (pNFW289). Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

c) Clonage de *igaA*

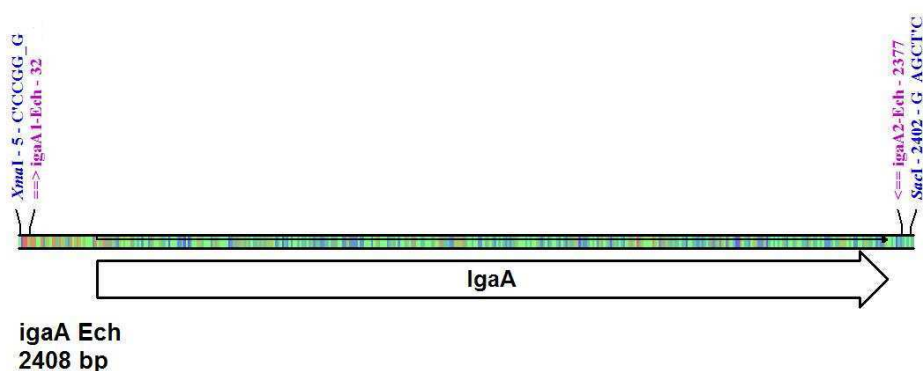


Figure 71 : Représentation du gène *igaA* d'*E. chrysanthemi* et les amorces permettant le clonage du gène.

J'ai cloné le fragment de PCR *igaA1-igaA2* (*Xma*I et *Sac*I) dans pUC18Not digéré par les mêmes enzymes (pNFW259).

Le fragment *Not*I comprenant le gène *igaA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Tet digéré par *Not*I (pNFW265). Le miniTn5 est introduit dans les souches d'*E. chrysanthemi* par conjugaison.

5. Les mutations dans *TAT-rcsF*

Carmen Ödberg-Ferragut a réalisé par mutagenèse dirigée l'ensemble des délétions du domaine périplasmique de RcsF du côté N-terminal et du côté C-terminal. J'ai quant à moi participé à la réalisation des mutations des cystéines par l'utilisation d'amorces de PCR « mutées » (figure 69).

a) Mutant *TAT-rcsF C75S*

Nous avons cloné les fragments de PCR1 (RcsFXhoC75SR-rcsfTat1 digéré par SacI et XhoI) et PCR2 (RcsFXhoC75SF -pYZ4-R digéré par XhoI et pvuII) dans pNFW176 digéré par SacI et pvuII (pNFW247).

b) Mutant *TAT-rcsF C110S*

Nous avons cloné les fragments de PCR1 (RcsFC110SR-rcsfTat1 digéré par SacI et RsaI) et PCR2 (RcsFC110SF-pYZ4-R digéré par RsaI et EcoRI) dans pNFW176 digéré par SacI et EcoRI (pNFW246).

c) Mutant *TAT-rcsF C119S*

Nous avons cloné les fragments de PCR1 (RcsFBamC119SR-rcsfTat1 digéré par SacI et BamHI) et PCR2 (RcsFBamC119SF -pYZ4-R digéré par BamHI et pvuII) dans pNFW176 digéré par SacI et pvuII (pNFW247).

d) Mutant *TAT-rcsF C125S*

Nous avons cloné le fragment de PCR (RcsFC125SR-rcsfTat1 digéré par SacI et EcoRI) dans pNFW176 digéré par SacI et EcoRI (pNFW269).

F. Techniques de biochimie

1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad protein assay) avec une solution de sérum-albumine bovine comme référence.

2. Dosage des activités β -galactosidase, β -glucuronidase et β -glucuronidase

Les dosages sont réalisés sur des cultures en phase exponentielle de croissance (environ 7.10^8 bactéries/mL de culture soit une DO de 0,7). Les cellules sont centrifugées (50mL à 7000g, 10min, 4°C) et reprises dans 10 mL de milieu 63. Les cellules sont ensuite cassées à la presse de French à $1,4 \cdot 10^7$ Pascal. Puis l'extrait est centrifugé (7000g, 10min, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les dosages ont été réalisés 3 fois sur des extraits indépendants. Certains dosages sont effectués sur des cultures de 5mL, les cellules étant perméabilisées par l'ajout de à 0,1 mL de SDS à 0,1% et 0,1mL de chloroforme.

* L'activité β -galactosidase est mesurée par hydrolyse de l'ortho-nitrophényl- β -D-galactoside (OPNG, 4mg/mL), dans du tampon Z + β -mercapto-éthanol (2,7 mL/L), à température ambiante, en suivant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm (Miller). La réaction se fait avec 200 μ L de substrat, 200 μ L d'échantillon et 600 μ L de tampon Z + β -mercapto-éthanol (2,7mL/L).

* L'activité β -glucuronidase est mesurée dans du milieu minimum 63+ β -mercapto-éthanol (2,7mL/l), à température ambiante, par hydrolyse du 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (PNPU, 4mg/mL). La réaction se fait avec 100 μ L de substrat, 200 μ L d'échantillon et 700 μ L de milieu minimum 63 + β -mercapto-éthanol (2,7 mL/L) (Bardonnnet & Blanco, 1992).

* L'activité β -galactanase est mesurée par hydrolyse de l'AZO-galactan[®] (MEGAZYME). La réaction se fait avec 200 μ L de substrat à 5g/L et 200 μ L d'échantillon. Elle s'effectue dans du milieu 63+ β -mercapto-éthanol (2,7mL/L), à 50°C pendant 15 min. Une fois la réaction terminée, les polymères de haut poids moléculaire sont précipités par l'addition de 1mL d'éthanol à 95% et agités au vortex pendant 10s. Après 10min d'incubation à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 1000g pendant 10min et l'absorbance du surnageant est mesurée à 590nm.

3. Test phénotypiques : pectinase, cellulase, protéase et galactanase

* Le test galactanase se réalise sur boîte de milieu minimum 63 solide contenant une source de carbone. L'AZCL-galactan[®] (MEGAZYME) est déposé en surcouche (3 mL de F-top contenant 2g/L d'AZCL-galactan[®]). C'est un substrat insoluble composé d'oligogalactanes sur lesquels est greffé un groupement chromogène bleu. Une coupure endoglycolytique,

spécifique à l'activité endo-1,4- β -galactanase, libère un oligogalactane soluble provoquant un halo bleu autour de la colonie dû à la libération du chromogène.

* Le test pectinase se réalise sur boîte de milieu minimum 63 solide contenant du polygalacturonate PGA (4g/L) et du glycérol (2g/L) comme deuxième source de carbone si nécessaire. Après 24 h de croissance à 30°C, le milieu est recouvert par une solution aqueuse d'acétate de cuivre (100g/L) qui forme un complexe avec le PGA. Un halo translucide sur fond bleu correspondant à la zone de dégradation du PGA apparaît alors autour des colonies sécrétant des pectinases.

* Le test cellulase (Teather et Wood, 1982) se réalise sur boîte de milieu minimum 63 solide contenant de la carboxyméthylcellulose (0,2%), du glycérol (0,2%) et du MgSO₄ (7mM). Après 24 h de croissance à 30°C, le milieu est recouvert pendant 15 min par une solution aqueuse de rouge congo (1g/L) qui se fixe à la carboxyméthylcellulose. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages par du NaCl 1M durant 5 à 10 min. Les souches sécrétant des cellulases sont entourées d'un halo translucide jaune sur fond rouge, dû à l'hydrolyse de la cellulose du milieu.

* Le test protéase se réalise sur boîte de milieu LB solide contenant 1% de lait écrémé en poudre. Après 24 h d'incubation à 30°C, les souches sécrétrices de protéase sont détectables par la présence d'un halo transparent sur fond trouble autour des colonies, dû à l'hydrolyse des protéines du lait.

G. Test de virulence

Les bactéries sont cultivées une nuit en milieu LB ou 63 additionné de glycérol comme source de carbone, centrifugées puis ressuspendues dans du milieu 63. Les tubercules de pomme de terre sont lavés, stérilisés en surface par du NaOCl 0,5%, rincés à l'eau stérile puis séchés par ventilation. L'inoculation est réalisée avec 10⁶ et 10⁷ bactéries dans un volume de 5 μ L dans un trou creusé à l'aide d'un cône de micropipette stérile. Les tubercules sont incubés à 30°C pendant 48 à 72h en atmosphère humide. Les feuilles d'endives sont lavées à l'eau stérile puis scarifiées au scalpel. L'inoculation est réalisée au niveau de l'incision avec 10⁷ bactéries dans un volume de 5 μ L, les feuilles sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

Références

. Références

- Aizawa, S. I. and Kubori, T.** 1998. Bacterial flagellation and cell division., *Genes Cells* (3:10), pp. 625-634.
- Altabe, S. G., de Iannino, N. I., de Mendoza, D. and Ugalde, R. A.** 1994. New osmoregulated beta(1-3),beta(1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*., *J Bacteriol* (176:16), pp. 4890-4898.
- Andresen, L., Kõiv, V., Alamäe, T. and Mäe, A.** 2007. The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*., *FEMS Microbiol Lett* (273:2), pp. 229-238.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. and Gorvel, J.** 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival., *Nat Immunol* (6:6), pp. 618-625.
- Babujee, L., Venkatesh, B., Yamazaki, A. and Tsuyumu, S.** 2007. Proteomic analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) strain 3937., *J Proteome Res* (6:1), pp. 62-69.
- Banta, L. M., Bohne, J., Lovejoy, S. D. and Dostal, K.** 1998. Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation., *J Bacteriol* (180:24), pp. 6597-6606.
- Bardonnnet, N. and Blanco, C.** 1992. 'uidA'-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions., *FEMS Microbiol Lett* (72:3), pp. 243-247.
- Beier, D. and Gross, R.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems., *Curr Opin Microbiol* (9:2), pp. 143-152.
- Bereswill, S. and Geider, K.** 1997. Characterization of the *rcsB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen., *J Bacteriol* (179:4), pp. 1354-1361.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA., *Nucleic Acids Res* (7:6), pp. 1513-1523.
- Blot, N., Berrier, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Ghazi, A. and Condemine, G.** 2002. The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family., *J Biol Chem* (277:10), pp. 7936-7944.
- Boccara, M., Aymeric, J. L. and Camus, C.** 1994. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*., *J Bacteriol* (176:5), pp. 1524-1526.

- Bohin, A., Bouchart, F., Richet, C., Kol, O., Leroy, Y., Timmerman, P., Huet, G., Bohin, J. and Zanetta, J.** 2005. GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives., *Anal Biochem* (340:2), pp. 231-244.
- Bohin, J. P.** 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria., *FEMS Microbiol Lett* (186:1), pp. 11-19.
- Bohin JP and Lacroix JM.** 2007. Osmoregulation in the periplasm. In *The Periplasm*, pp 325-341. Edited by M. Ehrmann. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Boom, T. V. and Cronan, J. E.** 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism., *Annu Rev Microbiol* (43), pp. 317-343.
- Bouchart, F., Delangle, A., Lemoine, J., Bohin, J. and Lacroix, J.** 2007. Proteomic analysis of a non-virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism., *Microbiology* (153:Pt 3), pp. 760-767.
- Bouchart F.** 2006. Impact des mutations *opg* chez *Erwinia chrysanthemi* : recherche de supresseurs et analyse protéomique des mutants. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Bourson, C., Favey, S., Reverchon, S. and Robert-Baudouy, J.** 1993. Regulation of the expression of a *pelA::uidA* fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of the synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis., *J Gen Microbiol* (139:1), pp. 1-9.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal Biochem* (72), pp. 248-254.
- Braithwaite, K. L., Barna, T., Spurway, T. D., Charnock, S. J., Black, G. W., Hughes, N., Lakey, J. H., Virden, R., Hazlewood, G. P., Henrissat, B. and Gilbert, H. J.** 1997. Evidence that galactanase A from *Pseudomonas fluorescens subspecies cellulosa* is a retaining family 53 glycosyl hydrolase in which E161 and E270 are the catalytic residues., *Biochemistry* (36:49), pp. 15489-15500.
- Breedveld, M. W. and Miller, K. J.** 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae., *Microbiol Rev* (58:2), pp. 145-161.
- Briones, G., de Iannino, N. I., Steinberg, M. and Ugalde, R. A.** 1997. Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella spp.* is not osmoregulated., *Microbiology* (143 (Pt 4)), pp. 1115-1124.
- Burse, A., Weingart, H. and Ullrich, M. S.** 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* ., *Mol Plant Microbe Interact* (17:1), pp. 43-54.

Cai, S. and Inouye, M. 2003. Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* histidine kinase (EnvZ)., *J Mol Biol* (329:3), pp. 495-503.

Cano, D. A., Domínguez-Bernal, G., Tierrez, A., Portillo, F. G. and Casadesús, J. 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*., *Genetics* (162:4), pp. 1513-1523.

Carballès, F., Bertrand, C., Bouché, J. P. and Cam, K. 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system rcsC-rcsB., *Mol Microbiol* (34:3), pp. 442-450.

Castanié-Cornet, M., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C. and Cam, K. 2007. The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF., *Microbiology* (153:Pt 1), pp. 238-246.

Cherepanov, P. P. and Wackernagel, W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant., *Gene* (158:1), pp. 9-14.

Chevance, F. F. V. and Hughes, K. T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine., *Nat Rev Microbiol* (6:6), pp. 455-465.

Choma, A. and Komaniecka, I. 2003. Characterisation of *Mesorhizobium huakuii* cyclic beta-glucan., *Acta Biochim Pol* (50:4), pp. 1273-1281.

Clarke, D. J., Holland, I. B. and Jacq, A. 1997. Point mutations in the transmembrane domain of DjlA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Rcs signal transduction pathway., *Mol Microbiol* (25:5), pp. 933-944.

Clavel, T., Lazzaroni, J. C., Vianney, A. and Portalier, R. 1996. Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis., *Mol Microbiol* (19:1), pp. 19-25.

Cogez, V., Gak, E., Puskas, A., Kaplan, S. and Bohin, J. 2002. The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans., *Eur J Biochem* (269:10), pp. 2473-2484.

Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J. and Bohin, J. P. 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*., *J Bacteriol* (183:10), pp. 3127-3133.

Collmer, A. and Bateman, D. F. 1981. Impaired induction and self-catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutants deficient in oligogalacturonide lyase., *Proc Natl Acad Sci U S A* (78:6), pp. 3920-3924.

Collmer A and Keen NT. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 24:383-409.

Condemine, G., & Robert-Baudouy, J. 1995. Synthesis and secretion of *Erwinia chrysanthemi* virulence factors are coregulated. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **8**: 632-636.

Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F. and Enard, C. 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*., *Mol Plant Microbe Interact* (12:1), pp. 45-52.

Cui, Y., Chatterjee, A., Yang, H. and Chatterjee, A. K. 2008. Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA* (*lrhA*) expression., *J Bacteriol* (190:13), pp. 4610-4623.

Dartigalongue, C., Missiakas, D. and Raina, S. 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon., *J Biol Chem* (276:24), pp. 20866-20875.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products., *Proc Natl Acad Sci U S A* (97:12), pp. 6640-6645.

Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C. and Cam, K. 2001. Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system rcsB-rscC in *Escherichia coli*., *J Bacteriol* (183:20), pp. 5870-5876.

Davis, R. W., D. Botstein, and J. R. Roth. 1980. A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Debarbieux, L., Bohin, A. and Bohin, J. P. 1997. Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*., *J Bacteriol* (179:21), pp. 6692-6698.

Delangle, A., Prouvost, A., Cogez, V., Bohin, J., Lacroix, J. and Cotte-Pattat, N. H. 2007. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* Gan locus, involved in galactan catabolism., *J Bacteriol* (189:19), pp. 7053-7061.

Delangle A. 2007. Contribution à l'analyse du pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.

Delepelaire, P. and Wandersman, C. 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*., *Mol Microbiol* (5:10), pp. 2427-2434.

Ebel, W., Vaughn, G. J., Peters, H. K. and Trempey, J. E. 1997. Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*., *J Bacteriol* (179:21), pp. 6858-6861.

Enard, C., Diolez, A. and Expert, D. 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system., *J Bacteriol* (170:6), pp. 2419-2426.

Eriksson, A. R., Andersson, R. A., Pirhonen, M. and Palva, E. T. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*., *Mol Plant Microbe Interact* (11:8), pp. 743-752.

Fiedler, W. and Roterling, H. 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides., *J Biol Chem* (263:29), pp. 14684-14689.

Filloux, A., Hachani, A. and Bleves, S. 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes., *Microbiology* (154:Pt 6), pp. 1570-1583.

Flego, D., Marits, R., Eriksson, A. R., Kõiv, V., Karlsson, M. B., Heikinheimo, R. and Palva, E. T. 2000. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora subsp. carotovora*., *Mol Plant Microbe Interact* (13:4), pp. 447-455.

Francez-Charlot, A., Laugel, B., Gemert, A. V., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M., Gutierrez, C. and Cam, K. 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*., *Mol Microbiol* (49:3), pp. 823-832.

Fredericks, C. E., Shibata, S., Aizawa, S., Reimann, S. A. and Wolfe, A. J. 2006. Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay., *Mol Microbiol* (61:3), pp. 734-747.

García-Calderón, C. B., García-Quintanilla, M., Casadesús, J. and Ramos-Morales, F. 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica rcsC* mutants with constitutive activation of the Rcs system., *Microbiology* (151:Pt 2), pp. 579-588.

Gelfand MS and Laikova ON. 2003. Prolegomena to the evolution of transcriptional regulation in bacterial genomes. In E. V. Kooning, and M. Y. Galperin (ed.), *Frontiers in computational Genomics*. Wymondham, Caister Academic Press. p195-216.

Gijsegem, F. V., Genin, S. and Boucher, C. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria., *Trends Microbiol* (1:5), pp. 175-180.

van Golde, L. M. 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*., *Proc Natl Acad Sci U S A* (70:5), pp. 1368-1372.

Gottesman, S., Trisler, P. and Torres-Cabassa, A. 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes., *J Bacteriol* (162:3), pp. 1111-1119.

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter., *J Bacteriol* (177:14), pp. 4121-4130.

Hall, M. N. and Silhavy, T. J. 1981. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12., *J Mol Biol* (146:1), pp. 23-43.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids., *J Mol Biol* (166:4), pp. 557-580.

Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Gijsegem, F. V. and Barras, F. 1999. The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*., *Proc Natl Acad Sci U S A* (96:3), pp. 887-892.

Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae., *Syst Appl Microbiol* (21:3), pp. 384-397.

Hayden, J. D. and Ades, S. E. 2008. The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*., *PLoS ONE* (3:2), pp. e1573.

Hinchliffe, S. J., Howard, S. L., Huang, Y. H., Clarke, D. J. and Wren, B. W. 2008. The importance of the Rcs phosphorelay in the survival and pathogenesis of the enteropathogenic yersiniae., *Microbiology* (154:Pt 4), pp. 1117-1131.

Hinz, S. W. A., Pastink, M. I., van den Broek, L. A. M., Vincken, J. and Voragen, A. G. J. 2005. *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans., *Appl Environ Microbiol* (71:9), pp. 5501-5510.

Hobot, J. A., Carlemalm, E., Villiger, W. and Kellenberger, E. 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods., *J Bacteriol* (160:1), pp. 143-152.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*., *Annu Rev Microbiol* (50), pp. 213-257.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H. and Robert-Baudouy, J. 1992. Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937., *J Bacteriol* (174:23), pp. 7807-7818.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Reverchon, S. 2001. Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937., *Mol Microbiol* (41:5), pp. 1125-1132.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Robert-Baudouy, J. 1985. Lactose metabolism in *Erwinia chrysanthemi*., *J Bacteriol* (162:1), pp. 248-255.

Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction., *Mol Microbiol* (29:6), pp. 1379-1390.

Hwang J, Pyun YR and Kokini JL. 1993. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocolloids* 7: 39-53.

Hyttiäinen, H., Sjöblom, S., Palomäki, T., Tuikkala, A. and Palva, E. T. 2003. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora ssp. carotovora*., *Mol Microbiol* (50:3), pp. 795-807.

Igoshin, O. A., Alves, R. and Savageau, M. A. 2008. Hysteretic and graded responses in bacterial two-component signal transduction., *Mol Microbiol* (68:5), pp. 1196-1215.

Kadner, R. J. 1996. Cytoplasmic Membrane in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp: 58-87.

Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J. C. A. and Beckwith, J. 2004. Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding., *Science* (303:5657), pp. 534-537.

Kastowsky, M., Gutberlet, T. and Bradaczek, H. 1992. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide., *J Bacteriol* (174:14), pp. 4798-4806.

Kennedy, E. P. 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*., *Proc Natl Acad Sci U S A* (79:4), pp. 1092-1095.

Kennedy, E. P. 1996. Membrane derivated oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*, p. 1064-1074. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D. C.

Komaniecka, I. and Choma, A. 2003. Isolation and characterization of periplasmic cyclic beta-glucans of *Azorhizobium caulinodans*., *FEMS Microbiol Lett* (227:2), pp. 263-269.

Lacroix, J. M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A. and Bohin, J. P. 1999. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans., *J Bacteriol* (181:12), pp. 3626-3631.

Lacroix, J. M., Loubens, I., Tempête, M., Menichi, B. and Bohin, J. P. 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control., *Mol Microbiol* (5:7), pp. 1745-1753.

Lazan, H., Ng, S., Goh, L. and Ali, Z. M. 2004. Papaya beta-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening., *Plant Physiol Biochem* (42:11), pp. 847-853.

Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W. and Gijsegem, F. V. 2008. The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection., *Environ Microbiol* (10:3), pp. 545-559.

Lehtimäki, S., Rantakari, A., Routtu, J., Tuikkala, A., Li, J., Virtaharju, O., Palva, E. T., Romantschuk, M. and Saarilahti, H. T. 2003. Characterization of the *hrp* pathogenicity cluster of *Erwinia carotovora subsp. carotovora*: high basal level expression in a mutant is associated with reduced virulence., *Mol Genet Genomics* (270:3), pp. 263-272.

Lequette, Y., Lanfroy, E., Cogez, V., Bohin, J. and Lacroix, J. 2008. Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in *Escherichia coli*: the membrane-bound and the soluble periplasmic phosphoglycerol transferases are encoded by the same gene., *Microbiology* (154:Pt 2), pp. 476-483.

Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J. and Lacroix, J. 2004. Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures., *J Bacteriol* (186:12), pp. 3695-3702.

Lequette, Y., Rollet, E., Delangle, A., Greenberg, E. P. and Bohin, J. 2007. Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*., *Microbiology* (153:Pt 10), pp. 3255-3263.

Liao, C. H., Reveal, L., Hotchkiss, A. and Savary, B. 1999. Genetic and biochemical characterization of an exopolysaccharuronase and a pectate lyase from *Yersinia enterocolitica*., *Can J Microbiol* (45:5), pp. 396-403.

Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F. and Rodríguez-Palenzuela, P. 2003. The *Erwinia chrysanthemi phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue., *Mol Microbiol* (49:2), pp. 347-357.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria., *J Bacteriol* (172:11), pp. 6568-6572.

de Lorenzo, V. and Timmis, K. N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons., *Methods Enzymol* (235), pp. 386-405.

Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J. M. and Bohin, J. P. 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*., *Mol Microbiol* (10:2), pp. 329-340.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. and Ausubel, F. M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model., *Cell* (96:1), pp. 47-56.

Majdalani, N. and Gottesman, S. 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system., *Annu Rev Microbiol* (59), pp. 379-405.

Manulis, S., Kobayashi, D. Y. and Keen, N. T. 1988. Molecular cloning and sequencing of a pectate lyase gene from *Yersinia pseudotuberculosis*., *J Bacteriol* (170:4), pp. 1825-1830.

Mariscotti, J. F. and Portillo, F. G. 2008. Instability of the *Salmonella* RcsCDB signalling system in the absence of the attenuator IgaA., *Microbiology* (154:Pt 5), pp. 1372-1383.

Markovitz, A. 1964. Regulatory mechanisms for synthesis of capsular polysaccharide in mucoid mutants of *Escherichia coli* K12., *Proc Natl Acad Sci U S A* (51), pp. 239-246.

Mascher, T., Helmmann, J. D. and Unden, G. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases., *Microbiol Mol Biol Rev* (70:4), pp. 910-938.

Masclaux, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Expert, D. 1996. Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyase in pathogenesis of African violets. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **9**: 198-205.

Maurelli, A. T. 2007. Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens., *FEMS Microbiol Lett* (267:1), pp. 1-8.

Mayer, C., & Boos W. 2005, Hexose/Pentose and Hexitol/Pentitol Metabolism, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, Module 3.4.1, electronic version www.ecosal.org.

Miller JH. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Minsavage, G. V., Mudgett, M. B., Stall, R. E. and Jones, J. B. 2004. Importance of *opgHXCv* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions., *Mol Plant Microbe Interact* (17:2), pp. 152-161.

Mizusawa, S. and Gottesman, S. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of *sulA* protein., *Proc Natl Acad Sci U S A* (80:2), pp. 358-362.

Mole, B. M., Baltrus, D. A., Dangl, J. L. and Grant, S. R. 2007. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria., *Trends Microbiol* (15:8), pp. 363-371.

Mot, R. D. and Vanderleyden, J. 1994. The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan., *Mol Microbiol* (12:2), pp. 333-334.

Mouslim, C., Delgado, M. and Groisman, E. A. 2004. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence., *Mol Microbiol* (54:2), pp. 386-395.

Muyerowitz EM and Somerville CR. 1994. Arabidopsis. Cold spring harbor laboratory press.

Nakamura, A., Maeda, H., Mizuno, M., Koshi, Y. and Nagamatsu, Y. 2003. beta-Galactosidase and its significance in ripening of *Saijyo Japanese Persimmon* fruit., *Biosci Biotechnol Biochem* (67:1), pp. 68-76.

Narita, S. and Tokuda, H. 2006. An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals., *FEBS Lett* (580:4), pp. 1164-1170.

Nasser, W. and Reverchon, S. 2002. H-NS-dependent activation of pectate lyases synthesis in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* is mediated by the PecT repressor., *Mol Microbiol* (43:3), pp. 733-748.

Natale, P., Brüser, T. and Driessen, A. J. M. 2007. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms., *Biochim Biophys Acta*.

Nikaido. 1996. *Outer Membrane*. Neidhardt, R Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 29-47.

Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J. M., Robert-Baudouy, J. and Bohin, J. P. 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity., *J Bacteriol* (183:10), pp. 3134-3141.

Park, D. and Forst, S. 2006. Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FliA pathway in *Xenorhabdus nematophila*., *Mol Microbiol* (61:6), pp. 1397-1412.

Parker, C. T., Kloser, A. W., Schnaitman, C. A., Stein, M. A., Gottesman, S. and Gibson, B. W. 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12., *J Bacteriol* (174:8), pp. 2525-2538.

Prasad, J., McJarrow, P. and Gopal, P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying., *Appl Environ Microbiol* (69:2), pp. 917-925.

Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. and Silhavy, T. J. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*., *Mol Microbiol* (20:5), pp. 911-917.

Puvanesarajah, V., Schell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J. and Nester, E. W. 1985. Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*., *J Bacteriol* (164:1), pp. 102-106.

Raetz, C. R. 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis., *Annu Rev Genet* (20), pp. 253-295.

Raivio, T. L. and Silhavy, T. J. 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors., *Annu Rev Microbiol* (55), pp. 591-624.

Rantakari, A., Virtaharju, O., Vähämiko, S., Taira, S., Palva, E. T., Saarilahti, H. T. and Romantschuk, M. 2001. Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: partial characterization of the *hrp* gene cluster., *Mol Plant Microbe Interact* (14:8), pp. 962-968.

Resibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E. and Toussaint, A. 1984. phiEC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*., *Virology* (137:1), pp. 102-112.

Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J. and Nasser, W. 1997. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*., *J Bacteriol* (179:11), pp. 3500-3508.

Rhodium, V. A., Suh, W. C., Nonaka, G., West, J. and Gross, C. A. 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes., *PLoS Biol* (4:1), pp. e2.

Rolin, D. B., Pfeffer, P. E., Osman, S. F., Szwergold, B. S., Kappler, F. and Benesi, A. J. 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110., *Biochim Biophys Acta* (1116:3), pp. 215-225.

Rollet E. 2006. La biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés : de la démonstration des gènes impliqués chez *Pseudomonas aeruginosa* à l'analyse structurale de protéines impliquées chez *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.

Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F., Achouak, W. and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol* (55:Pt 4), pp. 1415-1427.

Santos, R., Franza, T., Laporte, M. L., Sauvage, C., Touati, D. and Expert, D. 2001. Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937., *Mol Plant Microbe Interact* (14:6), pp. 758-767.

Sato, T., Ito, K. and Yura, T. 1977. Membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes., *Eur J Biochem* (78:2), pp. 557-567.

Salmond, G. P. C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 181-200.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Schoonejans, E., Expert, D. and Toussaint, A. 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysanthemi* lipopolysaccharide-defective, phi EC2-resistant mutants., *J Bacteriol* (169:9), pp. 4011-4017.

Shiba, Y., Matsumoto, K. and Hara, H. 2006. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*., *Genes Genet Syst* (81:1), pp. 51-56.

- Shiba, Y., Yokoyama, Y., Aono, Y., Kiuchi, T., Kusaka, J., Matsumoto, K. and Hara, H.** 2004. Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin., *J Bacteriol* (186:19), pp. 6526-6535.
- Shipkowski, S. and Brenchley, J. E.** 2006. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases., *Appl Environ Microbiol* (72:12), pp. 7730-7738.
- Sledjeski, D. D. and Gottesman, S.** 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12., *J Bacteriol* (178:4), pp. 1204-1206.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C. and Palmer, T.** 2001. *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope., *J Bacteriol* (183:1), pp. 139-144.
- Stock, J. B., Rauch, B. and Roseman, S.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*., *J Biol Chem* (252:21), pp. 7850-7861.
- Sun, Y., Hinnebusch, B. J. and Darby, C.** 2008. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene., *Proc Natl Acad Sci U S A* (105:23), pp. 8097-8101.
- Talaga, P., Cogez, V., Wieruszkeski, J., Stahl, B., Lemoine, J., Lippens, G. and Bohin, J.P.** 2002. Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*., *Eur J Biochem* (269:10), pp. 2464-2472.
- Talaga, P., Fournet, B. and Bohin, J. P.** 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*., *J Bacteriol* (176:21), pp. 6538-6544.
- Talaga, P., Stahl, B., Wieruszkeski, J. M., Hillenkamp, F., Tsuyumu, S., Lippens, G. and Bohin, J. P.** 1996. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans., *J Bacteriol* (178:8), pp. 2263-2271.
- Teather, R. M. and Wood, P. J.** 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen., *Appl Environ Microbiol* (43:4), pp. 777-780.
- Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara, S. and Sugimoto, N.** 2005. Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity., *Mol Microbiol* (58:1), pp. 320-333.
- Tokishita, S. and Mizuno, T.** 1994. Transmembrane signal transduction by the *Escherichia coli* osmotic sensor, EnvZ: intermolecular complementation of transmembrane signalling., *Mol Microbiol* (13:3), pp. 435-444.
- Tomenius, H., Pernestig, A., Jonas, K., Georgellis, D., Möllby, R., Normark, S. and Melefors, O.** 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract., *BMC Microbiol* (6), pp. 27.

Torriani, A. 1968. Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo., *J Bacteriol* (96:4), pp. 1200-1207.

Toutain, C. M., Clarke, D. J., Leeds, J. A., Kuhn, J., Beckwith, J., Holland, I. B. and Jacq, A. 2003. The transmembrane domain of the DnaJ-like protein DjlA is a dimerisation domain., *Mol Genet Genomics* (268:6), pp. 761-770.

Uhl, M. A. and Miller, J. F. 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay., *EMBO J* (15:5), pp. 1028-1036.

Venecia, K. and Young, G. M. 2005. Environmental regulation and virulence attributes of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B., *Infect Immun* (73:9), pp. 5961-5977.

Venkatesh, B., Babujee, L., Liu, H., Hedley, P., Fujikawa, T., Birch, P., Toth, I. and Tsuyumu, S. 2006. The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants., *J Bacteriol* (188:8), pp. 3088-3098.

Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P. and Lazzaroni, J. C. 2005. *Escherichia coli* *tol* and *rsc* genes participate in the complex network affecting curli synthesis., *Microbiology* (151:Pt 7), pp. 2487-2497.

Vieira, J. and Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers., *Gene* (19:3), pp. 259-268.

Vimr, E., Steenbergen, S. and Cieslewicz, M. 1995. Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1., *J Ind Microbiol* (15:4), pp. 352-360.

Vincken, J., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. and Visser, R. G. F. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture., *Plant Physiol* (132:4), pp. 1781-1789.

Vollmer, W., Blanot, D. and de Pedro, M. A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture., *FEMS Microbiol Rev* (32:2), pp. 149-167.

Vries, R. P. D., Parenicová, L., Hinz, S. W. A., Kester, H. C. M., Beldman, G., Benen, J. A. E. and Visser, J. 2002. The beta-1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions., *Eur J Biochem* (269:20), pp. 4985-4993.

Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P. 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of beta 1-2-linked polyglucose chains., *J Biol Chem* (259:20), pp. 12644-12651.

West, A. H. and Stock, A. M. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems., *Trends Biochem Sci* (26:6), pp. 369-376.

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, J. P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis., *Plant Mol Biol* (47:1-2), pp. 9-27.

Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. and Ishihama, A. 2005. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*., *J Biol Chem* (280:2), pp. 1448-1456.

Yang, C., Gavilanes-Ruiz, M., Okinaka, Y., Vedel, R., Berthuy, I., Boccara, M., Chen, J. W., Perna, N. T. and Keen, N. T. 2002. *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors., *Mol Plant Microbe Interact* (15:5), pp. 472-480.

Yang, S., Peng, Q., Zhang, Q., Yi, X., Choi, C. J., Reedy, R. M., Charkowski, A. O. and Yang, C. 2008. Dynamic regulation of GacA in type III secretion, pectinase gene expression, pellicle formation, and pathogenicity of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937)., *Mol Plant Microbe Interact* (21:1), pp. 133-142.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors., *Gene* (33:1), pp. 103-119.

Yoo, J., Jung, Y., Chung, S., Lee, Y. and Choi, Y. 2004. Molecular cloning and characterization of CMCCase gene (*celC*) from *Salmonella typhimurium* UR., *J Microbiol* (42:3), pp. 205-210.

York, W. S. 1995. A conformational model for cyclic beta-(1->2)-linked glucans based on NMR analysis of the beta-glucans produced by *Xanthomonas campestris*., *Carbohydr Res* (278:2), pp. 205-225.

Young, G. M. and Miller, V. L. 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis., *Mol Microbiol* (25:2), pp. 319-328.

Titre : Rôle du périplasma dans la perception par la bactérie de son environnement

Erwinia chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène responsable de la formation d'une pourriture molle sur un large spectre de plantes hôtes. Sa virulence dépend principalement de la sécrétion d'exoenzymes (dont les pectinases et cellulases) qui vont dégrader la paroi des cellules végétales. L'objectif de cette thèse est de participer à la compréhension du rôle du périplasma dans la perception de l'environnement par la bactérie. Nous avons caractérisé génétiquement et biochimiquement le locus *gan* codant 9 protéines impliquées dans le transport et la dégradation des β -galactanes (un des composants de la pectine). Les OPG (glucanes périplasmiques osmorégulés) sont essentiels pour la virulence d'*E. chrysanthemi* puisqu'un mutant *opgG* incapable de les synthétiser présente un phénotype pléiotrope dont la perte de virulence. Une mutation suppressive de la mutation *opgG* localisée dans le gène *rscC* a été obtenue au laboratoire. Nous avons voulu préciser le rôle du système à deux composants RcsCDB dans le pouvoir pathogène de la bactérie. La mutation *rscC2* conduit à une diminution de la phosphorylation du régulateur RcsB due à une augmentation de l'activité phosphatase de RcsC. Pourtant RcsB n'est pas essentielle pour la virulence. Nous avons également montré que l'expression des gènes régulés par le système RcsCDB est influencée par la quantité des OPG. Une faible surexpression d'une version soluble de RcsF engendre une activation du système Rcs et que la faible surexpression de DjlA et IgaA n'a pas d'effet significatif. Enfin, nous avons entrepris de caractériser la structure de RcsF par mutagenèse dirigée.

Mots Clés : *Erwinia chrysanthemi*, glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG), dégradation et transport des galactanes, système à deux composants RcsCDB, virulence

Title: Role of the periplasm in bacteria's environment perception.

Erwinia chrysanthemi is a phytopathogenic enterobacterium causing soft rot disease in a wide range of plant species. The maceration of plant tissues is essentially caused by the secretion of a set of plant cell wall degrading enzymes (including pectinases and cellulases). The aim is to participate to the understanding of the role of the periplasm in environment perception by bacteria. We characterised genetically and biochemically the *gan* locus encoding 9 proteins involved in galactan transport and catabolism (galactan is a pectic component). Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are essential for *E. chrysanthemi* pathogenicity. An *opgG* mutant lacks OPGs and shows a pleiotropic phenotype including nonvirulence. A *rscC* point mutation (*rscC2*) suppresses the phenotype induced by OPGs defect. We wanted to clarify the role of the Rcs system in pathogenicity. The *rscC2* mutation leads to the reduction of transcriptional activity of RcsB caused by an increase of phosphatase activity of RcsC. Mutations in RcsCDB proteins show that RcsB is not essential to virulence. We have shown that genes expression regulated by RcsCBD phosphorelay is influenced by the quantity of OPGs in the periplasm. An ectopic overexpression of a soluble version of RcsF leads to a RcsCDB phosphorelay activation, while an ectopic overexpression of DjlA and IgaA has no significant effects. Finally, we have characterized RcsF structures by site-directed mutagenesis and deletion mutagenesis.

Keywords : *Erwinia chrysanthemi*, osmoregulated periplasmic glucanes (OPGs), galactan transport and catabolism, RcsCDB two component system, virulence.