



Université Lille – Nord de France

Ecole Doctorale Biologie – Santé

Thèse

Présentée par

**Sébastien Bontemps-Gallo**

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

Spécialité : Microbiologie

***Dickeya dadantii* :**

## **Vers la compréhension du rôle biologique des glucanes périplasmiques osmorégulés**

Soutenue le 7 octobre 2013, devant la commission d'examen composée du :

Dr Laurent Debarbieux (Chargé de Recherche Institut Pasteur)

Pr Alain Filloux (Professeur Imperial College London) – **Rapporteur**

Dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (Directeur de Recherche CNRS) – **Rapporteur**

Pr Jean-Marie Lacroix (Professeur à l'Université de Lille 1) – **Directeur de thèse**

Pr Yves Lemoine (Professeur à l'Université de Lille 1)

Dr Jean-Claude Michalski (Directeur de Recherche INSERM)

Dr Florent Sebbane (Chargé de Recherche INSERM)

« Les conditions qui s'avèrent nécessaires au progrès à un moment de l'histoire peuvent devenir, à un autre moment, des obstacles. Le temps est venu où les progrès à faire dans notre compréhension de la nature impliquent que nous considérions la relation entre intérieur et extérieur, entre organisme et environnement. »

Richard C. Lewontin, La triple hélice

## Remerciements

Cette étude a été réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576 CNRS / Lille 1, dans l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes, sous la direction du Professeur Jean-Marie Lacroix. Mon contrat doctoral a été financé par l'Université de Lille 1.

Tout d'abord, je remercie les différents membres de mon jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Je remercie le Dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et le Pr Alain Filloux d'avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie le Dr Laurent Debarbieux d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je remercie également le Dr Jean-Claude Michalski d'avoir accepté de présider ce jury. Enfin, je remercie le Pr Yves Lemoine et le Dr Florent Sebbane d'avoir suivi mes recherches tout au long de ma thèse lors des comités de suivi de thèse et d'être présents dans le jury.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr Jean-Marie Lacroix, pour la grande liberté qu'il m'a laissée dans mes recherches, sa disponibilité, sa patience et la richesse de nos discussions scientifiques (ou non). J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Je n'oublie pas les deux autres personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux. En premier lieu, le Dr Edwige Madec, avec qui j'ai eu plaisir de travailler et surtout d'apprendre. En second lieu, Jacqueline Dondeyne, notamment pour son aide et surtout pour veiller sur chacun de nous (et en particulier sur moi).

Je remercie également les autres membres de l'équipe (ou associés) : Kévin Quintard, Peggy Gruau, le Dr Olivier Vidal, le Dr Edwige Meurice et Dominique Lecoeur.

J'ai eu un grand plaisir à collaborer avec le Dr Catherine Robbe-Masselot. J'ai particulièrement apprécié sa pédagogie et sa grande efficacité.

Je remercie également le Dr Christophe Tastet pour ses nombreuses discussions sur l'intérêt de la protéomique et pour notre collaboration.

Je remercie le Dr Brigitte Delrue pour ses discussions et ses nombreux conseils.

De plus, je remercie l'ensemble des membres de l'Unité, en particulier le Dr Patricia Nagnan-Le Meillour, le Pr Gérard Vergoten, le Dr Anne Harduin-Lepers, le Dr Yann Guerardel, le Dr Bernadette Coddeville et le Dr Le Danvic Chrystelle.

Je remercie Martine Ratajczak, Yvon Hu, Nadège Vereecke et Gaëlle Vanstaevel pour leur disponibilité et leur aide dans la gestion des différents stocks.

Je remercie également le Dr Guy Condemine (UMR 5240), le Pr Anthony Gay (Cornell University), le Pr Amy Charkowski (Wisconsin-Madison University), le Dr Frédérique Van Gijsegem (UMR 217), et le Dr William Nasser (UMR 5240) pour l'envoi de souches bactériennes et de plasmides.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien qui m'a permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui.

# Introduction

Apparues il y a quelques 3,8 milliards d'années, les bactéries ont été les premiers êtres vivants confrontés au problème de vie en dehors de la soupe primordiale. La solution fût d'enfermer un peu de cette soupe primordiale à l'intérieur d'une cellule. La cellule ainsi formée conduisit à la notion du soi – ce qui est l'intérieur – et du non soi – ce qui est à l'extérieur. La séparation entre l'intérieur et l'extérieur est assurée par l'enveloppe. Cette barrière est bien plus qu'une simple frontière. Elle est le siège de nombreuses fonctions. L'enveloppe des bactéries est une structure complexe qui assure les échanges sélectifs et réciproques entre l'intérieur de la cellule et son environnement. Ces échanges sont de trois types : flux de matière, flux d'énergie et flux d'information. La compréhension de l'enveloppe et de ses constituants est donc primordiale dans la compréhension du rôle qu'elle joue dans les processus dynamiques nécessaires à la vie de la bactérie.

La présence au sein de cette enveloppe de glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) ou oligosaccharides dérivés des membranes (MDO) a été mise en évidence en 1942 par McIntire et collaborateurs [1]. Les recherches menées dans l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes portent sur la compréhension du mécanisme de biosynthèse de ces glucanes, de leurs fonctions au sein de l'enveloppe et de la bactérie. Cette étude s'inscrit naturellement dans cette thématique et porte sur l'établissement d'un modèle de compréhension du rôle biologique des OPG chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*.

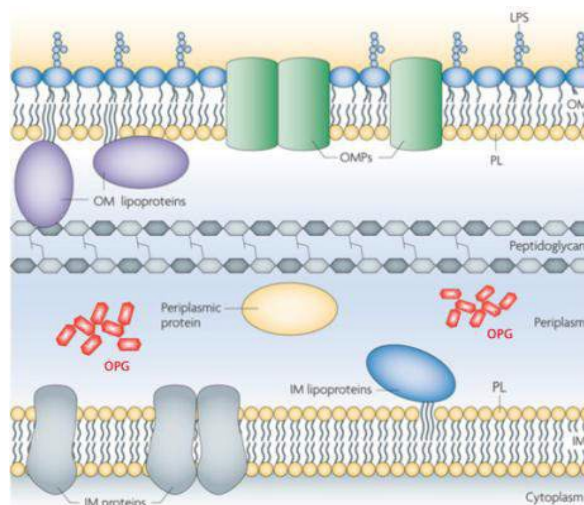
## **1. La structure de l'enveloppe des Protéobactéries**

Chez les bactéries à Gram négatif, l'enveloppe se compose de deux membranes, une membrane cytoplasmique ou cellulaire et une membrane externe, séparées par un compartiment aqueux : le périplasme (Fig. 1).

### **1.1 La membrane cytoplasmique**

La membrane cytoplasmique ou cellulaire est une membrane classique composée d'une bicouche lipidique. Elle contient des protéines et des lipides en proportions égales.

Cette bicouche lipidique se compose de trois espèces majeures de phospholipides : les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylglycérols et des cardiolipides [2]. Ces derniers sont constitués de glycérol-3-phosphate estérifié par deux acides gras, acide palmitique, acide palmitoléique, acide myristique, acide cis-vaccénique, en position 1 et 2. La structure de ces acides gras (longueur, saturation) varie en fonction des conditions physico-chimiques de l'environnement [3]. Enfin, les proportions en phospholipide impactent de nombreux processus cellulaires notamment la réplication du chromosome et la translocation des protéines [3].



Ruiz et al., 2009

Nature Reviews | Microbiology

Figure 1 : Structure de l'enveloppe des entérobactéries (Gram négatif). IM : membrane cellulaire (inner membrane), OM : membrane externe (outer membrane), PL : phospholipides, OPG : glucanes périplasmiques osmorégulés, LPS : lipopolysaccharides, OMP : protéine de la membrane externe (outer membrane protein). Modifié d'après Ruiz *et al.*, 2009 [4].

Les protéines, plus d'une centaine d'espèces différentes, sont en proportions variables selon les conditions environnementales afin de permettre une adaptation adéquate à ces changements [5]. Ces protéines participent à divers processus de synthèse notamment celle du lipopolysaccharide (LPS), du peptidoglycane, des phospholipides, des exopolysaccharides (EPS) et des glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Les protéines de la membrane cellulaire sont également impliquées dans les processus de respiration, de transport ou de sécrétion de protéines, mais aussi dans la perception des variations environnementales en particulier via les systèmes à deux composants.

## 1.2 La membrane externe et la surface de l'enveloppe

### 1.2.1 La membrane externe

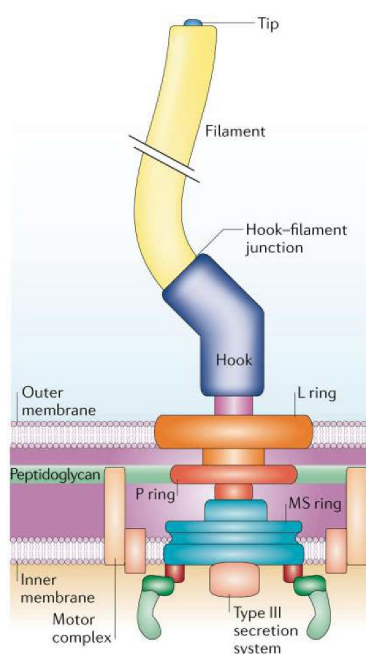
La membrane externe, spécifique des bactéries à Gram négatif, est une seconde barrière qui va protéger la cellule des variations physico-chimiques. Elle se compose d'une bicouche lipidique asymétrique. Le feuillet interne est constitué de phospholipides similaires à ceux de la membrane cellulaire. Le feuillet externe est constitué principalement de lipopolysaccharides (LPS) ; il est composé de trois parties : le lipide A, constitué de deux N-acétylglucosamines sur lesquelles sont branchés quatre à six acides gras ancrant cette partie à la membrane. Ce lipide A est surmonté du noyau constitué de divers sucres lui-même surmonté de l'antigène O, répétition multiple d'un motif de sucres en nombre limité (souvent quatre). Cette

composition rend la membrane externe plus rigide et peu perméable aux molécules hydrophiles comme aux molécules hydrophobes.

Au sein de cette membrane externe, des protéines et des lipoprotéines assurant de nombreuses fonctions sont présentes. Les porines, protéines majoritaires organisées en homotrimères, forment des pores plus ou moins spécifiques et permettent le passage des molécules hydrophiles inférieure à 600 Da comme les porines OmpF ou OmpC. OmpA, organisée comme une porine, participe à la structure au même titre que la lipoprotéine de Braun. En plus de ces porines et lipoprotéines, d'autres protéines sont présentes et jouent le rôle de récepteur spécifique ou sont impliquées dans les systèmes de sécrétion (protéines, exopolysaccharides) ou de locomotion : les flagelles.

### 1.2.2 Flagelles et pili

Les flagelles et les pili sont les deux seules structures protéiques se déployant au delà de la surface bactérienne. Le flagelle est l'organe de locomotion des bactéries. Il se compose de trois parties (Fig. 2) : le moteur ou corps basal, le crochet et un filament long de 5 à 10  $\mu\text{m}$ . Le flagelle permet à la bactérie de se mouvoir vers des environnements plus favorables ou moins défavorables à sa croissance.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Microbiology

Figure 2 : Structure d'un flagelle bactérien. Filament : Filament, Hook : crochet, motorcomplexe : complexe moteur. D'après Pallen *et al.*, 2006 [6].



Les pili ou fimbriae, constitués de protéines structurales nommées pilines, permettent l'attachement à différentes surfaces biotiques comme abiotiques. Plusieurs types de pili existent : les pili sexuels, impliqués dans la conjugaison bactérienne, les pili communs de type I, impliqués dans les interactions hôte-pathogène pour ne citer qu'eux.

### 1.2.3 Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) entourent la bactérie, ils peuvent former une capsule et jouent un rôle de protection. Ces EPS sont hydrophiles et anioniques. Ces propriétés leur permettent notamment de séquestrer les molécules toxiques cationiques, de résister à la dessiccation ou d'éviter la phagocytose. La régulation de leur synthèse dépend de conditions environnementales telles que la température ou l'osmolarité.

### 1.3 Le périplasme

Situé entre les deux membranes, le périplasme représente entre 8 et 40% du volume cellulaire selon les conditions environnementales en particulier l'osmolarité du milieu [7-9]. Ce compartiment aqueux [10] contient des protéines qui assurent de nombreux rôles : dans la synthèse et l'assemblage des constituants de l'enveloppe, dans la sécrétion, dans la nutrition, dans la signalisation, etc. Deux glycanes sont également retrouvés : le peptidoglycane, est un polymère unique entourant la membrane cellulaire. Il est composé d'une répétition de N-acétylglucosamine relié à un acide N-acétylmuramique sur lequel sont branchés quatre acides aminés. De nombreuses transpeptidations et transglycosylations permettent une forte réticulation de cette macromolécule conférant rigidité, forme et résistance à la pression osmotique à la bactérie. Enfin, les glucanes périplasmiques osmorégulés sont des oligosaccharides dont l'abondance varie en fonction de l'osmolarité du milieu et qui sont impliqués dans la perception des variations environnementales.

## 2. Les glucanes périplasmiques osmorégulés

Mis en évidence pour la première fois en 1942, dans une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* sous la forme de glucanes cycliques  $\beta$ -1,2 [1] et classés initialement comme une sous classe d'exopolysaccharides, les glucanes périplasmiques osmorégulés furent mis en évidence à nouveau dans le laboratoire d'Eugene Kennedy en 1973 chez *Escherichia coli*. Van Golde et collaborateurs ont détecté, lors d'une étude du renouvellement des phospholipides de la membrane cellulaire chez *E. coli* par marquage au  $^{32}\text{P}$ , que le phosphoglycérol libéré lors du renouvellement du phosphatidylglycérol était transféré sur des oligosaccharides solubles du périplasme [11]. En raison de leur mise en évidence chez *E. coli*, ils furent nommés MDO

(membrane-derived oligosaccharides). En 1986, Miller montra que ces  $\beta$ -glucanes étaient osmorégulés [12]. L'analyse des glucanes d'un nombre de plus en plus grand d'espèces bactériennes a montré que ceux-ci présentent plusieurs caractéristiques communes :

- le D-glucose est le seul sucre présent,
- la liaison entre ces résidus de glucoses est presque toujours une liaison  $\beta$ -glucosidique,
- le nombre d'unités de glucose est compris entre 5 et 24.

Les MDO ne présentant pas chez toutes les espèces de substituants ne dérivant pas des phospholipides membranaires, ils furent renommés glucanes périplasmiques osmorégulés ou OPG [13]. Ces OPG sont présents chez les alpha, beta et gamma Proteobacteria [14]. Ils présentent des différences structurales et de substitution. Ces substitutions peuvent être originaires des phospholipides des membranes comme les phosphoglycérols ou les phosphoéthanolamines, ou originaires du métabolisme intermédiaire comme par exemple les résidus acétyles ou succinyles [14].

## 2.1 la structure des OPG

Les OPG sont répartis en quatre classes selon la structure glucosidique de leur squelette [13] (Fig. 3).

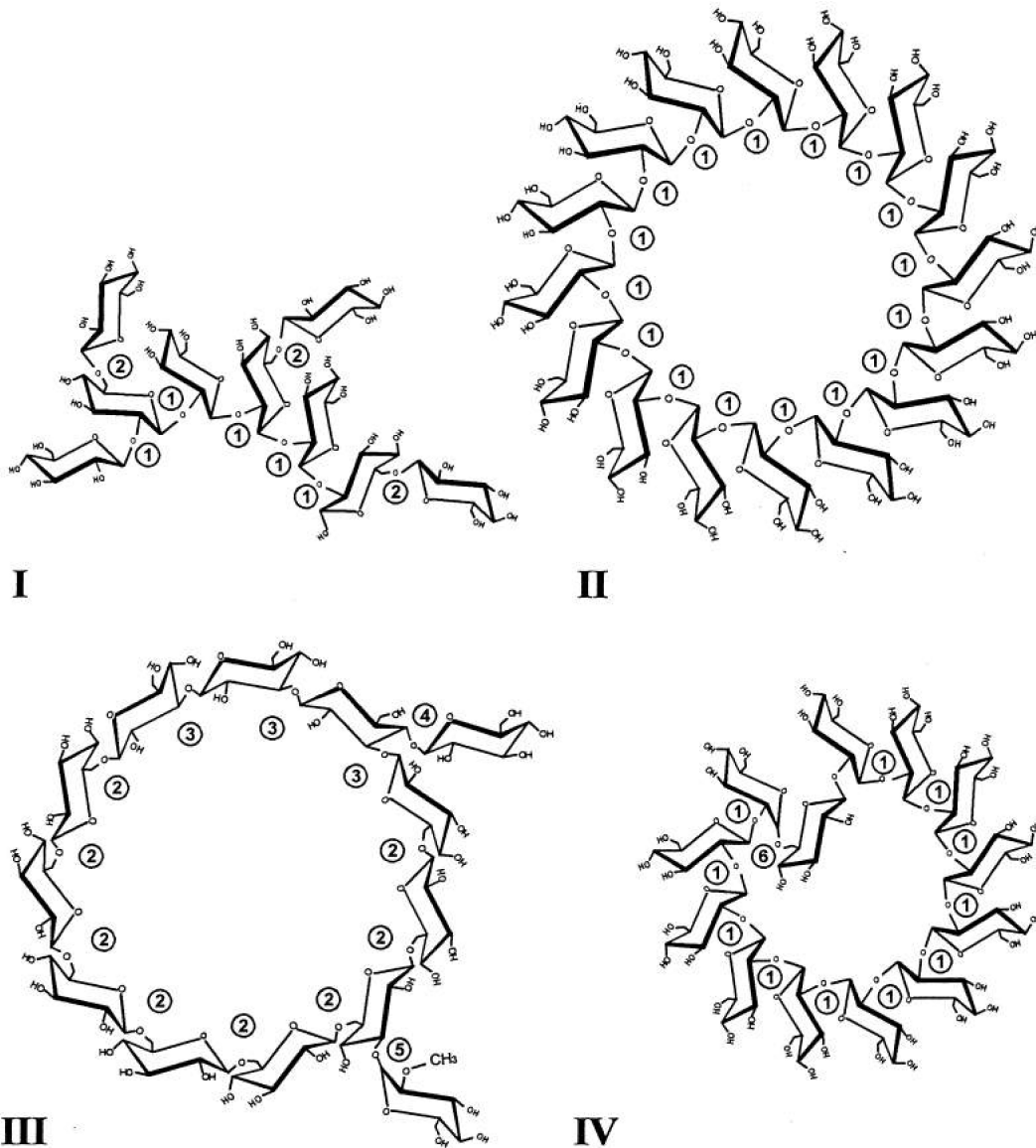
### 2.1.1 La famille I

La première famille comprend les OPG des entérobactéries telles que *E. coli* ou *Dickeya dadantii* et d'espèces du genre *Pseudomonas* comme *Pseudomonas syringae*. Ces oligomères sont linéaires et constitués de 5 à 12 unités de glucoses liés en  $\beta$ -1,2 et ramifiés en  $\beta$ -1,6. La branche en  $\beta$ -1,6 ne comporte qu'un seul glucose (Fig. 3).

Chez *E. coli*, les OPG sont substitués par des phosphoglycérols, des phosphoéthanolamines et du succinate sur le carbone 6 [15]. Chez *D. dadantii*, ces OPG sont substitués par du succinate et de l'acétate [16]. Enfin, chez *P. syringae*, aucun substituant n'a été trouvé [17].

### 2.1.2 La famille II

La seconde famille regroupe les OPG retrouvés dans la famille des Rhizobiacées notamment issus des *Agrobacterium*, des *Rhizobium*, des *Sinorhizobium* ou des *Brucella* [18]. Ces OPG sont cycliques liés en  $\beta$ -1,2 et comportent de 17 à 25 résidus de glucoses (Fig. 3). Ils peuvent être substitués par des résidus phosphoglycérols, succinyles ou méthylmalonyls.



① =  $\beta$ -1,2    ② =  $\beta$ -1,6    ③ =  $\beta$ -1,3    ④ =  $\beta$ -1,4    ⑤ =  $\alpha$ -1,3    ⑥ =  $\alpha$ -1,6

Figure 3 : Représentation des quatre familles d'OPG (Bohin, 2000 [13])

### 2.1.3 La famille III

La troisième famille d'OPG a été rencontrée chez les *Bradyrhizobium*. Leur taille est spécifique. Ce sont des molécules cycliques de 10 à 13 résidus liés en  $\beta$ -1,3 et en  $\beta$ -1,6 (Fig. 3) [18, 19].

### 2.1.4 La famille IV

La dernière famille regroupe les OPG de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* et *Rhodobacter sphaeroides*. Les OPG sont cycliques et présentent un degré de polymérisation unique : respectivement 13 [20], 16 [20, 21] et 18 [22]. Ils

sont lié en  $\beta$ -1,2 et fermé par un glucose en  $\beta$ -1,6 (Fig. 3). Ils peuvent être substitués par du succinate ou du phosphoglycérol.

## 2.2 La biosynthèse des OPG de la famille I

La biosynthèse des OPG de la famille I et sa régulation se comprend à la lumière des travaux sur *E. coli*, transposable aux différentes bactéries de cette famille.

### 2.2.1 Le modèle : Escherichia coli

Chez *E. coli*, six protéines sont impliquées uniquement dans la biosynthèse (Fig. 5).

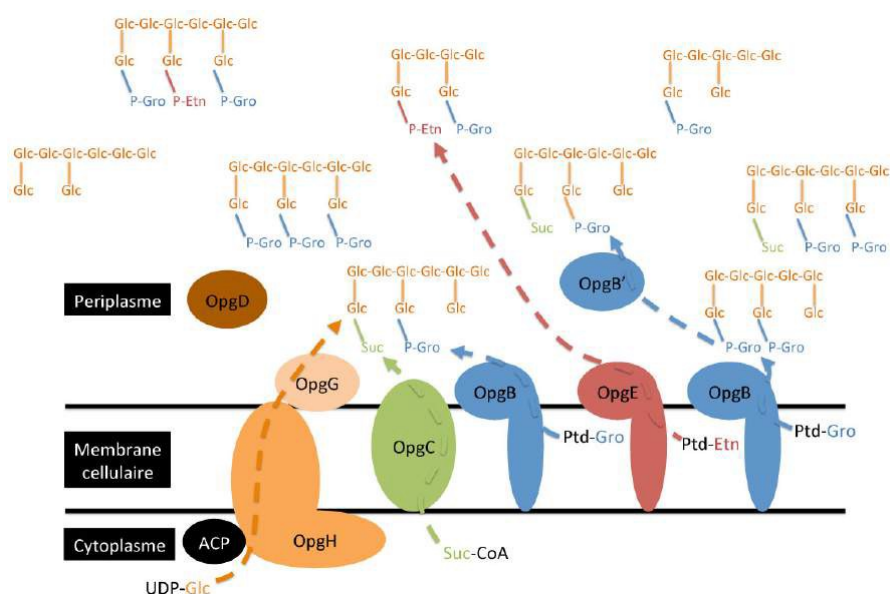


Figure 4 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *E. coli*. La variété dans la structure et dans les combinaisons des substitutions a été schématiquement représentée. Modifié d'après Bohin et Lacroix, 2006 [14].

Les protéines OpgG et OpgH, produits de l'opéron *opgGH*, sont les deux seules protéines indispensables à la synthèse des OPG. OpgH, une protéine transmembranaire formant un canal [23], catalyse la synthèse du squelette linéaire lié en  $\beta$ -1,2 des OPG à partir d'UDP-glucose [24]. OpgG, une protéine périplasmique, est une enzyme de branchement qui permet la formation des liaisons  $\beta$ -1,6 [25]. De plus, elle permettrait la libération des OPG dans le périplasma. Cette protéine semble être limitante puisque sa surexpression permet la synthèse de trois ou quatre fois plus d'OPG. *In vitro*, l'acyl carrier protein (ACP), connue pour son rôle dans la biosynthèse des acides gras, est nécessaire au transfert des résidus de glucose. Aucune étude *in vivo* n'ayant été réalisée, il est impossible de déterminer si l'ACP est indispensable à la synthèse des OPG. D'après une modélisation informatique, les protéines OpgG et OpgH semblent former un complexe

multiprotéique (Fig. 5) nécessaire à la synthèse des OPG (Pr G. Vergoten, résultat non publié).

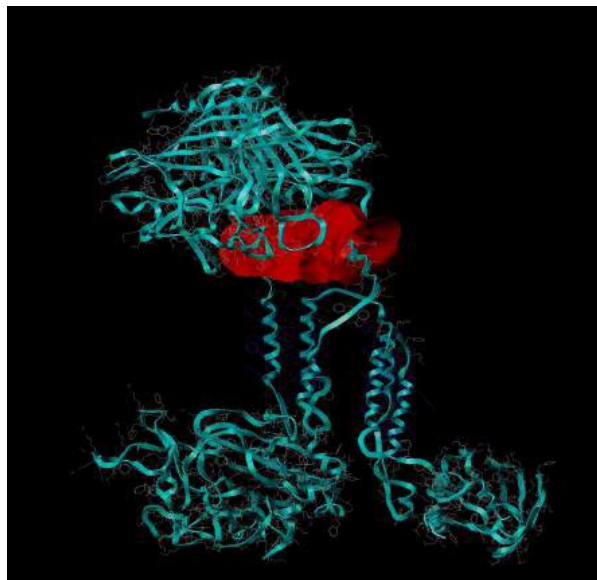


Figure 5 : Modélisation informatique des protéines OpgH (en bas) et OpgG (en haut). Ces deux protéines présentent une zone d'interaction (en rouge). Résultat non publié, Pr G. Vergoten

En plus de ce set de protéines, quatre autres protéines sont impliquées dans la biosynthèse des OPG. OpgD, une protéine périplasmique paralogue d'OpgG [26], contrôle la taille des OPG. L'inactivation d'*opgD* ne conduit pas à un arrêt de la synthèse des OPG mais à une augmentation du degré de polymérisation du squelette glucosidique. La taille des OPG est alors comprise entre 6 et 18 résidus de glucose.

OpgB, OpgC et OpgE sont impliquées dans la substitution des OPG. OpgB est une protéine ancrée dans la membrane cellulaire dont le domaine catalytique est soluble et périplasmique. OpgB assure le transfert primaire du phosphatidylglycérol sur les OPG naissants à partir des phosphatidylglycérols de cette membrane (Fig. 4) [27]. OpgB peut être clivée pour libérer dans le périplasma son domaine catalytique appelé OpgB'. Cette dernière assure alors le transfert secondaire des phosphoglycérols à partir d'une molécule naissante d'OPG vers une autre molécule d'OPG soluble dans le périplasma [28]. OpgC, une protéine transmembranaire, transfère des résidus succinyles sur les chaînes en cours d'élongation des OPG (Fig. 4). L'origine de ces résidus reste indéterminée mais le succinyl-coenzyme A est proposé [29]. Enfin, OpgE (codé par le gène *ybiP*), transfère des résidus phosphoéthanolamine à partir des phosphatidyléthanolamines [30].

### 2.2.2 La régulation de la biosynthèse des OPG chez *E. coli*

La biosynthèse des OPG est régulée à différents niveaux. Le taux de transcription de l'opéron *opgGH* est sept fois plus élevé en milieu de basse osmolarité par rapport à un milieu de haute osmolarité [31] montrant clairement une régulation au niveau génétique. Un rétrocontrôle négatif a également pu être mis en évidence. Il suggère qu'OpgH percevrait directement les OPG ou les déformations mécaniques de la membrane résultant de l'accumulation d'OPG [14, 32, 33]. Enfin, l'activité enzymatique d'OpgH est inhibée en présence de composés ioniques [14].

La biosynthèse des OPG s'articule donc autour d'une régulation enzymatique conduisant à une rapide inhibition de la synthèse des OPG lors d'une augmentation brutale de l'osmolarité et de la force ionique. C'est une adaptation rapide des cellules. La régulation transcriptionnelle est une adaptation lente face au changement d'osmolarité du milieu extérieur.

### 2.3 La biosynthèse des OPG des familles II, III, IV

La biosynthèse des OPG des familles II (*S. meliloti*), III (*B. japonicum*) et IV (*R. sphaeroides*) repose sur un set de deux ou trois protéines. Globalement, le processus de biosynthèse est similaire pour ces trois familles d'OPG circulaires (Fig. 6). Tout d'abord, une protéine transmembranaire (NdvB ou OpgH) va permettre la synthèse d'un glucane circulaire dont les résidus sont liés en  $\beta$ -1,2 pour les familles II et IV ou en  $\beta$ -1,3 pour la famille III [18, 34, 35]. Les autres protéines présentes participent à la sécrétion des OPG (NdvA, famille II) [18], ou aident à l'activité de la protéine transmembranaire (NdvC, NdvD, OpgG ou OpgI, famille III ou IV) [35, 36].

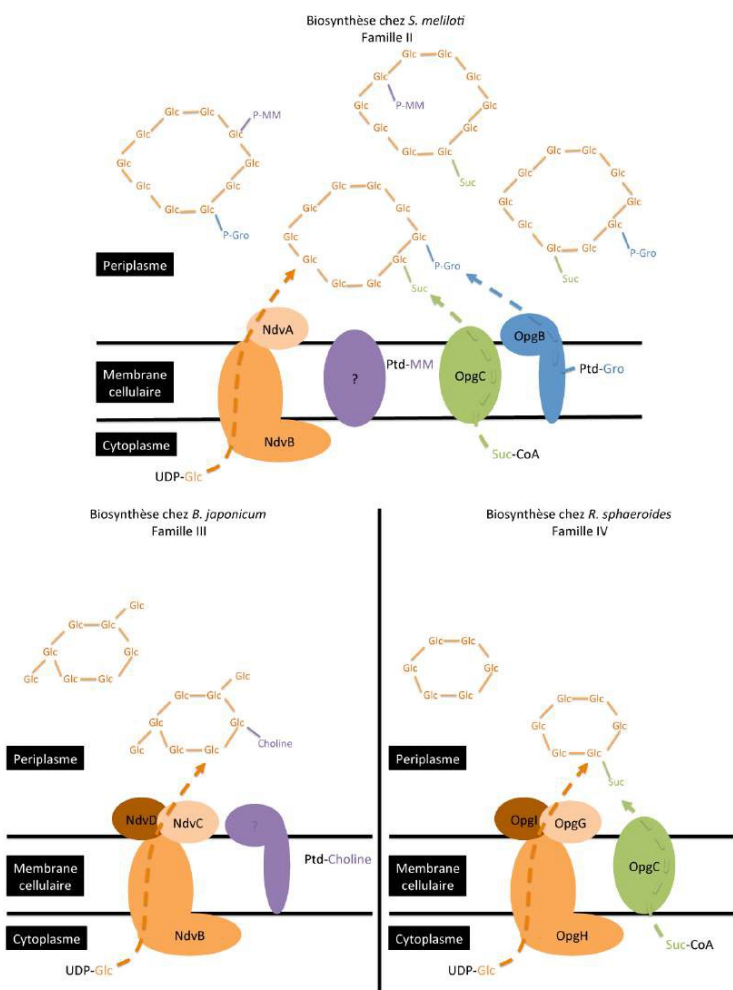


Figure 6 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *S. meliloti*, *B. japonicum* et *R. sphaeroides* correspondant aux familles II, III et IV des OPG. La variété dans la structure et dans les combinaisons des substitutions a été schématiquement représentée.

## 2.4 Phénotype pléiotrope des mutants dépourvus d'OPG

Les mutants dépourvus d'OPG présentent un phénotype pléiotrope. Ces phénotypes varient d'une espèce à l'autre (Tableau 1). Parmi ces phénotypes, on observe notamment une perte totale ou partielle de virulence aussi bien chez les bactéries phytopathogènes que chez les zoopathogènes.

En 2007, une étude protéomique comparant la souche sauvage et le mutant *opgG* de *Dickeya dadantii* a mis en évidence une forte perturbation du catabolisme trahissant un fort besoin en énergie caractéristique d'une induction de la réponse générale au stress [37]. Cette analyse a ainsi mis en lumière une altération globale des performances de la bactérie [37]. Des résultats similaires ont été également observés lors d'une analyse protéomique équivalente chez *Salmonella enterica* sv *typhimurium* quelques 5 ans plus tard [38].

Chez *D. dadantii* et chez *S. enterica* sv *typhimurium*, la co-inoculation d'un mutant dépourvu d'OPG avec une souche sauvage ne permet pas au mutant OPG de croître

même avec 99% de la souche sauvage [39, 40]. Dans les mêmes conditions, un mutant *outC* fortement affecté lui aussi dans la virulence croit normalement en présence de seulement 10% de sauvage.

L'ensemble des études réalisées montre que le dysfonctionnement général du mutant OPG résulte d'un sévère défaut de perception de l'environnement.

Caractère observé	Espèce bactérienne	Phénotype	Référence
Mucosité	<i>Escherichia coli</i>	Aspect résultant d'une hyperproduction d'EPS	[41]
	<i>Dickeya dadantii</i>		[40]
	<i>Rhizobiacées</i>		[18]
Motilité et chimiotactisme	<i>Escherichia coli</i>	Défaut de motilité et chimiotactisme certainement dû à un déficit en flagelle	[42]
	<i>Dickeya dadantii</i>		[40]
	<i>Salmonella enterica</i> sv <i>Typhimurium</i>		[43]
Croissance en milieu hypo-osmotique	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Croissance très lente à basse osmolarité	[18]
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		[12]
	<i>Salmonella enterica</i> sv <i>Typhimurium</i>		[43]
	<i>Shigella flexneri</i>		[44]
	<i>Dickeya dadantii</i>	Pas de problème de croissance	[40]
Hypersensibilité	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Sensibilité aux antibiotiques	[45]
	<i>Dickeya dadantii</i>	Sensibilité aux sels biliaires	[40]
	<i>Escherichia coli</i>	Sensibilité au sodium dodecyl sulfate	[46]
Biofilm	<i>Dickeya dadantii</i>	Perturbation dans la formation du biofilm et de la pellicule	[47]
	<i>Salmonella enterica</i> sv <i>Typhimurium</i>	Pas de perturbation	[44]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Perturbation de la structure du biofilm	[48]
Virulence	<i>Dickeya dadantii</i>	Perte de virulence sur feuille	[40]



		d'endive et en tubercule de pomme de terre	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Perte de virulence sur <i>Caenorhabditis elegans</i> et sur <i>Mus musculus</i>	[49]
	<i>Brucella abortus</i>	Perturbation dans l'invasion du macrophage et de la cellule. Les OPG sont un activateur des cellules dendritiques	[50, 51]
	<i>Salmonella enterica</i> sv <i>Typhimurium</i>	Perte de virulence	[43]
	<i>Pseudomonas syringae</i>		[25]
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		[52]
	<i>Xanthomonas campestris</i>		[53]
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	OpgH nécessaire au stade précoce de l'infection	[54]
Symbiose	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Perturbation de la formation de nodules	[55]
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		[56]

Tableau 1 : Les différents phénotypes des mutants dépourvus d'OPG en fonction des différentes espèces bactériennes.

## 2.5 Les oligosaccharides de type OPG

Les OPG ont pu être identifiés uniquement chez les alpha, beta et gamma Proteobacteria. Une étude récente sur *Campylobacter jejuni* a mis en évidence l'existence d'oligosaccharides de type OPG au sein des Epsilon Proteobacteria. Ces oligosaccharides sont issus de la voie de glycosylation des protéines périplasmiques N-glycosylées issues de l'hydrolyse des oligosaccharides. Ces oligosaccharides sont synthétisés sur le bactoprénol et une partie importante d'entre eux se retrouvent libres dans le périplasme (fOS : free oligosaccharide) avant d'être transférés sur les glycoprotéines. Curieusement, la concentration de ces fOS varie, tout comme les OPG, en fonction de l'osmolarité du milieu [57, 58]. De plus, l'inactivation des gènes responsables de la synthèse de ces fOS conduit également à une perte de virulence [57]. Même s'il n'est pas possible de généraliser la présence de glucanes

périplasmiques chez les bactéries, il semble que ceux-ci soient essentiels pour beaucoup d'entre elles.

## 2.6 Les OPG, une molécule aux multiples rôles?

Eugene P. Kennedy émet la première hypothèse quand au rôle des OPG. Ils joueraient le rôle d'osmoprotecteur [14]. Les OPG seraient synthétisés pour éviter les trop grandes différences d'osmolarité entre un milieu extérieur hypo-osmotique et le cytoplasme afin de maintenir le potentiel de Donnan. Cette hypothèse a été rejetée par la découverte d'OPG sans substitution anionique.

La seconde hypothèse serait que les OPG jouent un rôle structurel dans l'organisation de l'enveloppe en interagissant avec d'autres structures comme les phospholipides ou le peptidoglycane [14].

Une autre hypothèse serait que les OPG sont impliqués dans la mise en conformation des protéines [59]. Cette hypothèse est corrélée au fait que l'opéron *opgGH* chez *E. coli* fait partie du régulon sigma E qui est induit par l'accumulation de protéines mal conformées dans le périplasma [60].

Enfin, l'hypothèse la plus récente est que les OPG seraient impliqués dans la signalisation cellulaire. La variation physico-chimique de l'environnement va être compliquée par la présence de la structure complexe de l'enveloppe. Le signal doit être transmis jusqu'au cytoplasme de la bactérie par l'intermédiaire de plusieurs molécules localisées dans différents compartiments de cette enveloppe. Les systèmes à deux composants sont les acteurs terminaux de la transmission du signal. Chez *E. coli*, l'absence des OPG perturbe les systèmes à deux composants EnvZ/OmpR [42] et RcsCDB [41]. Chez *D. dadantii*, les OPG contrôlent l'activation du système phosphorelais RcsCD-RcsB [61]. Les OPG pourraient enfin être un des intermédiaires nécessaires à la transmission du signal par certains systèmes à deux composants chez les bactéries à Gram négatif. Ces trois hypothèses ne sont pas incompatibles entre elles.

## 3. La perception de l'environnement par les systèmes à deux composants et les phosphorelais chez les entérobactéries

Les systèmes à deux composants et les phosphorelais sont la clef de la plasticité de l'expression des gènes en fonction des conditions environnementales. Nombre d'entre eux sont indispensables pour l'établissement de l'infection chez les bactéries pathogènes. Ils se composent d'au moins deux protéines dont les gènes sont généralement organisés en opéron [62]. Un capteur, souvent localisé dans la membrane cellulaire, perçoit un stimulus de l'environnement, ce qui entraîne son autophosphorylation sur un résidu histidine. Ce groupement phosphate est transmis

soit directement à un résidu aspartate du régulateur dans le cas des systèmes à deux composants, soit indirectement après une cascade de phosphorylation alternant résidus histidine et aspartate dans le cas des systèmes phosphorelais. Ce régulateur modulera alors l'expression des divers gènes cibles d'un régulon [62]. Ce régulon comprend l'ensemble des opérons dont les produits permettent de répondre au changement environnemental auquel la bactérie est confrontée. Une fine modulation de l'expression des gènes cibles s'effectue grâce à une fine modulation du ratio régulateur phosphorylé/régulateur non phosphorylé comme cela a été démontré pour EnvZ/OmpR chez *E. coli* [63] ou RcsCD/RcsB chez *Salmonella enterica* [64]. Cela nécessite donc aussi une modulation fine du ratio des activités kinase/phosphatase du capteur en fonction de l'intensité du stimulus perçu.

### 3.1 La structure des systèmes à deux composants

Le capteur et le régulateur se composent de différents domaines. Ces domaines adoptent différentes conformations dépendantes du stimulus, ou de la fixation d'un groupement phosphate.

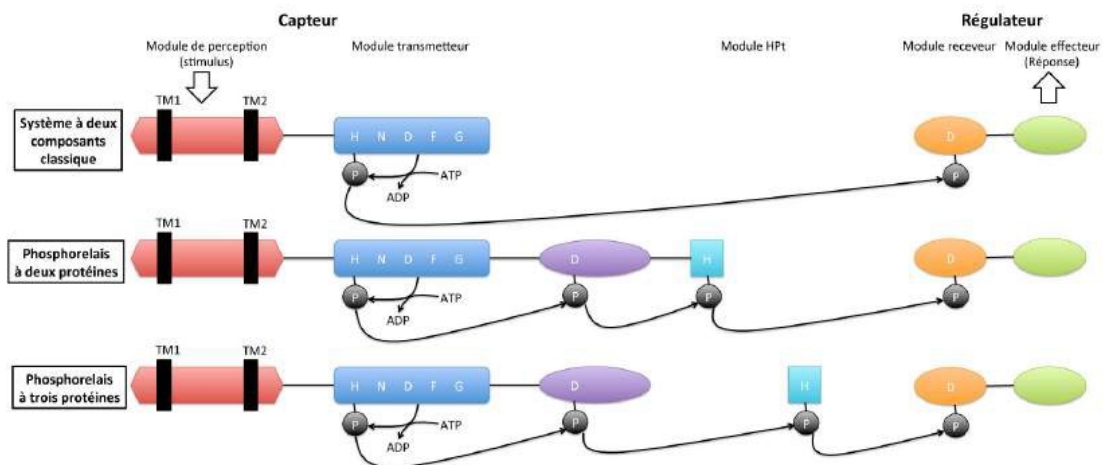


Figure 7 : Schéma de la transduction du signal par les systèmes à deux composants classiques et les phosphorelais.

#### 3.1.1 Le capteur

Le capteur, généralement transmembranaire, se compose toujours d'un domaine de perception du stimulus et d'un domaine transmetteur (Fig. 7). Le domaine de perception du stimulus contient deux domaines transmembranaires délimitant une boucle périplasmique qui percevrait le stimulus. Ce domaine est connecté à un domaine transmetteur bien conservé appelé domaine HAMP (Histidine kinases, Adenylylcyclases, Methylacceptingchemotaxisproteins and Phosphatases) [65]. Ce dernier se compose de six régions :

- la région H, contenant le résidu histidine phosphorylable, permet la dimérisation du capteur, indispensable à l'activité enzymatique (histidine kinase/phosphatase) et à la formation du site de phosphorylation ; les

régions N et D, liant respectivement des ions magnésium et l'ATP, forment le site catalytique ;

- la région F permet d'obstruer le site catalytique ;
- la région G est nécessaire au rapprochement du site catalytique (la kinase) et du site de phosphorylation du capteur [66].

Suite à l'hydrolyse de la molécule d'ATP au niveau du site catalytique, la molécule d'ADP produite induit un changement conformationnel de ce site catalytique aboutissant à sa désobstruction ainsi qu'à l'expulsion de la molécule d'ADP [67].

Certains capteurs comportent également des domaines PAS (Per, Arnt, Sim, nom des trois protéines où ce domaine a été identifié initialement). Ces domaines, impliqués dans l'interaction protéine/protéine, permettent la détection de différents signaux. Selon les capteurs, ce domaine est, soit périplasmique soit cytoplasmique, suggérant que le capteur peut percevoir des signaux cytoplasmiques également.

Dans le cas des phosphorelais, une cascade de phosphorylation offre d'avantage d'étapes dans le transfert du groupement phosphate permettant une intégration de signaux de régulation supplémentaires. Cette cascade mettant en jeu un domaine HPt peut avoir lieu soit sur la même protéine que celle contenant le domaine histidine kinase, soit sur une autre protéine transmembranaire ou cytoplasmique [65, 68, 69].

### 3.1.2 Le régulateur

Le régulateur se compose de deux domaines (Fig. 7). Du côté N-terminal, le domaine receveur contient environ 120 acides aminés. Ce domaine est globalement conservé et contient l'aspartate souvent localisé entre les acides aminés 50 et 55, cible de la phosphorylation. Au niveau de la poche de phosphorylation, deux acides aminés acides s'associent à un cation divalent et un résidu lysine va interagir avec la région histidine du capteur [70]. Le domaine effecteur, du côté C-terminal, est variable. Cette diversité assure la diversité des réponses cellulaires. Ce domaine contient une séquence Hélice-Tour-Hélice nécessaire à l'association du régulateur avec l'ADN au niveau de séquence consensus. Les deux domaines du régulateur sont reliés par une séquence de taille variable et qui contrôle le transfert d'information entre les deux modules [71].

### 3.1.3 Les protéines auxiliaires

L'activité des systèmes à deux composants peut être modulée par la présence de protéines auxiliaires [72]. Ces protéines peuvent être situées :

- au niveau cytoplasmique comme pour la protéine PII chez *E. coli*. Cette protéine contrôle l'activité du système NtrBC, système cytoplasmique, impliqué dans l'assimilation de l'azote. Lors d'une faible concentration d'azote, la protéine PII est uridyliée de manière réversible. La déuridylation

de cette protéine, conséquence d'une forte concentration d'azote, permet l'interaction de PII avec le capteur NtrB afin d'inhiber son autophosphorylation et activer l'activité phosphatase [73-76],

- au niveau de la membrane cellulaire comme la protéine IgaA qui réprime l'activité du système RcsCDB [77],
- au niveau du périplasma comme la protéine CpxP qui réprime le système CpxAR [78, 79],
- au niveau de la membrane externe comme les deux lipoprotéines RcsF ou NlpE qui activent respectivement les systèmes RcsCDB et CpxAR [80, 81].

### 3.2 Systèmes impliqués dans la réponse au stress (EnvZ-OmpR, CpxAR, RcsCDB)

La réponse au stress est une des clefs de l'adaptation à l'environnement chez les entérobactéries. Cette réponse passe par les systèmes EnvZ-OmpR, CpxAR et RcsCDB (Fig. 8).

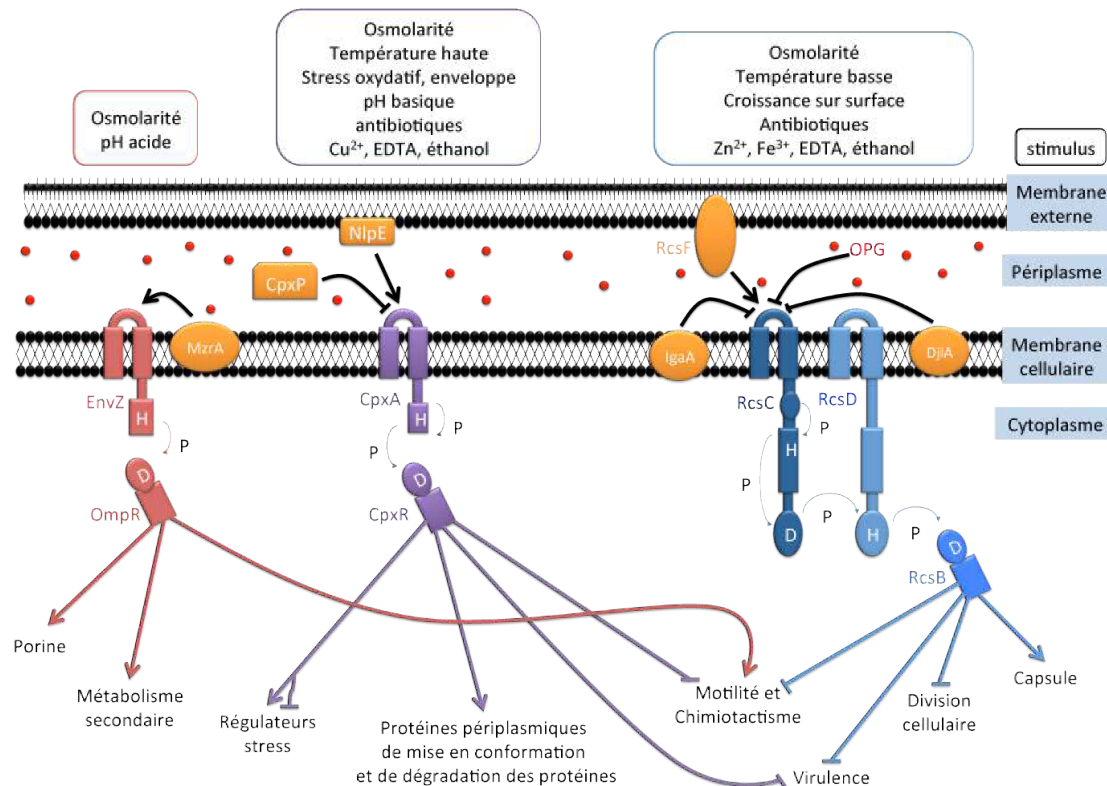


Figure 8 : Les trois systèmes à deux composants ou phosphorelais (EnvZ/OmpR en rouge, CpxAR en violet et RcsCDB en bleu) impliqués dans la réponse au stress et à l'osmolarité. Chaque capteur perçoit différents stimuli et la combinaison des différents régulateurs affectés par les régulateurs permet une réponse complexe. La réponse de ces systèmes peut être modulée par des protéines auxiliaires (en orange).

### 3.2.1 EnvZ/OmpR

Le système à deux composants EnvZ-OmpR est le paradigme des systèmes à deux composants. Suite à un stimulus, le capteur, un homodimère EnvZ, se transautophosphoryle sur le résidu histidine 243 et transfère son groupement phosphate sur le résidu aspartate 55 du régulateur OmpR (Outer Membrane Protein Regulator). Chez *E. coli*, ce système module l'expression des gènes *ompC* et *ompF* codant respectivement les porines OmpC et OmpF, module la synthèse des flagelles [82] et celle du biofilm [83] en réponse au changement d'osmolarité [84]. A faible osmolarité, le système est faiblement activé. OmpR est donc peu phosphorylé et se fixe sur les sites de forte affinité au niveau du gène *ompF* afin d'en activer l'expression (Fig. 9). L'augmentation de l'osmolarité permet le rapprochement des domaines alpha de l'homodimère d'EnvZ. Celui-ci s'autophosphoryle. Le domaine kinase de l'un des deux monomères va phosphoryler le domaine kinase du second monomère (Fig. 10) [85]. OmpR est donc fortement phosphorylé ce qui permet alors sa fixation sur les sites de faible et forte affinités de *ompF* afin de réprimer son expression et au niveau de site de faible affinité présent en amont du gène *ompC* pour son activation (Fig. 9) [86]. De plus, la présence d'une séquence consensus en amont du gène *ompF* permet une courbure de l'ADN favorisant la répression de ce dernier [63, 87-89]. Enfin, MicF (mRNA-interfering complementary RNA), un ARN non codant complémentaire de *ompF*, réprime la traduction d'*ompF*.

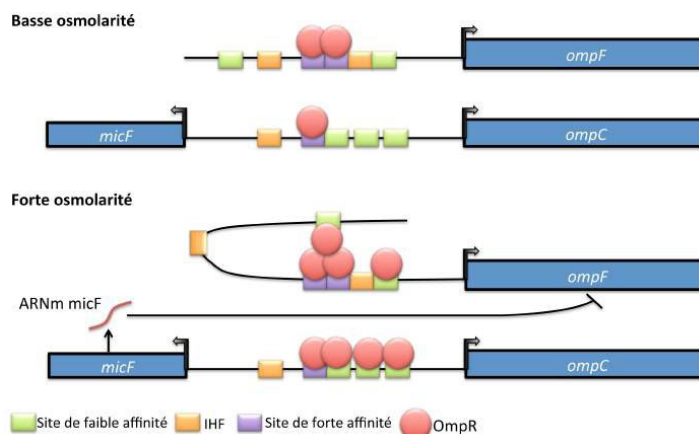


Figure 9 : Régulation de la transcription de *ompF* et *ompC* par OmpR. A basse osmolarité, OmpR-P se fixe sur les sites de forte affinité permettant ainsi l'expression du gène *ompF*. A haute osmolarité, OmpR-P se fixe sur les sites de forte et de faible affinité. Une boucle se forme en amont du gène *ompF*, conséquence de l'interaction OmpR---OmpR, provoquant une répression de *ompF*. A contrario, la transcription à partir du gène *ompC* est possible. Enfin, *micF* est exprimé en réponse d'un stress. Cet ARN anti-sens va se fixer à l'ARNm *ompF*, bloquant ainsi sa traduction.

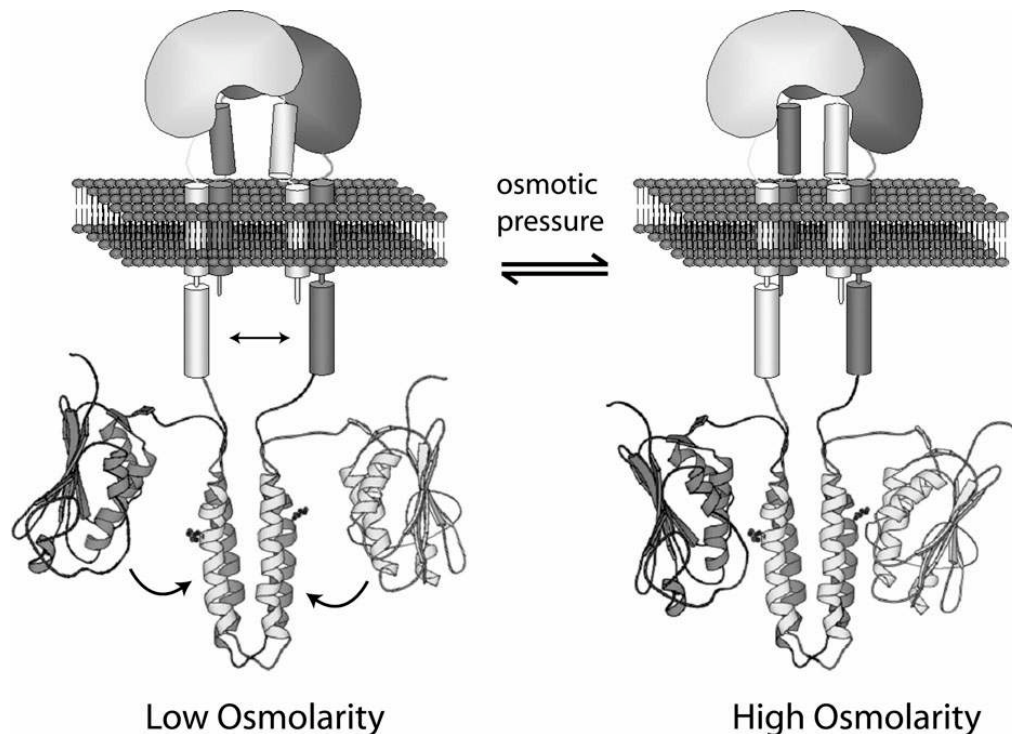


Figure 10 : Modèle d'activation du capteur EnvZ. Le domaine cytoplasmique maintient la structure dimérique d'EnvZ. Une haute osmolarité conduit au rapprochement des deux domaines alpha alors qu'une diminution de l'osmolarité provoque l'augmentation de la distance entre les deux domaines [85].

Ce système est complété par la présence de la protéine MzrA (Modulator of EnvZ and OmpR A). Cette protéine de la membrane cellulaire interagit avec la partie périplasmique d'EnvZ et module la capacité du capteur à percevoir les variations d'osmolarité (Fig. 8) [90, 91].

### 3.2.2 CpxAR

Le second système impliqué dans la perception du stress est le système CpxAR (Conjugative pilus expression) [92, 93]. Le capteur CpxA s'autophosphoryle sur le résidu histidine 248 et transfère son groupement phosphate au régulateur CpxR au niveau du résidu aspartate 51 (Fig. 8) [94]. Ce dernier régule une centaine d'opérons impliqués dans les processus de réponse au stress de l'enveloppe, de la motilité, de la formation du biofilm et de la virulence [95-97]. Ce système est activé par divers stimuli conduisant à un stress de l'enveloppe comme l'osmolarité, la présence d'antibiotique (Fig. 8) [98]. En sus des deux protéines CpxA et CpxR, ce système comporte également les protéines CpxP et NlpE. En absence de stimulus, CpxA présente majoritairement une activité phosphatase [99]. Dans ces conditions, CpxP, un régulateur négatif, est fixé au niveau de la boucle périplasmique de CpxA afin d'en restreindre l'activité [100]. En présence de protéines périplasmiques mal conformées, CpxP va se fixer à ces dernières pour qu'elles puissent être dégradées

par la protéase DegP, ce qui conduit par la même à sa dégradation [78, 100, 101]. De plus, un stress de l'enveloppe inhibe la synthèse de CpxP. CpxA peut alors s'autophosphoryler. La seconde protéine auxiliaire située sur la face intérieure de la membrane externe, NlpE (new lipoprotein E), découverte en 1995, est requise pour l'induction du système Cpx suite à l'adhésion de la bactérie à une surface hydrophobe [81, 97, 102].

### 3.2.3 RcsCDB

Le système Rcs (regulation of capsule synthesis) est un phosphorelais à trois protéines. Suite à un stimulus (variation de l'osmolarité [103]; perturbation de la membrane [41]), le capteur RcsC s'autosphoryle sur le résidu histidine 479. Ce groupement phosphate est transféré sur le résidu aspartate 875 de ce même capteur RcsC avant d'être transféré sur le résidu histidine 842 de la protéine transmembranaire RcsD afin de finir sur le résidu aspartate 56 du régulateur cytoplasmique RcsB (Fig. 8) [80]. Le régulon Rcs se compose de plus de cent cinquante gènes [104] impliqués aussi bien dans la division cellulaire [61, 105], la production d'exopolysaccharides, la motilité [61, 106, 107], l'ajustement du métabolisme en réponse au stress ou la virulence [108, 109].

A ces trois protéines s'ajoutent des cofacteurs à RcsB et des protéines auxiliaires comme RcsF, IgaA et DjlA (Fig. 8). RcsF est une lipoprotéine qui active le système Rcs en présence d'une forte concentration de  $Zn^{2+}$  ou une altération du LPS [109-111]. IgaA (Intracellular Growth Attenuator A) est un atténuateur du système Rcs [78, 106]. Il empêche l'accumulation d'une concentration trop importante de RcsB-P, concentration létale pour la bactérie. Cette protéine agirait par atténuation de l'autophosphorylation de RcsC [104]. Enfin DjlA réprimerait également l'activation du système Rcs [112].

Chez *E. coli*, RcsB peut soit être en homodimère soit en hétérodimère avec des protéines comme RcsA, GadE ou BglJ [109, 113, 114]. Ces cofacteurs ne sont pas toujours retrouvés chez les autres entérobactéries. Ces cofacteurs vont moduler l'affinité pour les régions régulatrices de certains gènes du régulon.

Les gènes *rcsD*, *rcsB* et *rcsC* sont localisés sur un même locus. Le gène *rcsC* est transcrit de manière convergente à l'opéron *rcsDB* (Fig. 11A). Lors d'une activation du système Rcs, les gènes de l'opéron *rcsDB* sont transcrits majoritairement à partir du promoteur situé en amont du gène *rcsD* (Fig. 11B). Lorsqu'une concentration seuil de la protéine RcsB est atteinte, la transcription de l'opéron *rcsDB* à partir du promoteur en amont du gène *rcsD* est réprimée. L'expression du gène *rcsB* est cependant maintenue à faible niveau à partir d'un promoteur secondaire situé dans la phase codante de *rcsD*. Cette autorégulation négative a été décrite chez *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* [115].



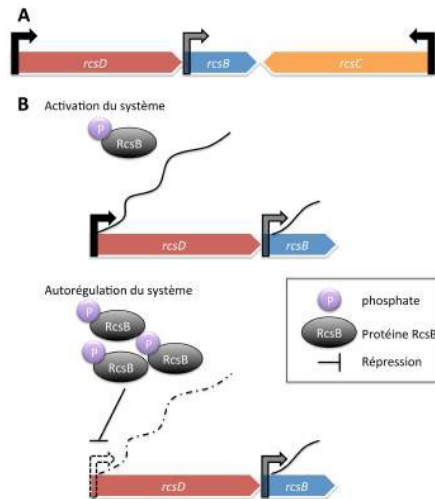


Figure 11 : Modèle d'autorégulation négative du système Rcs. A) Le locus RcsCBD se compose du gène *rcsC* et de l'opéron *rcsDB*. B) Lorsque le système est activé, la protéine RcsB est phosphorylée. L'expression de l'opéron *rcsDB* est essentiellement réalisée à partir du promoteur de *rcsD*. Lorsque la concentration en RcsB phosphorylé atteint un seuil, le promoteur en amont de l'opéron est réprimé et l'expression ne se fait qu'à partir du promoteur de *rcsB*.

### 3.3 Systèmes impliqués dans la virulence (PhoPQ, HrpXY, GacAS, PmrAR)

En complément des trois systèmes précédents qui interviennent également dans la virulence, quatre systèmes sont plus particulièrement impliqués dans la virulence.

#### 3.3.1 PhoPQ

En 1989, Fields *et al.* montrèrent qu'une mutation chez *Salmonella enterica* dans l'opéron *phoQP* conduit à une très forte diminution de la virulence chez la souris [116]. Ce système est particulièrement impliqué dans la perception du  $Mg^{2+}$  extracellulaire. En effet, une faible concentration dans ce cation divalent conduit à une activation du capteur PhoQ qui va s'autophosphoryler sur le résidu histidine 277 et transférer son groupement phosphate sur le résidu aspartate 51 du régulateur cytoplasmique PhoP [117, 118]. Ainsi, le régulateur phosphorylé va pouvoir moduler l'expression des gènes *pag* (PhoP activated genes) et des gènes *prg* (PhoP repressed genes). Le régulon comporte des gènes impliqués dans le transport du magnésium, la résistance aux acides ainsi que l'expression de l'opéron *pmrAB* conduisant à des modifications du LPS (Fig. 12) [119]. PhoQ peut également percevoir la concentration  $Ca^{+2}$  [120].

Chez *Dickeya dadantii*, l'inactivation de ce système rend la bactérie moins résistante au pH acide, plus sensible au stress des peptides antimicrobiens et affecte la virulence en diminuant notamment l'expression des enzymes de dégradation de la paroi végétale [121-123].

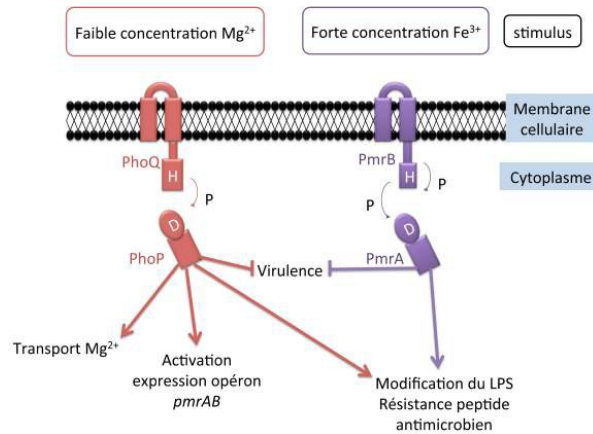


Figure 12: Les systèmes à deux composants PhoQP et PmrAB.

### 3.3.2 PmrAB

Le système PmrAB, également annoté BasSR (bacterial adaptive response, sensor-kinase) chez *E. coli*, est impliqué dans la virulence chez *Salmonella*. Suite à un excès de  $Fe^{3+}$  ou de  $Zn^{2+}$ , le capteur PmrB va s'autophosphoryler sur le résidu histidine 152 et transférer ce groupement phosphate sur le résidu aspartate 51 du régulateur PmrA (Fig. 12) [124-126]. Le régulateur PmrA ainsi phosphorylé active l'expression des gènes impliqués dans la résistance à la polymyxine B par modification du LPS. Les modifications du LPS lui confèrent une charge positive qui va ainsi éloigner les ions  $Fe^{3+}$  et repousser les peptides antimicrobiens cationiques [127]. Chez *Erwinia carotovora*, le système PmrAB est nécessaire à la survie de la bactérie *in planta* [128].

### 3.3.3 GacSA

Impliqué dans la colonisation du tractus urinaire chez *E. coli* [129, 130], dans l'infection par *P. aeruginosa* chez les patients atteint par la mucoviscidose [131] ou dans le bon déroulement de la pathogénèse chez *D. dadantii* [132], le système à deux composants GacS-GacA (également appelé BarA-UvrY chez *E. coli*) est un système phosphorelais retrouvé chez la plupart des bactéries à Gram négatif. Suite à un stimulus tel que la présence des acides carboxyliques (Formate, acétate, propionate) [133], le capteur GacS s'autophosphoryle sur le résidu histidine 302 puis ce groupement phosphate est transféré sur le résidu aspartate 718 et histidine 861 avant d'être transféré sur le résidu aspartate 54 du régulateur cytoplasmique GacA (Fig. 13) [134, 135]. Ce système est impliqué dans la régulation du métabolisme secondaire, de nombreux facteurs de virulence et des capteurs de quorum [136, 137]. Il est également impliqué dans la régulation de l'expression d'exoenzymes extracellulaires de dégradation de la paroi des cellules végétales chez *Erwinia carotovora* [138] ou *Dickeya dadantii* [132] ou dans la formation du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* [139, 140]. Plusieurs études montrent un rôle dans la

régulation de l'expression du gène *rpoS*. Ce gène est induit par GacA à l'entrée de la phase stationnaire chez *P. aeruginosa* et *A. vinelandii* [141, 142] mais pas chez *E. coli* [143]. Chez cette bactérie, BarA semble nécessaire pour l'induction de *rpoS* pendant la phase exponentielle [144]. Enfin, GacSA est un acteur de la voie Rsm. Les ARN non codants *rsmZ*, *rsmY*, *csrC*, *csrB* chez *P. aeruginosa* et *rsmB* chez *D. dadantii* sont impliqués dans la régulation du régulon avec la protéine RsmA. L'association de cette protéine, répresseur, avec un de ces ARN régulateur abolit la répression et permet la régulation du métabolisme secondaire, de la formation de biofilm chez les espèces du genre *Pseudomonas* et chez *E. carotovora*, de la synthèse d'harpines chez *D. dadantii*, de la synthèse du système de sécrétion de type III chez les espèces du genre *Pseudomonas*, de la motilité et de la virulence chez *D. dadantii*, chez *E. carotovora* et les *Pseudomonas* (Fig. 13) [145-147].

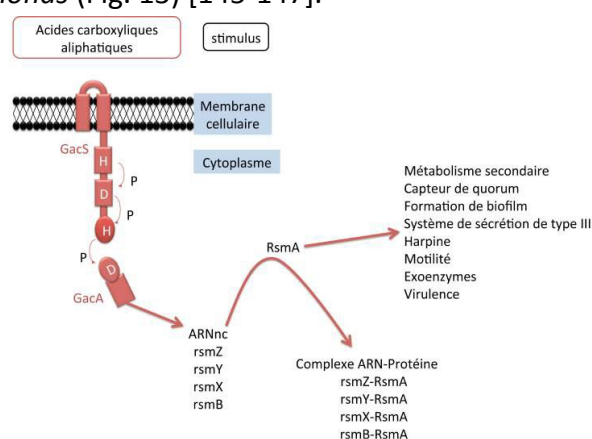


Figure 13 : Le phosphorelais GacSA est activé en présence d'acides carboxyliques aliphatiques. Son activation va permettre la synthèse d'ARN non codant qui vont aller séquestrer la protéine RsmA et ainsi lever la répression exercée par cette dernière ou nuire à l'activation de certains processus cellulaires

### 3.3.4 HrpXY

Le système à deux composants HrpXY est retrouvé uniquement chez les phytopathogènes. Suite à l'induction par des conditions physico-chimiques proches de celle de l'apoplaste (faible concentration en carbone, faible concentration en azote, pH acide [148, 149]) chez *Erwinia amylovora* ou par de l'acide p-coumarique chez *Dickeya dadantii* [150], le capteur HrpX s'autophosphoryle sur un résidu histidine puis transfère son groupement phosphate sur le résidu aspartate du régulateur cytoplasmique HrpY (Fig. 14B) [148]. HrpY ainsi phosphorylé va permettre l'expression de 16 gènes *hrp* chez *D. dadantii* [151] tel que l'harpine, *hrpN*, le premier éliciteur de la défense de la plante chez *D. dadantii* ou de *hrpS*, qui va activer l'expression du gène *hrpL* codant un facteur sigma alternative nécessaire à l'expression d'autres gènes *hrp* aussi bien chez *E. amylovora* que chez *P. syringae* [148, 152]. Les gènes *hrp* (Hypersensitive Response and Pathogenicity) [153] sont regroupés en cluster (Fig. 14A). Le terme Hrp fait référence au besoin des

phytopathogènes d’avoir un système de sécrétion de type III (T3SS) et des effecteurs adéquats pour provoquer soit une réponse hypersensible (réaction rapide et localisée de mort cellulaire) dans le cas des plantes non-hôtes soit la maladie dans le cas des plantes hôtes [154]. Même si le T3SS et ses effecteurs ne sont pas uniquement l’apanage des phytopathogènes, le mécanisme décrit ici n’est valable que chez les phytopathogènes.

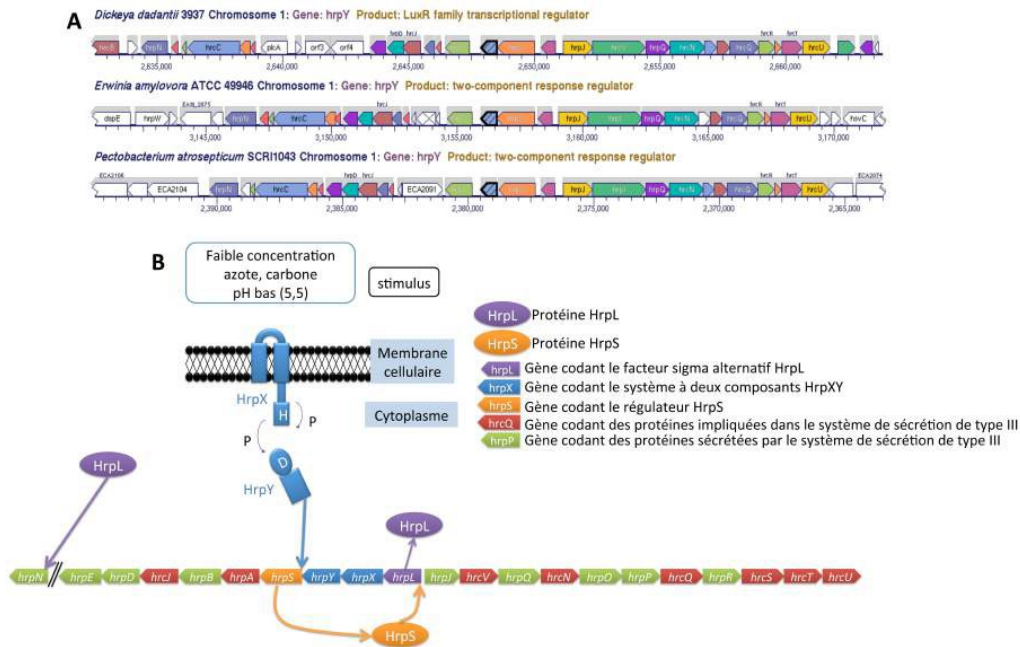


Figure 14 : Système à deux composants HrpXY. A) Cluster des gènes *hrp* chez trois phytopathogènes *Erwinia amylovora*, *Dickeya dadantii* et *Pectobacterium atrosepticum* généré par le site Biocyc.org [155]. La synténie de ce cluster est conservée chez les trois espèces. B) Modèle d’activation du système HrpXY et de la régulation des gènes impliqués dans le système de sécrétion de type III et les protéines sécrétées par ce dernier. Le régulateur HrpY phosphorylé va activer la synthèse de plusieurs gènes *hrp* et en particulier de *hrpS*. La protéine HrpS ira activer la transcription du gène *hrpL* ce dernier codant un facteur sigma alternatif qui activera la synthèse de gènes du cluster.

### 3.4 Systèmes impliqués dans le métabolisme (NarLX, ArcAB)

D’autres systèmes à deux composants nécessaires à l’adaptation de la bactérie aux conditions environnementales sont impliqués dans un large éventail de fonctions notamment le métabolisme comme NarLX et ArcAB. ArcAB (Anoxic redox control) perçoit et régule des gènes impliqués dans la respiration aérobie et la fermentation (Fig. 15) [156-159]. Régulant la respiration anaérobie du nitrate, le système NarLX (Nitrate/Nitrite response regulator NarL) est activé par de fortes concentrations en nitrate [160] et, dans ces conditions, active les gènes nécessaires à la respiration par le nitrate et réprime les gènes impliqués dans la fermentation (Fig. 15) [161].

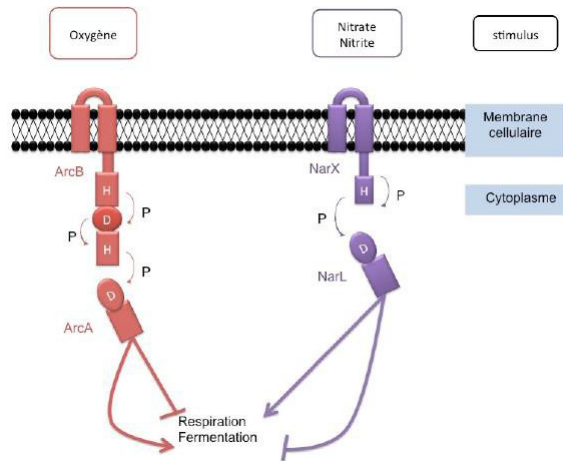


Figure 15 : Les deux systèmes à deux composants impliqués dans la régulation du métabolisme : ArcBA (en rouge), NarXL (en violet) et les processus cellulaires qu'ils régulent.

### 3.5 Système simple, système complexe : courbe de réponse

Suite à une analyse en fonction du nombre d'étapes dans le transfert du groupement phosphate, des paramètres biochimiques des réactions, la différence entre système qualifié de simple (système à deux composants) et système qualifié de complexe (phosphorelais) est le fruit d'une réponse différentielle dans son intensité. Un système simple répond proportionnellement à des signaux de faible intensité qui se traduit par une hyperbole (Fig. 16). A contrario, un système complexe ne perçoit pas les signaux de faible intensité, assimilés à un bruit de fond, mais répond à un vrai signal d'intensité plus grande ce qui se traduit par une sigmoïde. Cette dichotomie permet d'éviter une réponse couteuse face à des pseudo situations de stress [162].

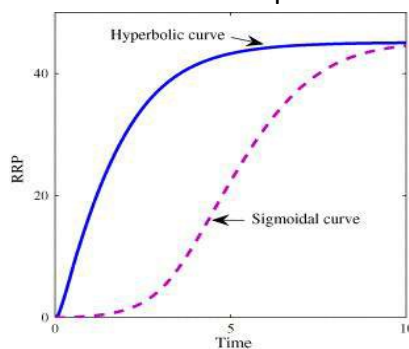


Figure 16 : Courbe de réponse des systèmes simples (hyperbole) et complexes (sigmoïde) (Kim et Cho, 2006 [162]).

### 3.6 Evolution des systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont retrouvés chez les bactéries mais également chez les champignons, les amibes et les plantes supérieurs [163, 164]. A ce jour, aucun système à deux composants n'a pu être identifié chez les animaux [67]. Le séquençage d'un grand nombre de génomes bactériens a permis de montrer que toutes les bactéries, excepté *Mycoplasma genitalum*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasme pulmosis*, possèdent des systèmes à deux composants. Les bactéries

ayant peu de systèmes à deux composants, comme *Helicobacter pylori* et ses 4 systèmes, colonisent un nombre limité d'écosystèmes, alors que les bactéries colonisant un grand nombre d'écosystèmes comme *D. dadantii* possèdent d'avantage de systèmes à deux composants, trente-deux systèmes pour notre exemple (Fig. 17) [165]. En général, 1 à 2% du génome des bactéries correspond aux systèmes à deux composants, montrant ainsi leur importance physiologique.

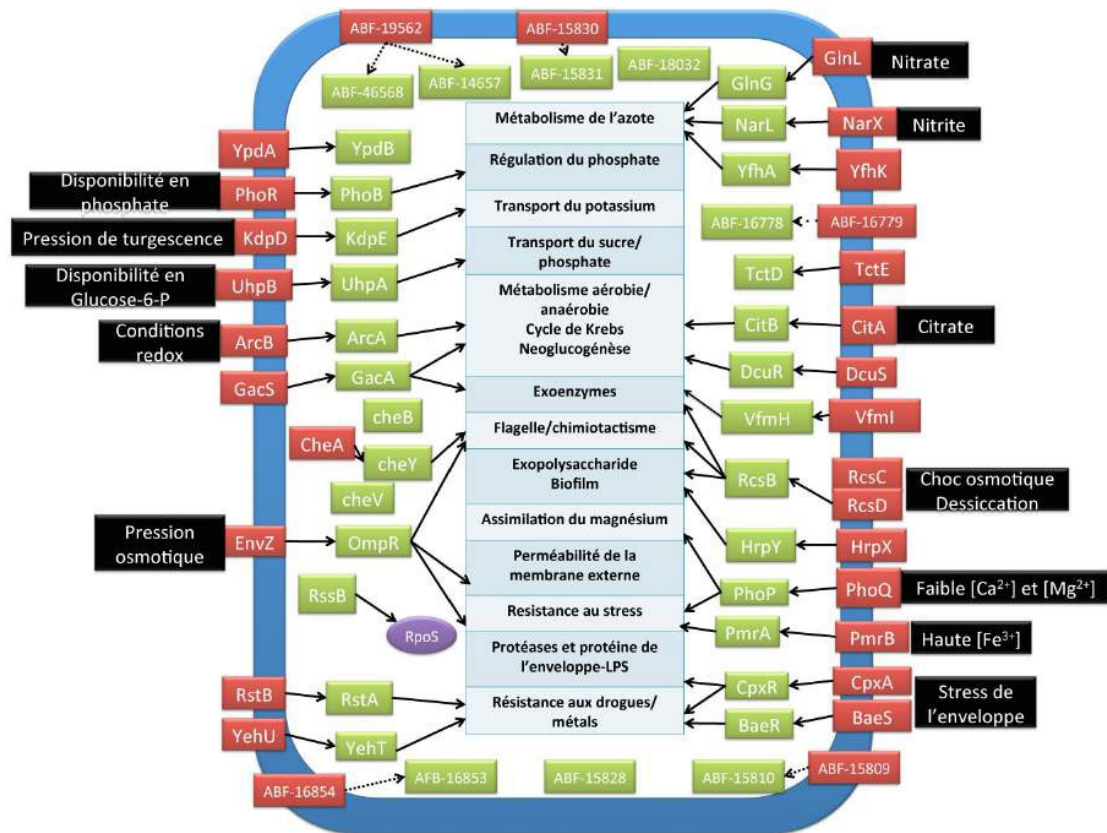


Figure 17 : Schéma des systèmes à deux composants chez *D. dadantii* et leurs rôles. En rouge, les capteurs. En vert, les régulateurs. En noir, les stimuli connus.

Certains régulateurs peuvent être activés indépendamment de leur capteur *ad hoc*. Les phénomènes de cross-talk rapportés n'ont jamais été observés *in vivo* sans que le capteur ou le régulateur ait été inactivé [166-168]. Ces résultats suggèrent que le phénomène de cross-talk est très limité et la spécificité du capteur pour son régulateur en est la cause.

Les systèmes à deux composants sont apparus après duplication, dans la bactérie ancestrale, de deux voies de régulation identique. De nombreuses mutations au niveau de sites spécifiques permettent l'émergence de deux systèmes indépendants et mettent fin au cross-talk initial (Fig. 18). *In vivo*, le cross-talk est observé chez les mutants [167]. L'acétyl phosphate semble également pouvoir fournir spontanément

un groupement phosphate de façon non enzymatique au régulateur. Ce mode d'activation du régulateur semble être physiologiquement actif.

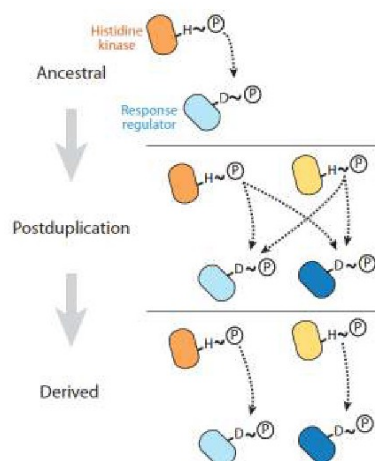


Figure 18 : Schéma des étapes majeures permettant l'émergence de systèmes indépendants à partir d'un seul système dans la bactérie ancestrale. La duplication d'un système conduit à l'apparition de deux systèmes identiques donnant lieu à des événements de cross-talk. Des mutations dans des sites spécifiques permettent de différencier les systèmes et mettent fin au cross-talk entre ces systèmes (Capra et Laub, 2012 [165]).

Enfin, les régulons de chaque système à deux composants varient d'une espèce bactérienne à l'autre. Chaque système offre ainsi une réponse globale à chaque stress. Des modèles récents proposent que chaque stress ne serait pas perçu par un seul système mais par la réponse combinée de différents régulons [169]. Chez l'être humain, quatre cents récepteurs permettent de percevoir jusqu'à dix mille odeurs [170, 171]. Cette richesse de perception n'est permise que par la combinaison des différents récepteurs. A ce titre, les systèmes à deux composants pourraient percevoir de manière combinée l'environnement et ainsi offrir une réponse aux différents stimuli afin de coloniser les différentes niches écologiques [169].

#### 4. Un modèle d'étude du rôle des OPG : *Dickeya dadantii*

Les premières études concernant la biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés ont été principalement réalisées chez la bactérie *Escherichia coli* K12. Les nombreux avantages de cette bactérie modèle ne sont plus à décrire. Cependant, chez *E. coli* K12, le mutant *opgG* ne présente que peu de différences de phénotype (mucosité accrue, diminution de la motilité) mais aussi n'incluait pas un phénotype majeur de l'absence d'OPG : la perte de virulence. Aussi il était devenu indispensable de trouver un nouveau modèle afin de comprendre le rôle biologique de ces glucanes. C'est dans cette optique que *D. dadantii* fut choisie comme modèle de compréhension des OPG. Cette bactérie présente de nombreux avantages, allant

de la facilité à la cultiver, à la possibilité de réaliser des études génétiques. De plus, cette bactérie est une phytopathogène dont les processus de virulence ont été bien étudiés et infecte des hôtes peu onéreux.

#### 4.1 Taxonomie des *Erwiniae*

Initialement, *Dickeya dadantii* (anciennement *Erwinia chrysanthemi*) fut classée dans le genre *Erwinia* de la famille des entérobacteriaceae. Erwin F. Smith, phytobactériologiste, a fondé en 1920 ce genre dans lequel devaient être réunies toutes les bactéries phytopathogènes à Gram négatif, en forme de bacille, anaérobies facultatives et mobiles [172]. Dye proposa de séparer le genre *Erwinia* en 4 groupes : les bactéries provoquant une nécrose, les bactéries pectinolytiques, les *Erwiniae* à pigment jaune et les *Erwiniae* atypiques. Plus récemment, l'étude de séquences d'ADNr 16S de différents membres du genre a permis de répartir les *Erwiniae* en 4 genres [173, 174]:

- le genre *Erwinia* contenant les nécrotiques comme *Erwinia amylovora* ;
- Le genre *Pectobacterium* contenant les pectinolytiques comme *Erwinia chrysanthemi* ;
- le genre *Brenneria* contenant les espèces provoquant des maladies affectant les arbres comme *Erwinia alni* ;
- le genre *Pantoea* fondé en 1989 comprend les *Erwiniae* à pigment jaune comme *Erwinia herbicola*.

Dernièrement, une étude de différentes séquences nucléotidiques a amené Samson *et al.* [175] à renommer *Erwinia chrysanthemi* en *Dickeya dadantii*. De plus, cette étude associée à d'autres études de comparaison de séquences nucléiques suggère fortement que *Dickeya dadantii* serait proche du genre *Yersinia*.

#### 4.2 Distribution géographique

*D. dadantii* est une bactérie tropicale à large spectre d'hôte. Selon l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes, cette bactérie est présente dans toutes les régions du monde [176]. Depuis le début de ce siècle, les cultures de pomme de terre et d'endive dans les régions nord de la France sont touchées par la maladie de la pourriture causée par *D. dadantii* [177]. L'émergence de cette bactérie en milieu tempéré est surprenante pour cette bactérie tropicale. Les méthodes d'élimination étant limitées, cette bactérie a été inscrite sur la liste des organismes phytopathogènes de quarantaine.

Principalement rencontrée dans les sols, *D. dadantii* est une saprophyte qui, suite à une blessure à la surface des plantes, devient pathogène. Il est à noter que *D. dadantii* est capable d'infecter le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* [178-180]. Cet hôte est un vecteur de la maladie mais également un hôte alternatif [181].



Plus récemment deux études suggèrent que *D. dadantii* pourrait être un déterminant important dans la prolifération de bactérie pathogène de l'homme comme *S. enterica* ou *E. coli* O157 :H7 à la surface de feuille de laitue [182, 183].

### 4.3 Un pouvoir pathogène multifactoriel

Le pouvoir pathogène de *D. dadantii* est multifactoriel et repose sur un complexe réseau de capteurs des variations environnementales, de régulateurs et de facteurs de virulence. Etant les plus étudiés, seuls les processus de la pathogénèse *in planta* seront présentés.

#### 4.3.1 La paroi végétale et les enzymes de dégradations

Avant de poursuivre sur les mécanismes de la virulence, regardons de plus près la paroi des cellules végétales. Cette paroi est un élément fondamental qui offre une structure à la cellule végétale et confère la rigidité du tissu végétal. La paroi des cellules végétales se compose (Fig. 19) :

- de la paroi primaire composée de fibre d'hémicelluloses et de celluloses scellés par de la pectine, le tout rendu agréablement embelli de protéines [184];
- de la paroi secondaire composée des éléments précédents enrichie de lignine;
- de la lamelle médiane composée de pectine.

Cette paroi est une structure dynamique dont la paroi primaire produite à partir de la lamelle moyenne vers la membrane plasmique assure le rôle de squelette et assure une plasticité à l'ensemble afin de permettre la croissance et la division des cellules (Fig. 19). La paroi secondaire développée à partir de la paroi primaire vers la membrane plasmique de la cellule est rigide et ne permet plus la croissance des cellules. Enfin la lamelle médiane est située entre deux cellules voisines et permet la cohésion des tissus.

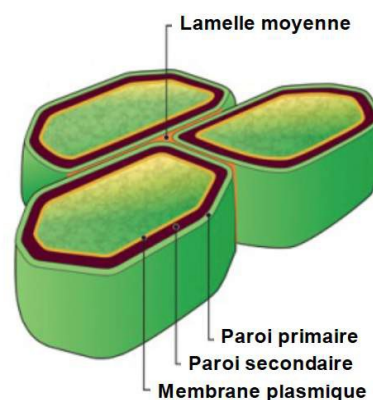


Figure 19 : Structure de la paroi des cellules végétales

La pectine ou acide polygalacturonique (PGA) est un hétéropolysaccharide complexe qui se compose d'homogalacturonate entre-coupé de rhamnogalacturonate de type I et de type II. Cette pectine est connectée à la cellulose, un polymère linéaire de résidus de glucose, par l'hémicellulose composée de celluloses ramifiées par du xylose, du galactose, du fucose et de l'arabinose.

#### 4.3.2 La dégradation de la paroi végétale

La complexité de la paroi végétale oblige la bactérie à une action combinée de plusieurs protéines pour une dégradation efficace (Fig. 20).

L'arsenal de *D. dadantii* comporte tout d'abord des enzymes qui sont sécrétées:

- des pectines estérases (PemA, PaeY) et des dépolymérase (PelA à E, PelI, PelL et PelZ) qui vont dégrader la pectine pour former des oligomères [185-187];
- une cellulase (CelV ou CelZ) qui va dégrader la cellulose des parois primaire et secondaire [188, 189];
- des protéases (PrtA à G) qui dégradent les protéines [190].

Les pectinases et la cellulase sont sécrétées par le système de sécrétion de type II ou système Out. Les protéases par le système de sécrétion de type I.

Les oligomères sont ensuite transportés dans le périplasme par les porines KdgM et KdgN [191, 192]. Ces derniers sont digérés en digalacturonates par un set de pectinases périplasmiques (PemB, PaeX, PelX, PehV, PehW, PehX) [193-196]. Une seconde cellulase est également retrouvée dans le périplasme CelY [197].

Enfin, les digalacturonates passent dans le cytoplasme par des transporteurs TogMNAB, TogT, ExuT et KdgT [198, 199] pour donner, *in fine*, suite à l'action de dernières pectinases cytoplasmiques (PelW, Ogl [194]) des monomères : le galacturonate et le 5-céto-4-désoxyuronate (DKI) [185, 199].

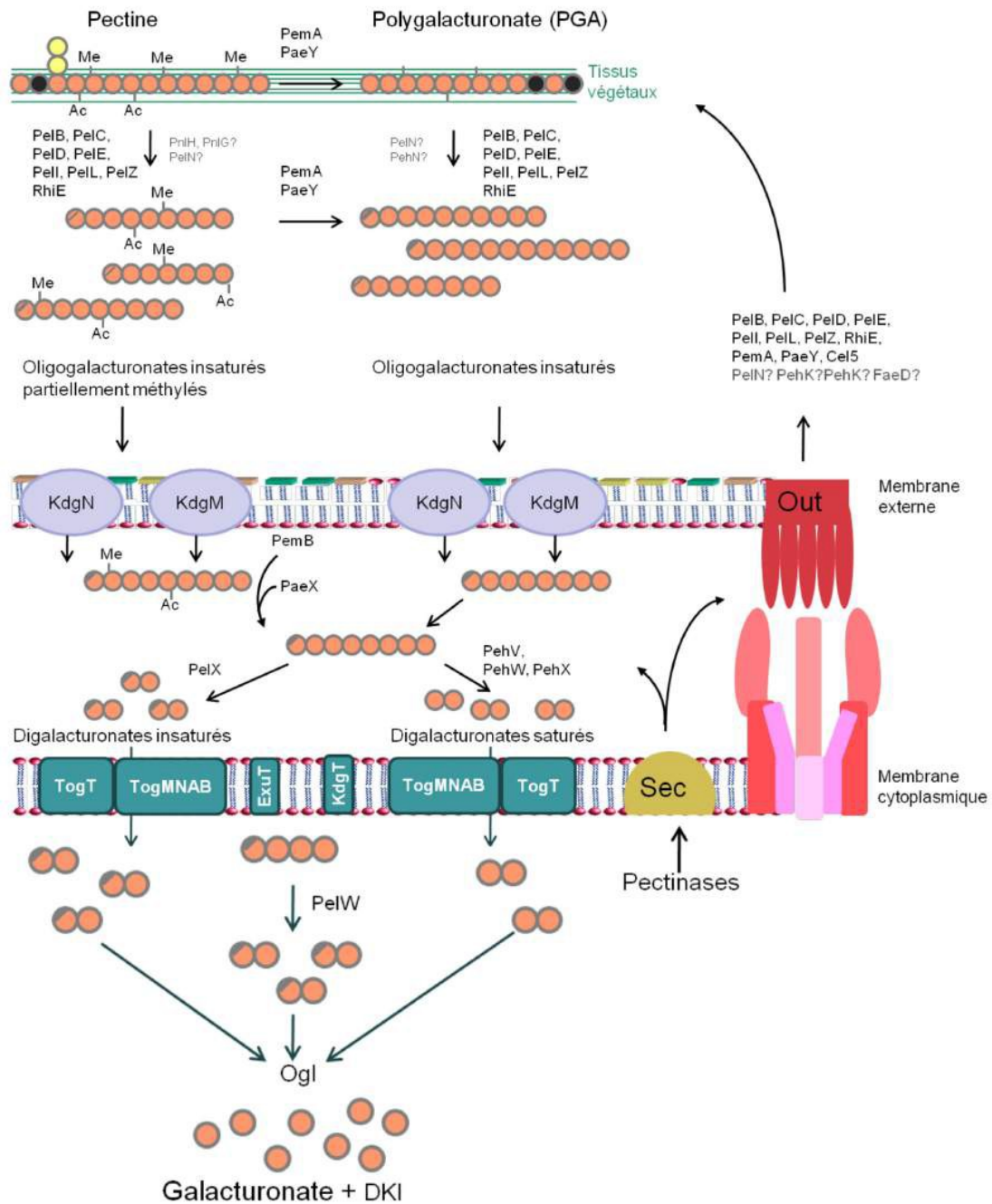


Figure 20 : Dégradation et assimilation de la pectine. Les pectinases sont sécrétées par le système de sécrétion de type II (Out) afin de dégrader la pectine. Les dérivés sont assimilés dans la cellule où ils vont subir d'autres dégradations. Le galacturonate et le DKI (5-céto-4-désoxyuronate) vont être intégré au métabolisme. Les sphères oranges représentent le galacturonate, les noires le rhamnose et les jaunes l'arabinose (M. Lallemand [200]).

## 4.4 Régulation de la pathogenèse

Cette dégradation repose sur une régulation complexe des facteurs de la pathogenèse.

### 4.4.1 Les régulateurs

#### 4.4.1.1 KdgR

KdgR réprime la synthèse des pectinases [201]. La répression est levée en présence de 2-céto-3-désoxygluconate (KDG), produit de dégradation de la pectine [201].

#### 4.4.1.2 PecS

PecS réprime l'expression de nombreux gènes incluant ceux codant des exoenzymes, ceux codant leur système spécifique de sécrétion et ceux codant les enzymes de la voie de biosynthèse de l'indigoïdine, un pigment bleu participant à la résistance aux stress oxydatifs [202, 203]. Dans une souche *pecS*, les gènes *pel* codant les pectinases, le gène *celZ* codant une cellulase, les gènes *out* codant leur système de sécrétion de type II et les gènes *prt* codant des protéases extracellulaires sont dérprimés [204]. Par contre, la synthèse du gène *hrpN* est fortement réprimée [204]. HrpN, une harpine, est le premier éliciteur des défenses de la plante. Les harpines sont des protéines riches en glycine qui participent à l'induction de la réponse hypersensible et à l'adhésion cellule-cellule dans le biofilm [204].

#### 4.4.1.3 PecT

PecT est un répresseur de la motilité et de la sécrétion des exoenzymes [205].

### 4.4.2 Les conditions physico-chimiques

D'autres facteurs affectent la synthèse des pectinases. Une forte osmolarité induit la synthèse des *pel* [206-208]. De même la température optimale de synthèse de ces gènes est à 30°C [185].

Au cours de l'infection, *D. dadantii* rencontre différents pH. Lors des étapes précoces, au niveau du fluide intercellulaire de l'apoplaste, la bactérie baigne dans un milieu à pH 5 / 6,5 puis la lyse des cellules conduit à une alcalinisation du milieu. Ces différents pH permettent de réguler les gènes *pel* différenciellement. Ainsi certains gènes sont exprimés en condition acide et d'autre en condition basique [209].

Les carences en fer, en oxygène, en azote ont un impact sur la virulence. La carence en fer induit la synthèse des gènes *pel* suite à la levée de la répression par le répresseur Fur (ferric uptake regulation) [210, 211]. Un environnement anaérobie conduit à un développement plus sévère de la maladie [212]. L'absence d'azote conduit également à une inhibition de la synthèse des pectinases [207, 208].

Ainsi, ces caractéristiques physico-chimiques qui traduisent l'arrivée de la bactérie dans la plante sont mises à profit pour réguler finement quantitativement et temporellement l'expression des gènes nécessaires à la réussite de l'infection.

#### 4.4.3 La répression catabolique

En présence de glucose, la bactérie va utiliser préférentiellement le glucose. La synthèse des gènes impliqués dans le catabolisme est réprimée par le régulateur CRP ou CAP excepté ceux du catabolisme du glucose. En présence de glucose, la concentration en AMPc diminue. En absence de glucose, l'adénylatecyclase produit de l'AMPc qui se complexe avec la protéine CRP. Ce complexe actif pourra alors se fixer au niveau de site consensus permettant ainsi l'expression de ces gènes comme les gènes *pel* [185, 213].

#### 4.4.4 La régulation par la densité cellulaire

Initialement, découvert chez *Vibrio fischeri*, le système repose sur une petite molécule diffusible acyl-homosérine lactone synthétisée par une protéine de type LuxI et sur un activateur transcriptionnel de type LuxR qui se fixe sur les boîtes lux situées en amont du promoteur des gènes cibles lorsque la concentration de l'acyl-homosérinelactone atteint une concentration seuil.

Chez *D. dadantii*, deux gènes homologues à *luxI* et *luxR* ont été identifiés et nommés *expl* et *expR* [214]. *Expl* catalyse la synthèse de deux acyl-homosérine lactones. Ce système régule certaines pectinases comme *pelA* et *pelB* sans toutefois affecter l'activité générale des pectinases [214-216]. Récemment, un nouveau capteur de quorum a été identifié : le système Vfm (virulence factor modulator). Ce dernier régule la synthèse des exoenzymes [217].

#### 4.4.5 Modèle général de la régulation de la pathogénèse

L'ensemble des études sur les régulateurs, leurs relations a permis d'établir un schéma global de la virulence de *D. dadantii* (Fig. 21).

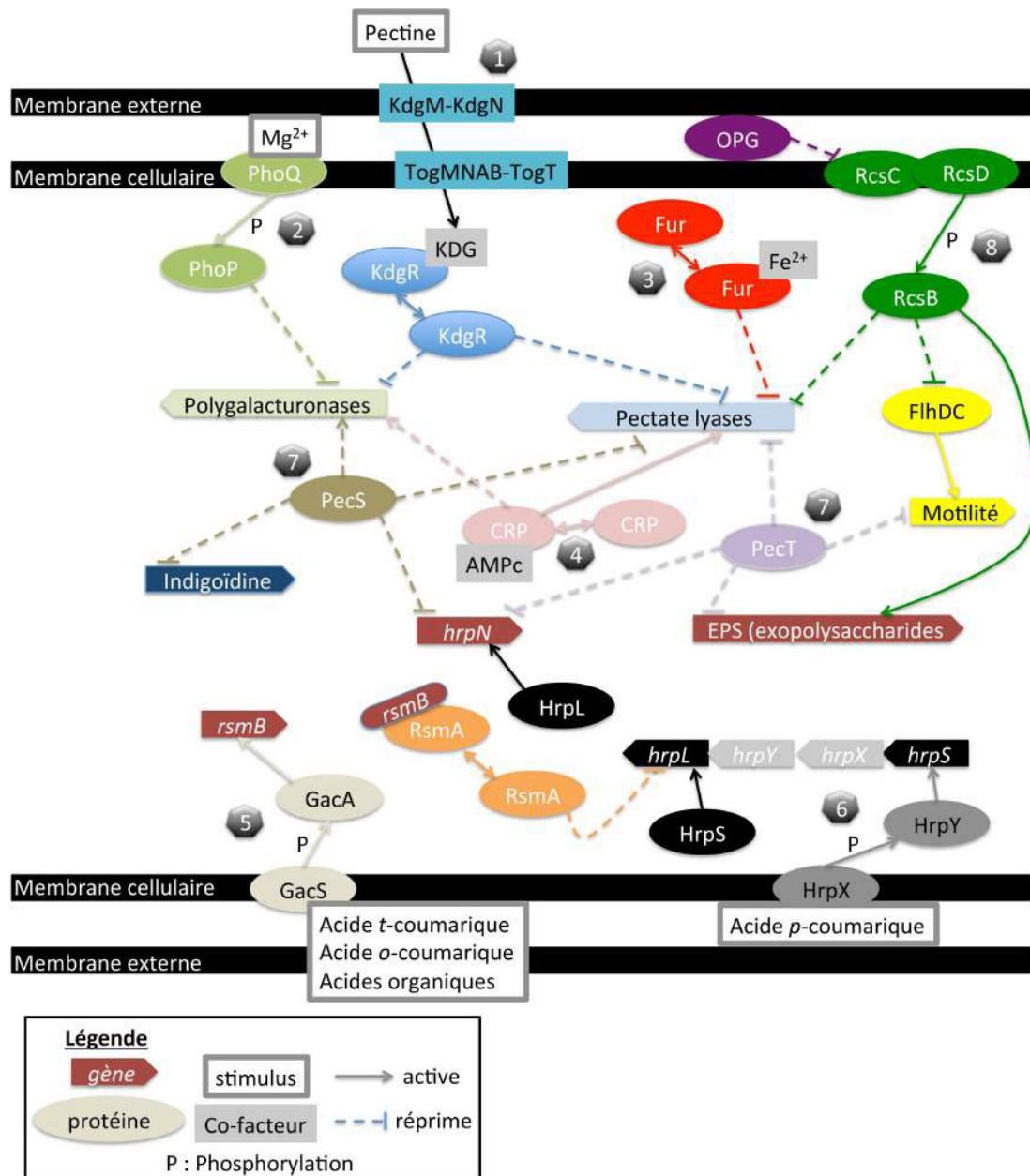


Figure 21 : Schéma général de la virulence chez *Dickeya dadantii*. (1) La pectine est dégradée et importée dans le cytoplasme par des transporteurs (KdgM-KdgN et TogMNAB-TogT). Le KDG (2-céto-3-déoxygluconate), produit de cette dégradation, permet de lever la répression exercée par KdgR sur les gènes codant des pectinases (gènes *pel*). (2) Une faible concentration en magnésium active le système à deux composants PhoPQ ce qui conduit à une répression de la synthèse des gènes *pel*. (3) Le régulateur Fur est complexé à l'ion  $Fe^{2+}$ . La faible concentration en cet ion ferreux dans l'apoplaste provoque une dissociation du complexe Fur- $Fe^{2+}$  permettant ainsi la levée de la répression exercée par ce dernier. (4) L'AMPc, produit par l'adénylatecyclase, conséquence de la faible quantité de glucose dans l'environnement, s'associe à la protéine CRP. Ce complexe CRP-AMPc va activer la synthèse des gènes *pel*. (5) Les acides organiques sont perçus par le système GacAS ce qui induit la synthèse de l'ARN non codant *rsmB*. Ce dernier va s'associer à la protéine RsmA, levant la répression sur la synthèse du gène *hrpL*. (6) Le système à deux composants HrpXY, activé par des acides

organiques de la plante, active la synthèse des gènes *hrpXY-hrpS-hrpL* induisant la synthèse des *hrp* comme celui de l'harpine HrpN. (7) PecT et PecS sont des régulateurs pléiotropes qui répriment la synthèse des exoenzymes ou de l'harpine *hrpN*. PecS contrôle également la synthèse du pigment antioxydant : l'indigoïdine. PecT contrôle, lui, la synthèse des exopolysaccharides. (8) Les OPG maintiennent le système RcsCDB à un faible niveau d'activité indispensable pour la poursuite de la virulence. (Modifié d'après Charkowski *et al.*, 2012 [181]).

## 4.5 Les OPG chez *D. dadantii*

### 4.5.1 Les OPG

Comme vu précédemment, les OPG de *D. dadantii* appartiennent à la première famille. L'absence de ces oligomères de glucoses conduit à un phénotype pléiotrope. On constate l'absence de pellicule (biofilm se développant à l'interface air-liquide), une diminution significative de la motilité, une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des exopolysaccharides conférant un aspect muqueux aux colonies, ainsi qu'une hypersensibilité aux sels biliaries [40, 47]. La diminution de la motilité et de la sécrétion des exoenzymes sont deux facteurs importants pour la virulence mais ils ne suffisent cependant pas à expliquer la perte totale de virulence (Fig. 22). En effet, une analyse protéomique a montré que chez le mutant dépourvu d'OPG (mutant *opgG* ou *opgH*) une réponse générale au stress est induite [37]. De plus, la co-inoculation du mutant déficient en OPG avec la souche sauvage ne permet pas au mutant de croître *in planta* [40]. Tous ces phénotypes traduisent une incapacité du mutant *opgG* à reconnaître correctement son environnement.

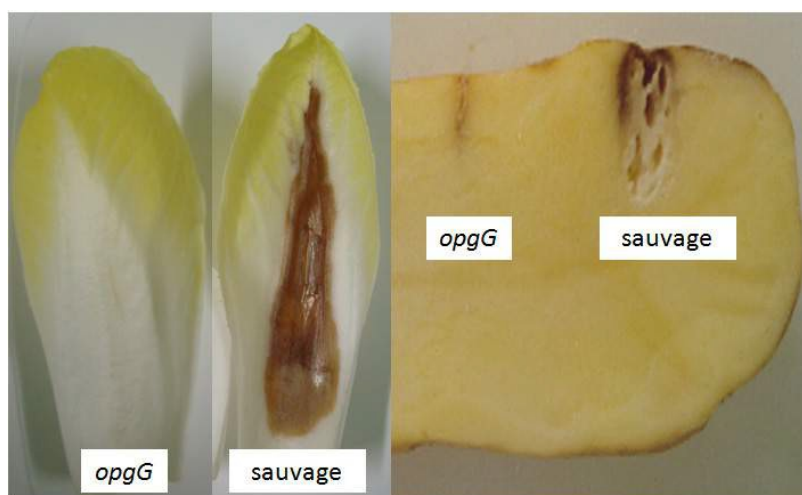


Figure 22 : Feuilles d'endive et tubercule de pomme de terre inoculés avec  $10^7$  bactéries. Après 48h d'incubation à 28°C, on peut observer la macération causée par la souche sauvage à droite et l'incapacité du mutant *opgG* à macérer les tissus à gauche.

### 4.5.2 Révertant des OPG

F. Bouchart a identifié une mutation suppressive du phénotype des OPG chez *D. dadantii*. Cette mutation restaure la quasi totalité des phénotypes du mutant *opgG* [47, 61]. Obtenue après une mutagénèse à la nitrosoguanidine, cette mutation

localisée dans le gène *rscC*, capteur du phosphorelais RcsCDB, se situe au niveau de la partie cytoplasmique à côté du domaine histidine kinase. Elle correspond au changement de l'alanine 463 en valine et est nommée *rscC2*. Ces travaux connectent les OPG avec le phosphorelais et valident l'hypothèse d'un rôle des OPG comme intermédiaire dans la perception de certaines variations de l'environnement.

Dans une souche sauvage, le système RcsCDB est faiblement activé. Cette souche est virulente et montre une capacité à se mouvoir (Fig. 23). La perte d'OPG induit l'activation constitutive du système RcsCDB. Cette activation provoque une diminution de la motilité par la répression de l'opéron *flhDC* et une perte de virulence (Fig. 23).

La mutation *rscC2* conduit à une activation constitutive de l'activité phosphatase du capteur RcsC permettant de rétablir un niveau d'activation du système RcsCDB dans la souche *opgG* similaire à celui observé dans la souche sauvage et compatible avec la virulence sur pomme de terre mais pas sur feuille d'endive.

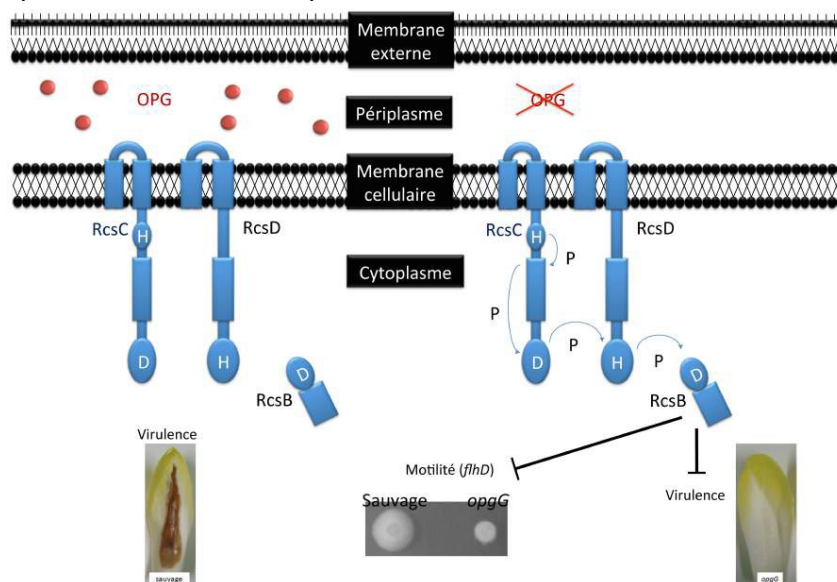


Figure 23 : Schéma de l'effet d'une mutation *opgG*, impact de cette mutation sur le niveau d'activation du système RcsCDB et ses conséquences sur deux phénotypes.

## 5. Objectifs

Impliqués dans la virulence de nombreuses bactéries (*P. aeruginosa*, *D. dadantii*, *S. enterica*, etc.) mais également dans d'autres processus cellulaires, les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des constituants généraux de l'enveloppe de la plupart des protéobactéries.

L'objectif de cette thèse est d'établir un modèle de compréhension du rôle biologique des OPG à partir de notre modèle *Dickeya dadantii*. Tout d'abord, j'ai approfondi l'étude du lien entre les OPG et le système RcsCDB en démontrant que



l'activité de ce phosphorelais dépend de la concentration périplasmique des OPG. J'ai poursuivi par une étude sur la compréhension du lien entre les OPG et les autres systèmes à deux composants. Ensuite, j'ai exploré la place des OPG parmi les régulateurs de la virulence. Enfin, j'ai approfondi l'étude de la synthèse des OPG en étudiant la substitution de ces derniers.

# Résultats

# 1. La concentration en glucanes périplasmiques osmorégulés module le niveau d'activation du système RcsCDB

La spectrométrie de masse a été réalisée par le Dr Catherine Robbe-Masselot (UMR 8576 CNRS-Lille 1).

Les expériences de Phos-Tag ont été mises au point et réalisées par le Dr Edwige Madec (UMR 8576 CNRS-Lille 1).

Les OPG contrôlent le système phosphorelais RcsCD/RcsB. Nous nous sommes demandé s'il s'agissait d'un système binaire absence/présence d'OPG ou si la fluctuation de la concentration d'OPG contrôlait le niveau d'activité du système RcsCD/RcsB. Afin de préciser la relation entre les OPG et le système Rcs, nous avons décidé de tester l'effet d'une variation de la concentration des OPG sur le niveau d'activation du système Rcs.

## 1.1 La concentration des OPG dépend de la concentration en L-arabinose dans la souche NFB3835 (*ara*-strain)

Un opéron *opgGH* débarrassé de son promoteur et remplacé par celui de l'opéron *araBAD* a été construit et introduit chez *D. dadantii* (NFB3835). Chez *E. coli*, l'opéron *araBAD*, impliqué dans le catabolisme du L-arabinose, est connu pour être finement régulé par la concentration en L-arabinose présente dans le milieu via la protéine AraC [218]. La concentration en OPG synthétisés dans la souche NFB3835 ou *ara*-strain contenant la construction *araC-P<sub>BAD</sub>opgGH* (Cf. Procédures expérimentales) a été mesurée dans un milieu minimum contenant différentes concentrations de L-arabinose de 0 à 1 g/l (Fig. 24). En l'absence de L-arabinose, les OPG sont indétectables. Lorsque la concentration en L-arabinose augmente, la concentration en OPG augmente dans la cellule jusqu'à atteindre 20 µg/mg de protéine pour 1 g/l de L-arabinose. Une concentration supérieure en L-arabinose (2 ou 5 g/l) ne permet pas d'obtenir d'avantage d'OPG (résultat non présenté). Cette souche peut donc être utilisée pour étudier la relation entre la concentration en OPG et le système phosphorelais Rcs.

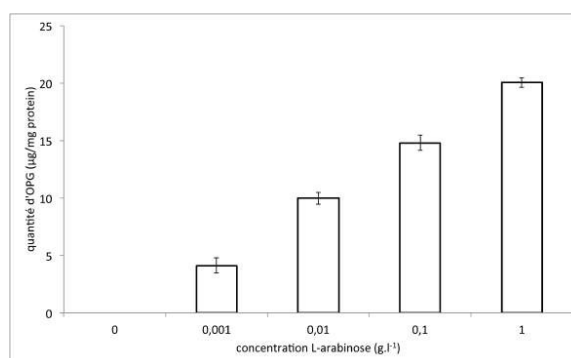


Figure 24 : Concentration des OPG dans la souche NFB3835 (*P<sub>BAD</sub>opgGH*) à différentes concentrations de L-arabinose. Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle en milieu M63 supplémenté avec les concentrations indiquées de L-arabinose. Les OPG ont été extraits, purifiés et

quantifiés comme décrit dans la partie procédures expérimentales. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

## 1.2 L'augmentation de la concentration des OPG diminue le niveau d'activation du phosphorelais RcsCDB

La relation entre les OPG et le système Rcs est suivie par quantification de l'expression de fusions transcriptionnelles de deux opérons connus pour être régulés en sens inverse par le système Rcs chez *Dickeya dadantii* [61]. Le système RcsCDB régule la motilité en réprimant l'opéron *flhDC* qui code les activateurs nécessaires à l'expression des gènes de l'appareil flagellaire. L'opéron *ftsAZ* est nécessaire à la division cellulaire. Un des promoteurs de cet opéron est activé par le système RcsCDB et a été cloné dans la fusion transcriptionnelle *ftsA-uidA* [61]. Les deux fusions *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* ont été introduites dans la souche NFB3835. L'expression de ces deux fusions a été mesurée après croissance en milieu minimum 63 complémenté avec des concentrations croissantes de L-arabinose.

La motilité de la souche NFB3835 a également été évaluée sur milieu minimum 63 faiblement gélosé complémenté avec des concentrations croissantes de L-arabinose. En contrôle, la motilité de la souche sauvage (EC3937) et du mutant *opgG* (NFB3723) ont été évaluées dans les mêmes conditions. Pour ces deux souches, la motilité est constante quelle que soit la concentration en L-arabinose. Comme décrit précédemment, la souche sauvage nage 2,2 fois plus que le mutant *opgG* (Fig. 25A). La souche NFB3835 montre une capacité à nager qui augmente lorsque la concentration en L-arabinose augmente (Fig. 25A). Sans L-arabinose dans le milieu, la souche NFB3835 nage peu et présente une capacité à nager similaire à celle du mutant *opgG* (NFB3723). La capacité à nager de la souche NFB3835 augmente jusqu'à atteindre une capacité similaire à celle de la souche sauvage (EC3937) lorsque 1g/l de L-arabinose est ajouté au milieu (Fig. 25A).

L'expression de la fusion *flhD-uidA* a été évaluée après croissance de la souche NFB7300 en milieu minimum 63 complémenté avec les mêmes concentrations de L-arabinose que précédemment (Fig. 25B). En contrôle, le niveau d'activité de la fusion en contexte sauvage (NFB3800) et *opgG* (NFB7301) a été mesuré dans les mêmes conditions. Le niveau d'activité ne varie pas en fonction de la concentration en L-arabinose. Comme décrit précédemment, le niveau d'activité en contexte sauvage est 2,3 fois supérieur à celui du mutant *opgG* (Fig. 25B). Un faible niveau d'expression de la fusion *flhD-uidA*, similaire à celui du mutant *opgG* (NFB7301), est mesuré pour la souche NFB7300 lorsque la croissance a lieu dans un milieu dépourvu de L-arabinose. Le niveau d'expression le plus élevé est obtenu après croissance

dans un milieu minimum 63 complétement avec 1 g/l de L-arabinose. Ce haut niveau d'expression est similaire à celui obtenu avec la souche sauvage (NFB3800).

L'augmentation de la motilité est donc corrélée à une augmentation de l'expression de fusion *flhD-uidA*. Ces résultats nous indiquent que la concentration en OPG module la motilité chez *D. dadantii*.

L'expression de la fusion *ftsA-uidA* a été quantifiée dans les mêmes conditions (Fig. 25C). En contrôle, le niveau d'activité de cette fusion a été mesuré en contexte sauvage (NFB3809) et en contexte *opgG* (NFB7274) en milieu minimum 63 complétement ou non par différentes concentrations de L-arabinose. Le niveau d'expression de cette fusion est constant dans ces deux souches quelle que soit la concentration en L-arabinose. De plus, le niveau d'expression est 6 fois plus élevé en contexte *opgG* qu'en contexte sauvage. Un faible niveau d'expression similaire à celui du contexte sauvage (NFB3809) est observé pour la souche NFB3837 dans un milieu minimum 63 complétement avec 1 g/l de L-arabinose. Un haut niveau d'expression comparable à celui du contexte *opgG* (NFB7274) est observé pour la souche NFB3837 dans un milieu minimum 63 sans L-arabinose. Ces résultats nous indiquent que la concentration en OPG module l'expression de *ftsA* chez *D. dadantii*. Afin de confirmer que la régulation observée passe effectivement par le système Rcs, l'inactivation du gène *rscB* ou *rscC* a été réalisée dans les souches NFB3835, NFB3837, NFB7300 (respectivement NFB7368, NFB7371 et NFB7369 et respectivement NFB7400, NFB7401, NFB7405). Quel que soit le contexte mutant au locus *rscCDB*, la motilité et l'activité des deux fusions restent constantes quel que soit la concentration de L-arabinose présente dans le milieu de croissance. De plus, les mesures sont similaires à ce qui avait été mesurée précédemment en contexte sauvage (Fig. 25, A à B).

Latasa *et al.* ont montré que la forme non phosphorylée de la protéine RcsB était requise pour la synthèse du biofilm chez *Salmonella* [219]. Aussi, le phénotype observé pour le mutant *rscB* pourrait être le fruit de la perte de la protéine RcsB elle-même et non une faible phosphorylation de cette dernière. La construction *rscCDB<sub>D56N</sub>*, qui code une protéine RcsB non phosphorylable, a été introduite dans les souches dérivées du mutant *rscB* NFB7368, NFB7369 et NFB7371 (respectivement NFB7401, NFB7403, NFB7402).

Les résultats obtenus pour la motilité et les niveaux d'activités sont similaires à ceux observés pour le mutant *rscB* (Fig. 25, A à C).

Enfin, pour être sûr que la concentration cytoplasmique de la protéine RcsB ne varie pas en fonction de la concentration en L-arabinose, des analyses par western-blot

ont été réalisées pour les souches sauvage (EC3937), *opgG* (NFB3723), *ara*-strain (NFB3835), *rscC* (NFB3682), *rscB* (NFB7279) et *rscBD56N* (NFB7112). Une quantité similaire de la protéine RcsB a été observée quel que soit le génotype du locus *rsc*, la souche ou la concentration en L-arabinose (résultat non montré). L'ensemble des résultats indique que la régulation de nos deux opérons passe par une variation du niveau de phosphorylation du régulateur transcriptionnel RcsB et que cette variation est causée par une modification d'activité de RcsCD, activité elle-même modulée par la variation de la concentration en OPG.

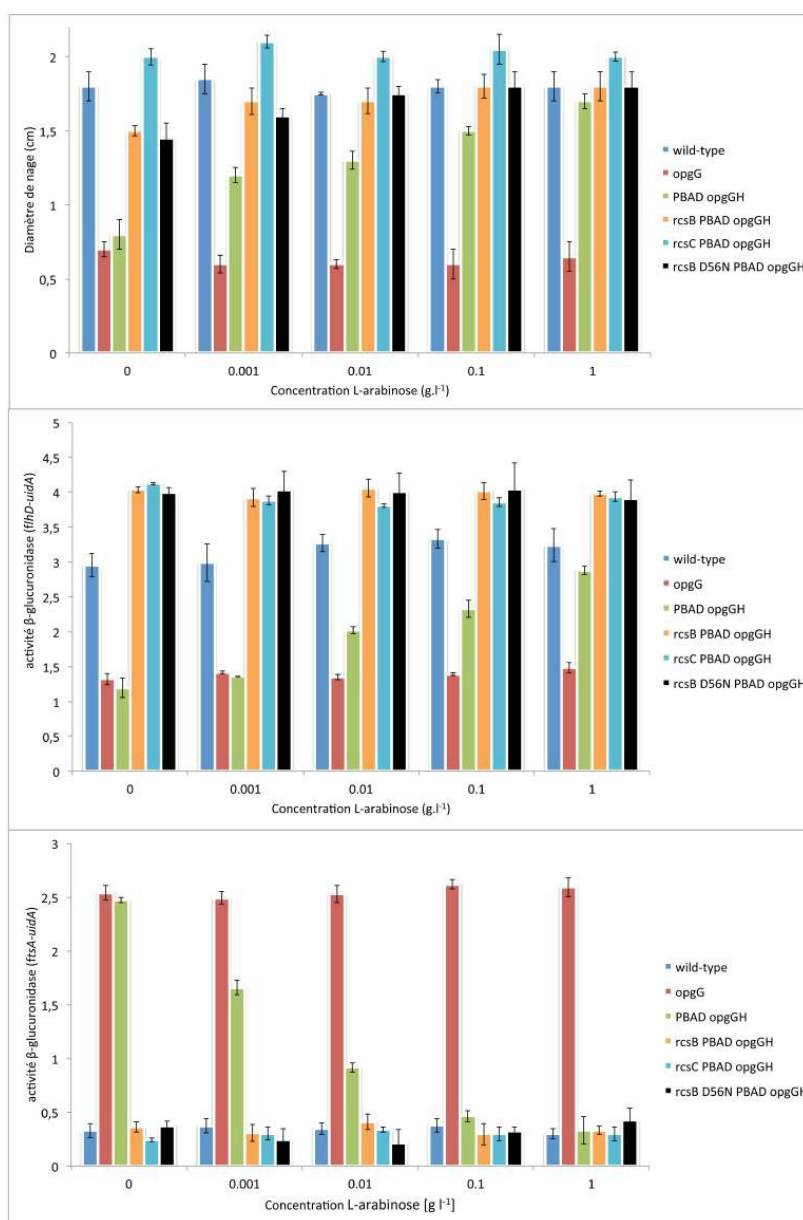


Figure 25 : Effet de la concentration en L-arabinose sur la motilité (A) et l'expression des fusions transcriptionnelles *flhD-uidA* (B) et *ftsA-uidA* (C) dans différentes souches. La motilité a été mesurée sur boîtes de Petri contenant du M63 faiblement gélosé (0,4% d'agar) supplémenté avec du L-arabinose, aux concentrations indiquées. Après 30h d'incubation, le diamètre du halo de nage a été mesuré. Pour les fusions transcriptionnelles, les bactéries ont été cultivées dans les mêmes milieux

que précédemment jusqu'à la moitié de la phase exponentielle puis lysées par sonication. L'activité en  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée avec du PNPu comme substrat. L'activité spécifique a été exprimée en  $DO_{410nm}$  par min et par mg de protéines. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

### 1.3 Une concentration minimum d'OPG est requise pour le déroulement de la pathogénèse

Lors de la virulence, le système Rcs est fortement réprimé [107]. De plus, les OPG sont requis pour la répression de ce dernier [61]. De ces deux constats, on peut émettre l'hypothèse que la concentration en OPG pourrait moduler la virulence. Afin de tester l'impact de la concentration en OPG sur le développement de la virulence chez *D. dadantii*, la souche ara-strain (NFB3835) a été cultivée jusqu'en phase stationnaire en milieu minimum 63 complété avec différentes concentrations de L-arabinose avant l'inoculation. Les bactéries ont été centrifugées et lavées deux fois dans du milieu minimum 63 sans arabinose afin qu'il n'y ait pas de synthèse d'OPG *in planta*. Les bactéries ( $10^7$ ) ont été inoculées sur feuilles d'endives. La virulence a été observée à 24 et à 48h après l'inoculation (Fig. 26). Lorsqu'il n'y a pas eu de L-arabinose dans la culture de la souche ara-strain (NFB3835), aucune macération n'est observée (Fig. 26). Ce résultat nous indique qu'il n'y a pas de L-arabinose disponible dans la plante. Une timide macération sur la feuille d'endive est observée pour une concentration de 0,01 g/l de L-arabinose. Enfin, une concentration de 1 g/l de L-arabinose conduit à la formation d'une macération similaire à celle de la souche sauvage (EC3937). Ainsi, puisqu'il ne peut y avoir de synthèse d'OPG *in planta*, l'obtention d'un développement optimal de la maladie dépend de la concentration des OPG au moment de l'inoculation. Ce développement de la maladie s'arrête lorsque la concentration en OPG passe sous la concentration minimale requise pour la virulence. En effet, les OPG sont dilués au cours des divisions cellulaires des bactéries. Cette concentration minimale peut être estimée autour de 0,01 g/l de L-arabinose (Fig. 26). Cette concentration correspond environ à 10  $\mu$ g d'OPG par mg de protéines (Fig. 24).

Lorsque du L-arabinose (1 g/l) est ajouté dans la feuille d'endive sur les bactéries au moment de l'inoculation ou 24 h après l'inoculation, aucune macération n'est observée si les bactéries ont été cultivées en milieu minimum 63 sans L-arabinose. Par contre, une macération similaire à celle de la souche sauvage est observée quelque soit la concentration de L-arabinose contenue dans le milieu minimum 63 précédent l'inoculation (résultat non présenté).

Ces résultats indiquent qu'une concentration minimale d'OPG est requise pendant toute la durée de la pathogénèse pour obtenir une virulence optimale de *D. dadantii*.

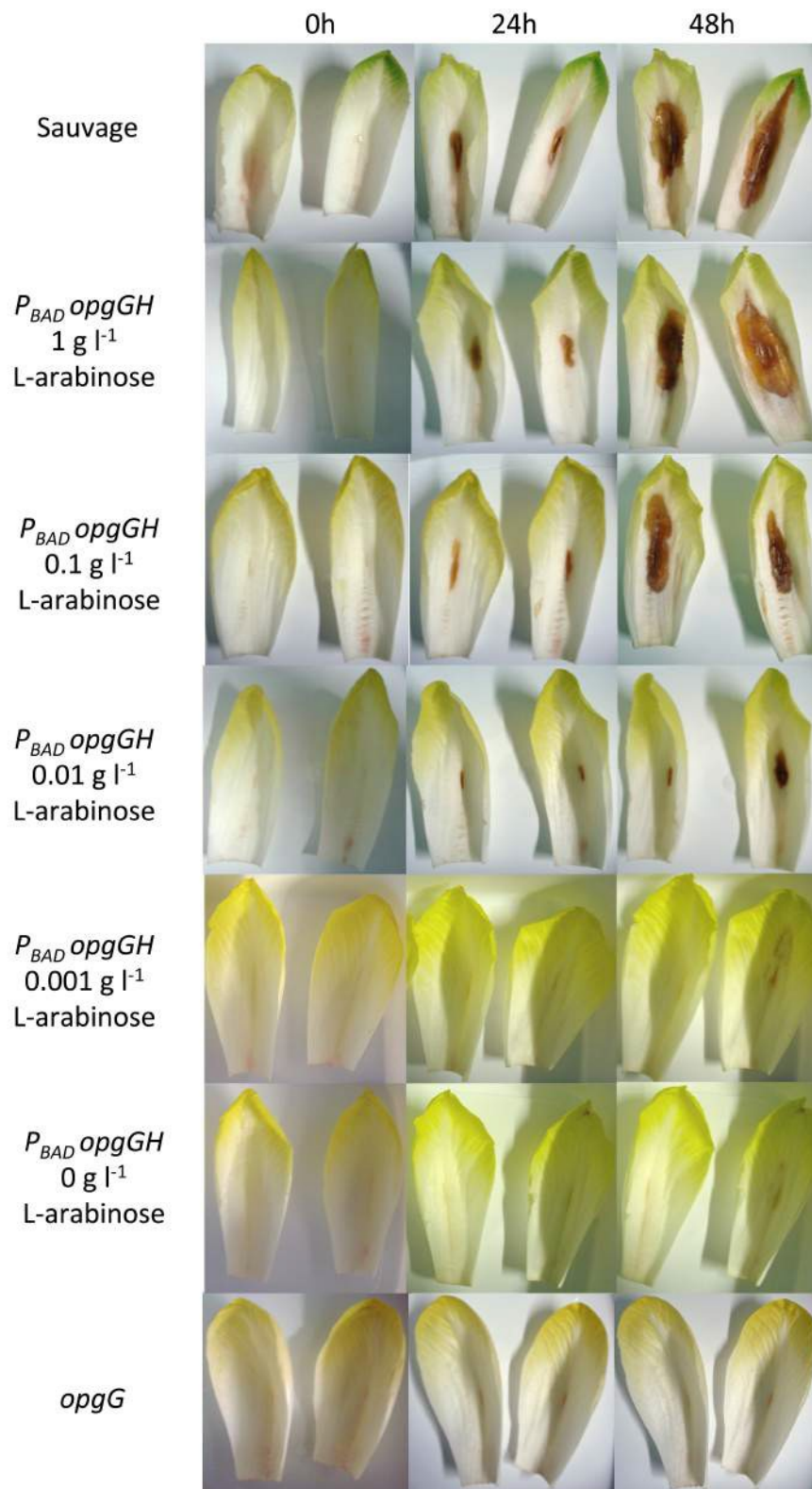


Figure 26 : Effet de la concentration en L-arabinose sur la pathogénicité de la souche NFB3835 ( $P_{BAD} opgGH$ ). Les bactéries ont été cultivées jusqu'au milieu de phase exponentielle de croissance en milieu M63 supplémenté avec des concentrations indiquées de L-arabinose. Les cellules ont été



lavées deux fois et  $10^7$  bactéries ont été inoculées sur des feuilles d'endive. L'évolution de la macération a été observée à 24 et 48H.

#### 1.4 *In planta, Dickeya dadantii synthétise une forte concentration en OPG*

La concentration en OPG a été déterminée après croissance de la souche sauvage (EC3937) *in planta*. La souche sauvage (EC3937) a été cultivée en milieu minimum 63.  $10^7$  bactéries ont été inoculées à des feuilles d'endives. Les OPG ont été extraits et purifiés à partir des bactéries isolées de la culture en milieu minimum 63 avant l'inoculation (0h), et 24 et 48h après l'inoculation. Pour chaque temps, le nombre d'unité formatrice de colonies a été déterminé. Après 24h d'incubation, la concentration en OPG a été multipliée par deux en comparaison à la concentration des OPG à 0h et reste constante après 48h d'incubation (Fig. 27A). Cependant, les OPG n'ont été purifiés que sur une colonne de Biogel P4. Aussi, les OPG extraits pourraient être contaminés par des oligosaccharides issus de la dégradation des polysaccharides de la plante par les enzymes sécrétées par *D. dadantii* lors de l'infection et de taille similaire aux OPG. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisée pour déterminer la taille du squelette des OPG. Le spectre des OPG extraits des bactéries cultivées en milieu minimum 63 a été utilisé en contrôle et comparé au spectre des OPG extraits des bactéries après 24 et 48h d'incubation en feuilles d'endives. Comme montré en Fig. 27B, aucune différence dans la taille des OPG n'a été observée quelles que soient les conditions de croissance. Les OPG présentent un degré de polymérisation de 4 à 11 résidus de glucose. Cela s'observe nettement dans les spectres de masse de chaque échantillon avec la présence de huit ions moléculaires  $[M+Na]^+$  de m/z 689, 851, 1013, 1175, 1337, 1499, 1661 et 1823. Pour chaque ion moléculaire, un incrément de 42 Da est observé et correspond à la présence de résidus d'acétyle, substituant des OPG et signature caractéristique des OPG de *D. dadantii* [16]. Il est à noter qu'*in planta*, les OPG de *D. dadantii* ne sont pas substitués par des résidus de succinyles. Ainsi, nous pouvons confirmer que les oligosaccharides extraits des bactéries *in planta* sont uniquement constitués d'OPG. Lorsque les bactéries sont cultivées dans des milieux de plus haute osmolarité (ajout de 0,1 ou 0,2 M de NaCl) ou dans un milieu de plus basse osmolarité (milieu minimum 63 dilué de moitié), aucune différence dans le délai d'apparition des symptômes ou dans l'intensité de la maladie n'est observée (résultats non présentés).

L'ensemble de ces résultats indique qu'*in planta*, *D. dadantii* ajuste sa concentration en OPG pour atteindre une concentration supérieure à la concentration minimale requise pour réprimer le niveau d'activité du système Rcs suffisamment pour une virulence optimale.

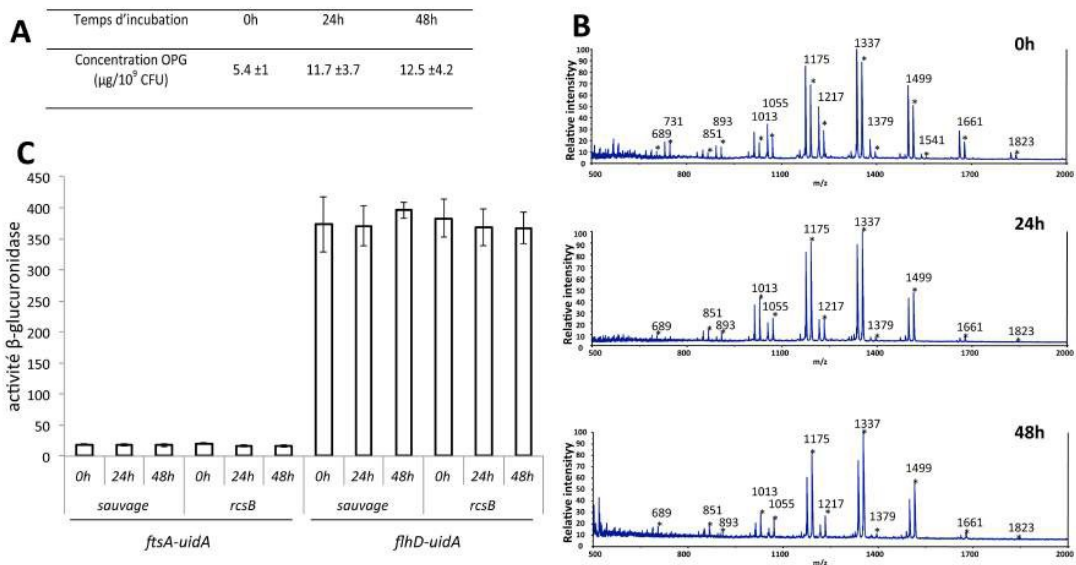


Figure 27 : Effet de la concentration des OPG sur le niveau d'activation du système RcsCDB *in planta*. Pour la concentration en OPG, les spectres de masse ou l'activité des fusions, les bactéries ont été cultivées en milieu M63 (0h), puis inoculées et incubées 24h ou 48h. (A) Concentration des OPG dans la souche sauvage après extraction et purification. (B) Spectre de masse des OPG. (C) Expression des fusions *flhD-uidA* ou *ftsA-uidA* en contexte sauvage ou *rcsB*. L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée à l'aide de PNPu comme substrat.

### 1.5 Le phosphorelais RcsCDB montre un faible niveau d'activation durant la virulence

Cette concentration élevée en OPG doit être corrélée à un faible niveau d'activité du système Rcs nécessaire pour une virulence complète. L'expression des fusions *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* a été quantifiée avant inoculation (0h) et après 24 et 48h d'incubation *in planta* en contexte sauvage et *rcsB* (Fig. 27C). Le niveau d'expression de la fusion *ftsA-uidA* ne varie pas et montre un faible niveau d'activité durant toute le processus de virulence quelque soit le contexte génétique et à chaque temps. Le niveau d'expression de la fusion *flhD-uidA* ne varie pas et montre un haut niveau d'activité durant toute la pathogénèse quelque soit le contexte génétique et à chaque temps. Une analyse par western blot a été réalisée aux mêmes conditions que précédemment. Une quantité similaire de protéine RcsB est observée après 0, 24 et 48h d'incubation (Résultat non montré). Ces résultats montrent que le niveau d'activité du système Rcs est sévèrement réprimé pendant toute la pathogénèse de *D. dadantii*.

### 1.6 Les OPG sont un des facteurs requis pour la modulation du niveau d'activité du système RcsCDB en fonction de l'osmolarité

La synthèse des OPG et le niveau d'activation du système Rcs sont régulés par l'osmolarité du milieu mais en sens inverse : la concentration en OPG décroît [16] lorsque le niveau de phosphorylation du système Rcs et l'osmolarité du milieu

augmentent. Donc le niveau d'activation du système Rcs peut être modulé par l'osmolarité via la variation de la concentration en OPG. Pour vérifier cette hypothèse, la motilité a été observée et le niveau d'activation des fusions *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* a été déterminé dans différents contextes génétiques et à différentes osmolarités du milieu minimum 63. Pour la souche sauvage (EC3937), la motilité reste constante dans un milieu minimum 63 dilué de moitié ou non et décroît lorsque l'osmolarité du milieu augmente (Fig. 28A). Dans les différents contextes génétiques, la motilité n'est pas affectée quelle que soit l'osmolarité du milieu. Comme attendu, une perte de la motilité est observée pour la souche *opgG* (NFB3723) et une motilité similaire à celle de la souche sauvage est observée pour les mutants *rscB* (NFB7279), *rscB<sub>D56N</sub>* (NFB7112) et *rscC* (NFB3682) (Fig. 28A). L'expression de la fusion *flhD-uidA* en contexte sauvage reste constante en milieu minimum 63 dilué de moitié et en milieu minimum 63 et décroît lorsque l'osmolarité du milieu augmente (Fig. 28B). Comme escompté, l'expression de la fusion *flhD-uidA* en contexte *opgG* (NFB7301) est faible et reste constante quelque soit l'osmolarité du milieu. L'expression de cette fusion en contexte *rscB* (NFB7202), *rscB<sub>D56N</sub>* (NFB7399) et *rscC* (NFB7128) ne varie pas en fonction de l'osmolarité et est similaire à celle observée en contexte sauvage en milieu minimum 63 (Fig. 28B). Ces résultats montrent que la répression de la motilité par l'osmolarité dépend de la variation de la concentration en OPG via l'activation du système Rcs.

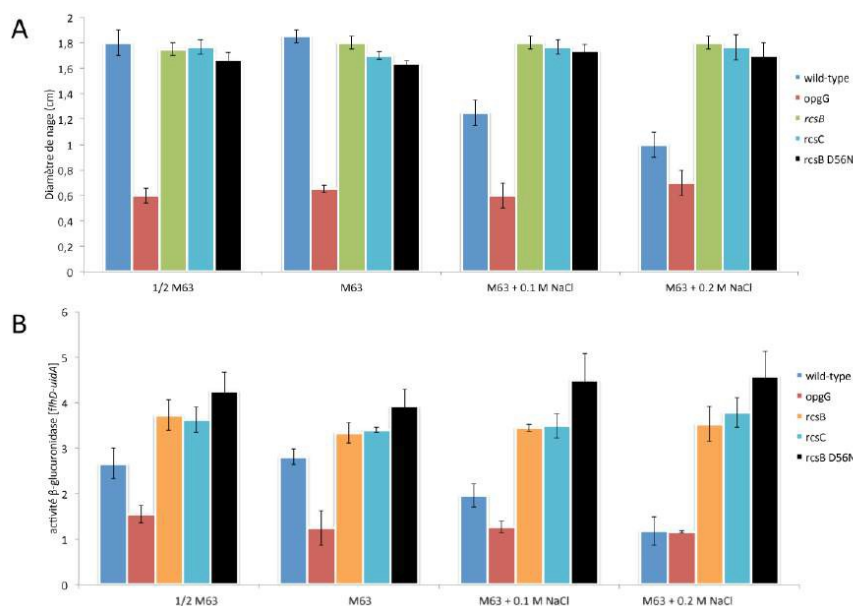


Figure 28 : Effet de l'osmolarité sur la motilité (A) et sur l'expression de la fusion *flhD-uidA* (B) dans différents contextes génétiques. La motilité a été mesurée sur milieu faiblement gélosé. La mesure du niveau d'expression de la fusion a été réalisée en milieu 1/2 M63, M63, M63 supplémenté avec 0,1M ou 0,2M de NaCl en milieu de phase exponentielle de croissance. L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée à l'aide de PNPU comme substrat.

Pour la fusion *ftsA-uidA* (Fig. 29A), un faible niveau d'expression est observé en contexte *rcsB* (NFB7205), *rcsB<sub>D56N</sub>* (NFB7408) et *rcsC* (NFB7127) quelle que soit l'osmolarité du milieu. De manière surprenante, aucune augmentation de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* est observée en contexte sauvage (NFB3809). En contexte *opgG* (NFB7274), l'expression de la fusion *ftsA-uidA* est plus élevée que celle observée en contexte sauvage. De plus, une augmentation de l'expression de quatre fois est observée entre le milieu de basse osmolarité (milieu minimum 63 dilué de moitié) et celui de haute osmolarité (milieu minimum 63 complété avec 0,2M de NaCl). Cela suggère fortement qu'en sus des OPG, d'autres facteurs sont requis pour la régulation de l'opéron *ftsAZ* par le système Rcs. En contrôle, la concentration en OPG a été déterminée (Fig. 29B). Comme démontré dans les études précédentes [16], la concentration en OPG décroît lorsque l'osmolarité augmente passant ainsi de 36 µg d'OPG par mg de protéines en milieu de faible osmolarité (milieu minimum dilué de moitié) à 6 µg d'OPG par mg de protéine en milieu de haute osmolarité (milieu minimum complété avec 0,2M de NaCl). Une analyse par western blot a été entreprise en milieu minimum 63 complété ou non avec 0,2M de NaCl pour les souches sauvage (EC3937), *opgG* (NFB3723), *rcsB* (NFB7279), *rcsC* (NFB3682) et *rcsB<sub>D56N</sub>* (NFB7112). Une quantité similaire de la protéine RcsB est observée quels que soient le contexte génétique ou l'osmolarité (résultat non présenté).

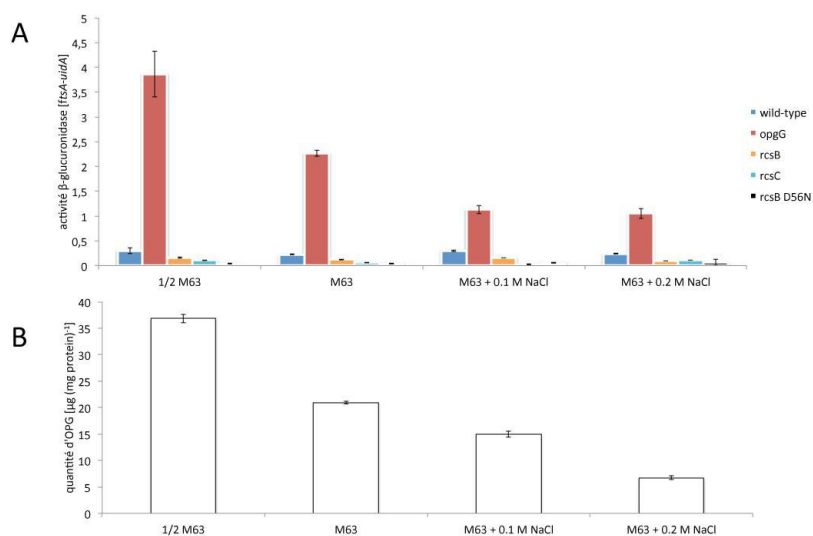


Figure 29 : En A, Effet de l'osmolarité sur l'expression de la fusion *ftsA-uidA* dans différents contextes génétiques. La mesure du niveau d'expression de la fusion a été réalisée en milieu 1/2 M63, M63, M63 supplémenté avec 0,1M ou 0,2M de NaCl en milieu de phase exponentielle de croissance. L'activité β-glucuronidase a été mesurée à l'aide de PNPu comme substrat. En B, Concentration périplasmique des OPG dans la souche sauvage (EC3937) en fonction de l'osmolarité.

Ces résultats montrent que chez *D. dadantii*, la variation de la concentration des OPG est requise pour activer le système Rcs en fonction de l'osmolarité. Cependant,

l'osmorégulation est un phénomène complexe multifactoriel [220]. Les OPG sont nécessaires mais ne sont qu'un des acteurs de la régulation des gènes cibles du système Rcs.

### **1.7 La concentration des OPG influence directement l'activité kinase du système phosphorelais RcsCDB**

Nous venons de voir que le niveau d'activité du capteur RcsC dépendait de la concentration en OPG. Cette activation se conclut au final par une augmentation de la concentration de la forme phosphorylée du régulateur RcsB. Jusque maintenant, nous avons déduit le niveau d'activation du système RcsCDB par l'intermédiaire de la mesure de l'expression de gènes cibles et pas le ratio RcsB-P/RcsB lui-même. L'observation de la forme phosphorylée d'un résidu aspartate est extrêmement compliquée, notamment parce que cette phosphorylation est particulièrement instable. Ann M. Stock et collaborateurs [221, 222] ont récemment publié deux études permettant d'observer la phosphorylation des régulateurs chez les bactéries. Cette méthode repose sur un gel SDS-PAGE dont une partie des molécules d'acrylamide sont greffés à une molécule de Phos-Tag™. Dans un tel gel, le Phos-Tag™ retarde la migration de toute protéine phosphorylée par rapport à la même protéine non phosphorylée, permettant de séparer ces deux entités. Le Dr Edwige Madec a donc mis au point cette technique dans notre équipe pour observer directement la phosphorylation de la protéine RcsB. Après purification de la protéine RcsB et RcsB<sub>D56N</sub> (forme non phosphorylable de RcsB), nous avons d'abord optimisé les conditions nécessaires à la séparation de la forme phosphorylée de RcsB (Fig. 30A). La protéine RcsB a été incubée 15 et 30 min en présence ou non de phosphoramidate (PA), molécule connue pour phosphoryler les protéines et possédant une liaison phosphoramide similaire à celle reliant le phosphate à l'histidine du capteur des phosphorelais. Comme attendu, le régulateur RcsB n'est jamais phosphorylé en absence de PA (Fig. 30A). Après 15 et 30 min d'incubation avec du PA, nous pouvons observer la présence d'une forme phosphorylée de RcsB. La bande RcsB-P est plus intense après 30 min d'incubation comparé à 15 min d'incubation (Fig. 30A). Comme prévu, nous n'observons aucune forme de phosphorylation pour la protéine mutante RcsBD56N (Fig. 30A).

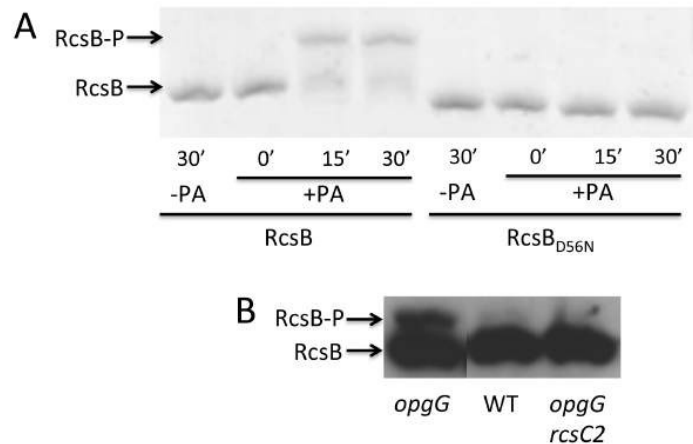


Figure 30 : Etude de la phosphorylation de RcsB. En A, Gel SDS---PAGE contenant du Phos---Tag de la protéine RcsB et RcsBD56N en présence de phosphoramidate (PA). En B, Western Blot des souches sauvage (EC3937), *opgG* (NFB3723) et *opgG rcsC2* (NFB3591).

Une fois optimisée *in vitro*, cette méthode a été utilisée pour observer le ratio RcsB-P/RcsB *in vivo*. Comme attendu, la souche sauvage (EC3937) montre une bande RcsB-P de faible intensité comparé à celle du mutant *opgG* (NFB3723) (Fig. 30B). De plus, la souche *opgG rcsC2* (NFB3591) montre un profil similaire à la souche sauvage. Enfin, nous n'observons aucune forme phosphorylée de RcsB dans la souche *rscC* ou la souche *rscB<sub>D56N</sub>* respectivement dépourvues du capteur histidine kinase RcsC ou du résidu aspartate phosphorylable de la protéine RcsB (Résultats non montrés).

## 1.8 Discussion

Les OPG sont connus pour être des facteurs de virulence importants chez les bactéries à Gram négatif [14]. De plus, nous avons vu dans une étude précédente [61] que les OPG contrôlent le système RcsCDB. Lors de cette étude, nous avons montré que la concentration périplasmique des OPG module le niveau d'activation du système RcsCDB chez *D. dadantii*.

Chez *D. dadantii*, la motilité et l'opéron *flhDC* sont réprimés par l'activation du système RcsCDB alors que l'opéron *ftsA* est activé [61]. Ces gènes reflètent donc le niveau d'activation du système RcsCDB. Lorsque la concentration en OPG dépend de la concentration en L-arabinose présente dans le milieu, la motilité et l'expression des deux gènes, *ftsA* et *flhD*, dépendent de la concentration en L-arabinose via le régulateur cytoplasmique RcsB. De plus, le niveau d'activation du système RcsCDB augmente pendant que la concentration en OPG décroît. La concentration en OPG contrôle l'activité du système RcsCDB. Un des stimuli du système RcsCDB est une augmentation de l'osmolarité [109]. Cette augmentation de l'osmolarité provoque une diminution de la concentration en OPG [14, 16]. Lorsque l'osmolarité augmente, la motilité comme l'expression de la fusion transcriptionnelle *flhD-uidA* diminuent. Ces résultats sont à corrélés à une activation du système RcsCDB et cette activation dépend directement de la diminution de la concentration en OPG via le régulateur

RcsB (Fig. 26 et 27). Aucune variation de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* n'est observée lorsque l'osmolarité du milieu augmente alors que ce gène est connu pour être activé par l'activation du système RcsCDB. Une explication possible est la présence chez *D. dadantii* d'un co-régulateur inconnu de la protéine RcsB. Ce co-régulateur affecterait l'interaction de RcsB sur la séquence régulatrice du gène. Cette hypothèse est renforcée par la diminution de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* en contexte *opgG*. En effet, sans la présence d'un co-régulateur, l'activation constitutive du système RcsCDB devrait conduire à un niveau d'expression élevé et constant de cette fusion. Chez *E. coli*, trois co-régulateurs capables de former un hétérodimère avec RcsB ont d'ores et déjà été identifiés : RcsA, GadE et BglJ [109, 113, 114]. Ces différents co-régulateurs permettent de co-réguler divers segments des gènes du régulon RcsCDB. Cependant, aucun orthologue de ces gènes n'a pu être identifié chez *D. dadantii*.

La variation de la motilité et de l'expression des gènes cibles est directement corrélée à la modulation du ratio RcsB phosphorylé/RcsB total, ce qui est révélé par l'absence de variation de l'expression des fusions en contexte *rcsB* ou *rscC* ainsi que par les analyses par western blot de la quantité de la protéine RcsB (résultats non montrés) ainsi que de son niveau de phosphorylation (Fig. 28). Chez *Erwinia amylovora*, aucune différence d'expression du gène *rscB* n'a été observée en milieu minimum ou *in planta* [223]. Aussi, le niveau d'activation du capteur RcsC et donc le niveau de phosphorylation du régulateur RcsB dépendent de la concentration périplasmique des OPG.

Enfin, une concentration minimum d'OPG est requise pour initier la phase symptomatique de la virulence (Fig. 24). Cette concentration peut être estimée à 10µg d'OPG par mg de protéines (Fig. 22) comme nous pouvons l'observer en milieu minimum 63 complété avec 0,01 g/l de L-arabinose, ce qui correspond à la quantité d'OPG mesurée dans un milieu minimum 63 complété avec 0,15M NaCl (Fig. 27). Cette concentration d'OPG est à associer à un niveau encore élevé de phosphorylation de RcsB ce qui empêche une virulence optimale. Une pathogénèse similaire à celle de la souche sauvage est observée pour 20 µg d'OPG par mg de protéines, ce qui correspond à 1g/l de L-arabinose (Fig. 27). Quelle que soit l'osmolarité du minimum avant l'inoculation, aucune différence n'est observée, que ce soit l'intensité de la maladie ou le temps nécessaire à l'apparition des symptômes. Nos résultats suggèrent que *D. dadantii* ajuste la concentration des OPG dans les vingt-quatre premières heures de l'infection. Cette concentration d'OPG est deux fois plus élevée que la concentration requise pour obtenir un faible niveau de phosphorylation de la protéine RcsB (Fig. 27). Cette haute concentration en OPG peut s'expliquer par la faible osmolarité de l'apoplaste des plantes même si cette osmolarité semble varier en fonction du tissu et de la plante [197]. Une autre

explication à cette haute concentration en OPG est que cela est nécessaire à d'autres processus cellulaires [37] pendant la pathogénèse. Une régulation supplémentaire favoriserait alors la synthèse des OPG. Chez *E. coli*, l'opéron *opgGH* appartient au régulon du facteur sigma E impliqué dans le stress de l'enveloppe [60]. Chez *Yersinia enterocolitica*, une étude a montré l'induction de l'opéron *opgGH* dans l'hôte [54]. Puisque les OPG sont nécessaires à la virulence de nombreuses entérobactéries pathogènes des mammifères, il serait intéressant de mesurer la concentration des OPG lors de l'infection de ces espèces bactériennes, notamment au niveau de l'intestin où l'osmolarité est forte et où la synthèse des OPG, si elle est élevée, ne pourra donc pas être le fruit de l'osmorégulation.



## 2. L'absence de glucanes périplasmiques osmorégulés affecte le niveau d'activation du système à deux composants EnvZ-OmpR mais ne perturbe pas l'intégrité de l'enveloppe

La protéomique des membres a été réalisée par le Dr Christophe Tastet (Unité Inserm U908).

La microscopie électronique à transmission a été réalisée par la plateforme : Bio Imaging Center Lille de l'IFR 147 (Université Lille 1).

Connaissant la relation entre le système RcsCDB et la concentration périplasmique en OPG et sachant qu'il existe trente-deux systèmes à deux composants chez *D. dadantii*, nous nous sommes demandés si d'autres systèmes à deux composants étaient activés par la perte d'OPG. Aussi, nous nous sommes intéressés aux systèmes suivants :

- le système EnvZ-OmpR puisque les OPG sont régulés par l'osmolarité,
- le système CpxA-CpxR puisqu'un mutant dépourvu d'OPG présente une réponse au stress constitutive,
- les systèmes GacS-GacA et HrpX-HrpY puisqu'un mutant dépourvu d'OPG présente une perte de virulence,
- le système NarX-NarL puisqu'un mutant dépourvu d'OPG présente une perturbation métabolique.

### 2.1 L'inactivation du régulateur *cpxR* en contexte sauvage provoque une perte de virulence

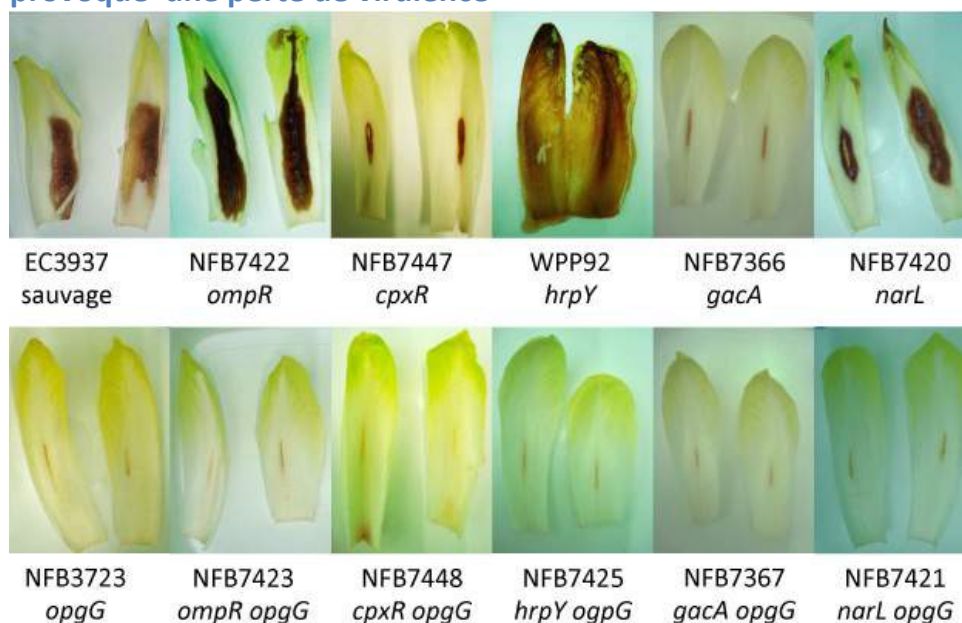


Figure 31: Virulence sur feuilles d'endive après 30h d'incubation à 28°C.

Après avoir inactivé chacun des régulateurs des cinq systèmes précédemment cités en contexte sauvage et *opgG*, nous avons testés différents phénotypes associés à la

virulence. Par opposition à la souche sauvage, le mutant *opgG* est non virulent sur feuille d'endive (Fig. 31). Comme décrit dans la littérature, le mutant *gacA* est non virulent et le mutant *hrpY* présente une hypervirulence en comparaison à la souche sauvage. Les mutants *ompR* et *narL* ne sont pas affectés dans leur capacité à développer une macération, même si on peut noter que dans la moitié des cas, le mutant *narL* présente une macération moins importante que la souche sauvage. Le mutant *cpxR* est incapable de développer la maladie de la pourriture molle. Aucune inactivation de ces cinq régulateurs ne permet de restaurer la virulence d'un mutant *opgG in planta*.

## 2.2 L'inactivation du régulateur *cpxR* en contexte sauvage conduit à une perte de motilité et l'inactivation de *ompR* ou de *narL* en contexte *opgG* restaure partiellement la motilité.

Souche	Motilité	Pectinase	Cellulase	Protéase	Mucosité
EC3937 sauvage	2,7	3	1,5	+	-
NFB3723 <i>opgG</i>	1	1,7	1	-	+
NFB7422 <i>ompR</i>	2,8	2,4	1,7	+	-
NFB7423 <i>ompR opgG</i>	1,6	2,6	1,5	-	+
NFB7447 <i>cpxR</i>	NM	2,8	0,9	+	-
NFB7448 <i>cpxR opgG</i>	1,1	1,5	0,9	-	+
WPP92 <i>hrpY</i>	2,8	3	1,5	+	-
NFB7425 <i>hrpY opgG</i>	1	1,5	1	-	+
NFB7366 <i>gacA</i>	2,5	1,8	1,1	+	-
NFB7367 <i>gacA opgG</i>	1,1	ND	1,1	-	+
NFB7420 <i>narL</i>	2,6	3	1,6	+	-
NFB7421 <i>narL opgG</i>	1,8	2,5	1,2	-	-

Tableau 2 : Récapitulatif des phénotypes des différentes souches. La motilité a été évaluée après 30h d'incubation sur milieu faiblement gélosé et est exprimé en cm +/- 0,1cm. La sécrétion des pectinases et des cellulases a été évaluée respectivement sur milieu PGA et CMC. Après 30h d'incubation et révélation, le diamètre du halo de dégradation a été mesuré et rapporté en cm +/- 0,1 cm. La capacité à sécréter des protéases et l'aspect ont été observés sur milieu LB-Lait 10% et milieu M63 glucose.

Nous avons poursuivi cette étude par une analyse des facteurs de virulence : la motilité, les exoenzymes (pectinases, cellulases, protéases) et la mucosité. La

motilité a été évaluée sur milieu LB faiblement gélosé (LB agar 0,4%). Le mutant *opgG* est peu motile en comparaison à la souche sauvage (Tableau 2). L'inactivation des régulateurs *ompR*, *hrpY*, *gacA* et *narL* en contexte *opgG* n'affecte pas la motilité. L'inactivation d'*ompR* ou de *narL* en contexte *opgG* restaure partiellement la motilité. Alors que le mutant *opgG* a une capacité de nage correspondant à un tiers de la capacité de la souche sauvage, les doubles mutants *ompR opgG* et *narL opgG* présentent une motilité correspondant à deux tiers de la capacité de la souche sauvage. Enfin, le mutant *cpxR* est non motile.

### **2.3 L'inactivation *ompR* en contexte *opgG* restaure la synthèse d'exoenzyme et le mutant *cpxR* affecte la production de cellulases.**

L'activité globale des exoenzymes a été évaluée sur boîte de Petri : respectivement boîte PGA, CMC et LB-lait pour pectinases, cellulases et protéases. Le diamètre du halo de dégradation révèle l'activité globale des exoenzymes (Tableau 2). Le mutant *opgG* présente une diminution de la production de pectinases, cellulases et de protéases en comparaison à la souche sauvage. L'inactivation d'*ompR* en contexte sauvage n'affecte pas la production d'exoenzymes. De plus, le double mutant *ompR opgG* présente une restauration de l'activité de pectinases et de cellulases mais pas de protéases. Cette restauration partielle de la synthèse d'exoenzymes ne permet cependant pas une restauration de la virulence (Fig. 31). Ce résultat n'est pas étonnant puisqu'une étude précédente a montré qu'une diminution de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes [40] n'était pas la cause principale de la perte de virulence du mutant *opgG*. Le mutant *cpxR* conduit à une diminution de la production de cellulases (Tableau 2). Les mutants *hrpY* et *narL* présentent des phénotypes similaires à la souche sauvage. Quand à eux, les doubles mutants *cpxR opgG* et *hrpY opgG* présentent des phénotypes similaires à celui du mutant *opgG*. Comme attendu, le mutant *gacA* présente une diminution de la synthèse des exoenzymes [132]. Le double mutant *gacA opgG* ne permet pas d'observer un halo de dégradation pour les pectinases. Enfin, le double mutant *narL opgG* montre une production de pectinases similaire à celle d'une souche sauvage (Fig. 31).

### **2.4 L'inactivation du régulateur *narL* en contexte *opgG* restaure l'aspect non muqueux des colonies.**

Pour terminer cette revue des phénotypes impliqués dans la virulence, la mucosité des souches a été observée sur boîte de Petri. La souche sauvage présente un aspect non muqueux tandis que le mutant *opgG* montre des colonies muqueuses. Quel que soit l'inactivation du régulateur en contexte sauvage ou *opgG*, cela n'affecte pas le phénotype muqueux en contexte *opgG* et non muqueux en contexte sauvage. Exception à la règle, le double mutant *narL opgG* est non muqueux comme une souche sauvage (Tableau 2).

## 2.5 Le système EnvZ-OmpR est affecté par la perte des OPG

Après l'observation des phénotypes des différentes constructions, nous avons dosé l'activité d'une fusion transcriptionnelle construite avec un gène régulé par chacun des systèmes à deux composants. Par manque de temps, nous nous sommes intéressés en priorité au système EnvZ-OmpR, CpxAR et HrpXY. Le gène *ompF* code une porine, régulée par le système EnvZ-OmpR [224]. Le gène *spy* code une chaperone périplasmique indépendante de l'ATP, régulée notamment par CpxAR. Cette protéine prévient l'agrégation et aide à la mise en conformation de protéines [78, 225, 226]. Enfin, le gène *hrpN* code l'harpine HrpN, le premier éliciteur des défenses de la plante, régulé par le système HrpXY [227].

Comme la synthèse des OPG est régulée par l'osmolarité [16], nous nous sommes demandé si la modulation de la concentration en OPG pouvait affecter l'expression de ces gènes. Pour tester cette hypothèse, l'activité des fusions *ompF-uidA*, *spy-uidA* et *hrpN-uidA* a été déterminée dans différents contextes génétiques et à différentes osmolarités en milieu M63 complété par du glycérol (Fig. 32). L'activité de la fusion *ompF-uidA* en contexte sauvage décroît au fur et à mesure que l'osmolarité du milieu diminue. L'activité suit le modèle déjà établi chez *E. coli* [224]. En contexte *opgG*, l'activité de la fusion *ompF-uidA* est dérégulée et semble ne suivre aucune logique. En contexte *ompR* et *ompR opgG*, l'activité de la fusion ne varie pas quelle que soit l'osmolarité du milieu et correspond à l'activité de la fusion en milieu M63 respectivement en contexte sauvage et *opgG*. Ces dosages montrent donc que le système EnvZ-OmpR est sensible à la concentration des OPG.

De même, l'activité de la fusion *spy-uidA* en contexte sauvage suit une courbe en cloche où le maximum de l'activité est atteint en milieu minimum (Fig. 32). En contexte *opgG*, *cpxR* et *cpxR opgG*, l'activité de la fusion ne varie pas de manière significative. Il est à noter que le gène *spy* est réprimé par le système CpxAR chez *D. dadantii* alors que ce gène est activé chez d'autres bactéries tels que *E. coli*, *S. enterica* [97, 228]. Enfin, quel que soit le contexte génétique ou l'osmolarité, l'activité de la fusion *hrpN-uidA* ne varie pas.

Seul le gène *ompF*, et donc le système EnvZ-OmpR, est affecté par la perte d'OPG. Tout d'abord, nous nous sommes demandé quel était l'impact des OPG sur le système EnvZ-OmpR. Est-ce une réponse On/Off ou une fine régulation comme dans le cas du système RcsCDB ? Ensuite, le système CpxAR n'est pas activé par la perte des OPG. Cependant, les OPG sont des molécules présentées comme structurantes [14]. Quel est l'effet de la perte des OPG sur l'ultrastructure de l'enveloppe ?

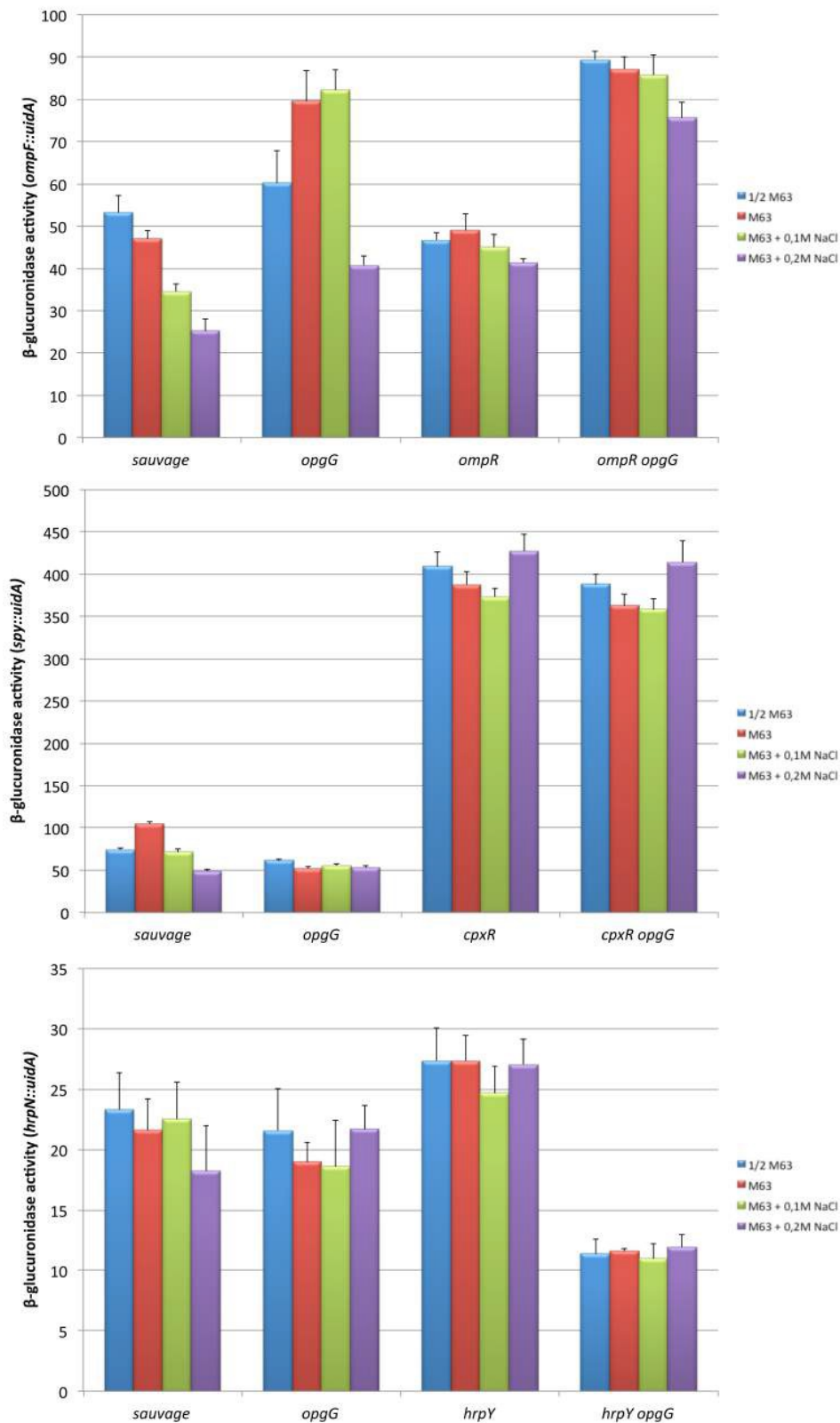


Figure 32 : Expression des fusions *ompF-uidA*, *spy-uidA* et *hrpN-uidA* cultivées en milieu minimum M63 dilué ou non, complémenté ou non par du NaCl afin d'obtenir des milieux d'osmolarités différentes. Les bactéries ont été cultivées jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance puis l'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée avec du PNPu comme substrat.

## 2.6 Le niveau d'activation du système EnvZ-OmpR ne répond à la concentration des OPG mais à leur absence/présence.

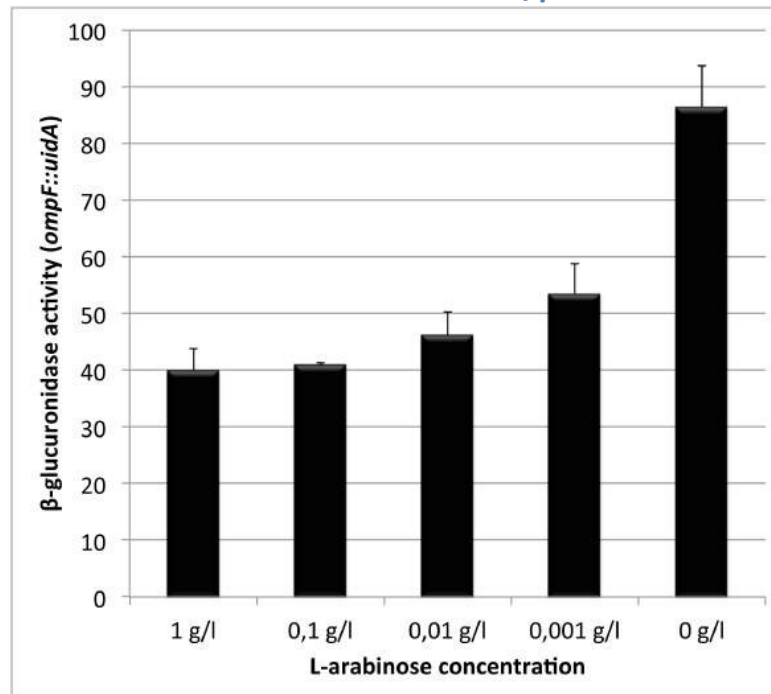


Figure 33 : Expression de la fusion *ompF-uidA* cultivée en milieu minimum M63 avec différentes concentrations de L-arabinose. Les bactéries ont été cultivées jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance puis l'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée à l'aide de PNPU comme substrat.

Afin de savoir si la variation de la concentration en OPG affecte le niveau d'activation du système EnvZ-OmpR, nous avons utilisé de nouveau la souche *ara-strain* où les OPG sont sous contrôle du promoteur  $P_{BAD}$ . Dans cette souche, la concentration en OPG dépend de la concentration en L-arabinose du milieu (Figure 24). Le niveau d'expression de la fusion transcriptionnelle *ompF-uidA* a été évalué en milieu M63 à différentes concentrations de L-arabinose (Fig. 33). A 0 g/l de L-arabinose, le niveau d'expression de la fusion *ompF-uidA* en contexte « *ara strain* » est similaire à celui obtenu précédemment en M63 en contexte *opgG* (Fig. 32). De 0,001 g/l à 1 g/l, le niveau d'expression de la fusion ne présente pas de grande variation et montre un niveau d'expression similaire à celui mesuré en contexte sauvage (Fig. 32). Ce résultat suggère donc le système EnvZ-OmpR est activé par l'absence d'OPG mais n'est pas influencé par la concentration en OPG.

## 2.7 Un mutant *opgG* ne présente pas de perturbation de l'enveloppe bactérienne.

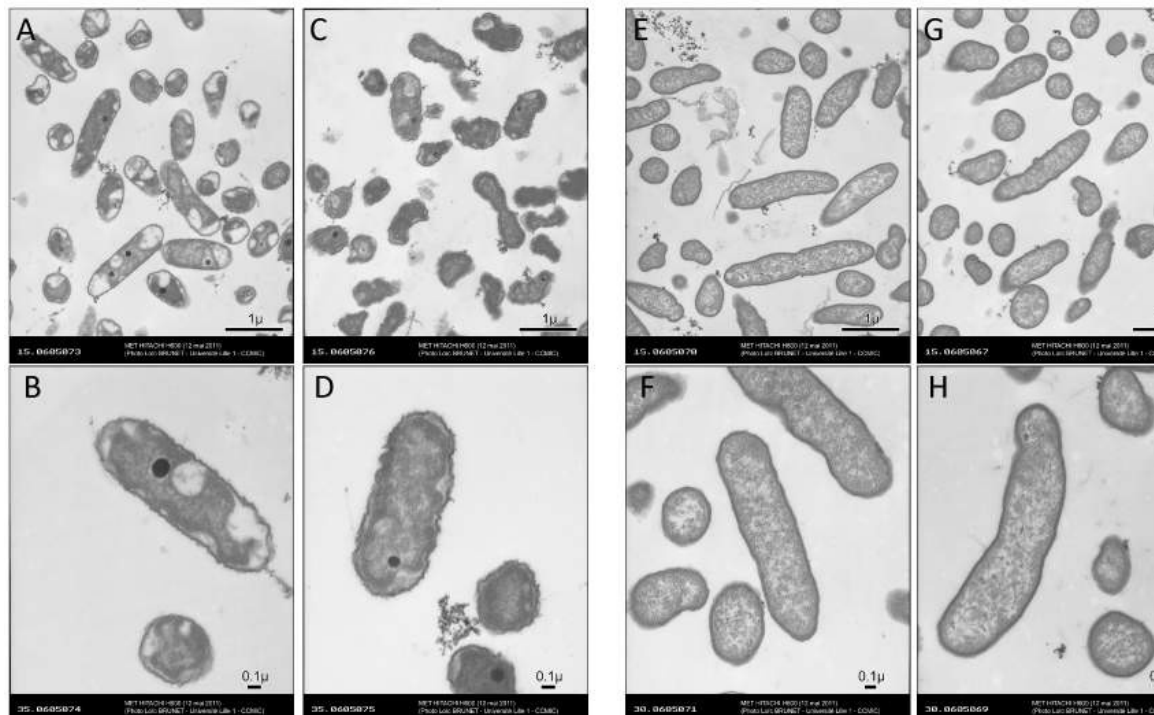


Figure 34 : Microscopie électronique à transmission réalisée sur un Hitachi H600 de la souche sauvage à basse osmolarité (LOS, A et B) et à haute osmolarité (LOS + 0,3M de NaCl, E et F) ainsi que du mutant *opgG* à basse osmolarité (C et D) et à haute osmolarité (G et H).

Les précédentes études sur les OPG suggèrent que la perte de ces glucanes conduit à une forte perturbation de l'enveloppe. Cependant, nous venons de voir que le système CpxAR, impliqué dans la perception du stress de l'enveloppe, n'était pas affecté par la perte des OPG. Aussi, nous nous sommes demandé quel était l'état de l'enveloppe. Nous avons donc observé en microscopie électronique à transmission l'état des cellules. La souche sauvage (EC3937, Fig. 34, A, B, E et F) et le mutant *opgG* (NFB3500, Fig. 34, C, D, G et H) ont été cultivés dans un milieu de basse osmolarité (LOS, Fig. 34 A à D) et dans un milieu de haute osmolarité (LOS + 0,3M NaCl, Fig. 34 E à H). On peut observer qu'aussi bien à haute qu'à basse osmolarité, il n'y a de différences marquantes entre la souche sauvage et le mutant *opgG*. Par contre, à basse osmolarité (Fig. 34 A à D), nous constatons que les cellules présentent un aspect inhabituel. Les cellules présentent des granules denses aux électrons de nature inconnue. Notre première idée fut la présence de granules de poly-phosphate puisque la capacité des bactéries à accumuler des poly-phosphates est assez bien décrite dans la littérature [229-231]. Généralement, ces derniers apparaissent blancs en microscopie électronique à transmission excepté dans le cas de poly-phosphates de fer [232]. Ils sembleraient donc que ces granules soient plutôt des

poly-phosphates de fer. De plus, l'aspect des bactéries montre bien un manque d'adaptation à la basse osmolarité de *D. dadantii*.

## 2.8 Un mutant *opgG* présente un profil de protéines similaire à la souche sauvage.

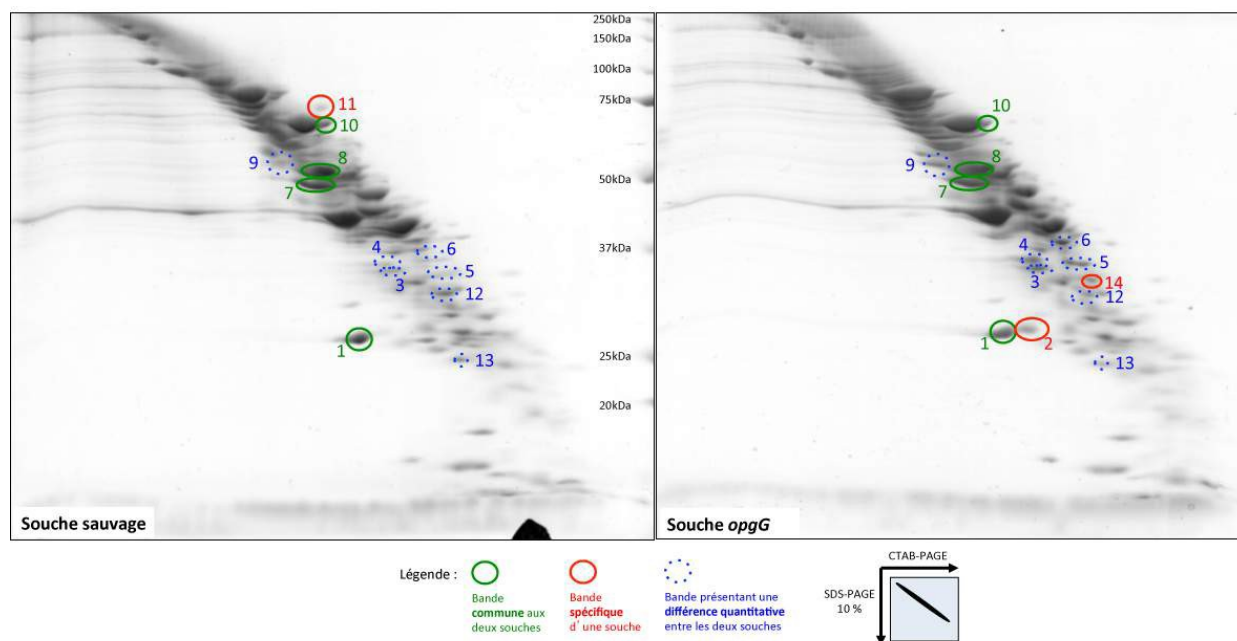


Figure 35 : Protéomique des membranes des souches sauvage et *opgG*.

Visuellement l'enveloppe bactérienne ne semble pas être perturbée, nous sommes alors intéressés aux protéines présentes dans les membranes. Le Dr Christophe Tastet a donc réalisé une protéomique non conventionnelle. En effet, dans la première dimension comme la seconde, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire. Bien que le CTAB-PAGE et le SDS-PAGE séparent selon le poids moléculaire, une dispersion significative des protéines peut être observée de part et d'autre de la diagonale. Cet effet peut s'expliquer par une différence d'affinité de chaque détergent pour les protéines. Il en résulte des mobilités électrophorétiques altérées dans les deux dimensions [233]. Les deux souches présentent un profil identique montrant qu'il n'y a pas de perturbation réelle (Fig. 35) de la membrane au niveau protéique. Nous avons alors décidé d'identifier 14 spots soit présents dans les deux souches afin de vérifier la présence de protéine uniquement d'origine membranaire, soit présents spécifiques d'une souche, soit présents dans les deux souches mais présentant une différence quantitative. La principale difficulté était de pouvoir isoler chaque protéine présente dans un spot. Pour cette raison, nous avons utilisé une spectrométrie de masse de type nano-LC-MS/MS, idéale pour un échantillon complexe. Les spots 1, 7, 8 et 10 ont



montré la présence uniquement de protéines des membranes ou associées aux membranes. Les principales catégories de protéines affectées dans le mutant *opgG* sont impliquées dans le transport (30%) et le métabolisme (33%) (Fig. 36). Cette protéomique membranaire corrélée à la protéomique cellulaire comparative entre la souche sauvage et le mutant *opgG* 219 nous montre que les modifications ont lieu au niveau cellulaire et non membranaire.

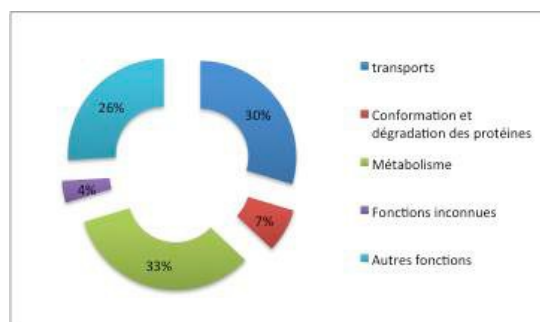


Figure 36: Représentation des cinq principales catégories de protéines modifiées chez le mutant *opgG*.

## 2.9 Discussion

Connaissant la relation entre le système RcsCDB et la concentration périplasmique en OPG, et sachant qu'il existe trente-deux systèmes à deux composants chez *D. dadantii*, nous nous étions demandé si d'autres systèmes à deux composants étaient activés par la perte d'OPG. Aussi, nous nous sommes intéressés aux systèmes suivants EnvZ-OmpR, CpxAR, GacAS, HrpXY et NarXL. Alors que l'inactivation d'aucun système ne permet la restauration de la virulence du mutant *opgG*, l'inactivation du régulateur *cpxR* en contexte sauvage conduit à une perte de virulence totale. Par contre, le suivi de l'expression du gène *ompF*, régulé par le système EnvZ-OmpR, montre que ce système est affecté par la perte d'OPG (Fig. 30 et 31). Il serait intéressant de voir si cet effet au niveau du gène est retrouvé au niveau protéique en observant dans la souche sauvage et le mutant *opgG* s'il y a des modifications de la quantité de porine.

Le second résultat intéressant est l'absence de perturbation de l'enveloppe. Longtemps, le phénotype pléiotrope des OPG était expliqué par l'hypothèse suivante: la perte d'OPG provoque une lourde perturbation de l'enveloppe. Cette hypothèse avait déjà été mise à mal par la découverte de révertants possédant une mutation dans EnvZ-OmpR chez *E. coli* [42] ou dans RcsCDB chez *D. dadantii* [61]. Par contre, chez le mutant *opgG*, les modifications de l'enveloppe se situent au niveau des structures comme du LPS et des acides gras des membranes [234] et plus loin des exopolysaccharides.

### 3. Place des glucanes périplasmiques osmorégulés parmi les régulateurs de la virulence

Comme décrit dans l'introduction, un défaut de synthèse d'OPG chez *D. dadantii* conduit à une perte totale de virulence. La restauration partielle de la virulence dans un double mutant *rscC2 opgG* [61] nous indique que le rôle moléculaire des OPG n'est pas totalement compris. L'absence de virulence du mutant *opgG* est corrélée à une perturbation de la synthèse de nombreux facteurs de virulence (motilité, pectinases, cellulases, etc.). Or chez cet organisme, ces différents facteurs sont soumis à la régulation par PecS, PecT, KdgR (Cf. Introduction). Dans cette étude, le but est d'analyser le lien entre les OPG et les trois régulateurs majeurs de la virulence.

#### 3.1 L'inactivation des régulateurs de la virulence *pecS*, *pecT* et *kdgR* en contexte *opgG* restaure la sécrétion de pectinases indispensables à la virulence.

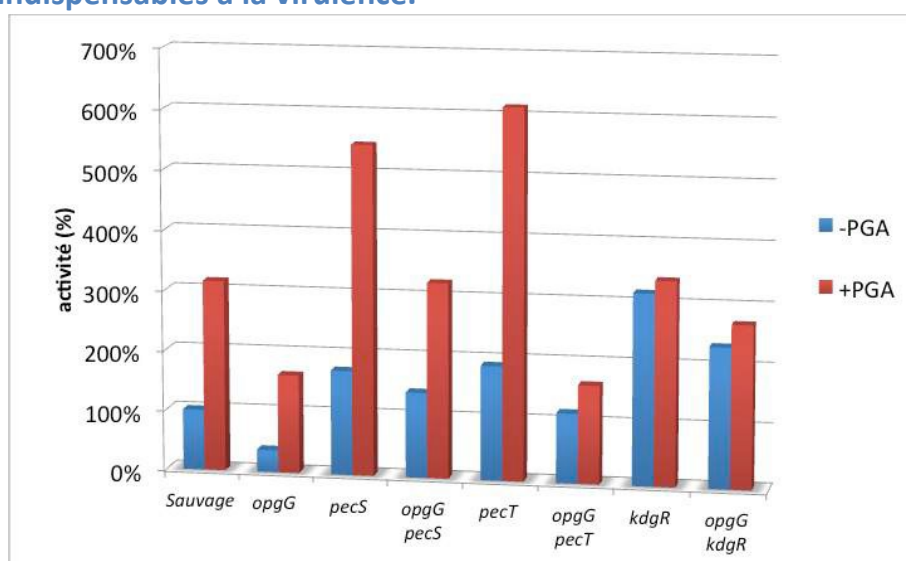


Figure 37 : Mesure de l'activité des pectate-lyases sécrétées dans le milieu de culture rapportée à la souche sauvage en absence d'inducteur (100%). Les cultures sont réalisées en milieu 63 + glycérol (0,2%) à 28°C jusqu'en phase stationnaire en présence (+PGA) ou non d'inducteur (-PGA). PGA : polygalacturonate (0,4%).

Après construction des différents doubles mutants, la production de pectinases a été mesurée dans les différents contextes génétiques lors de culture induite (+PGA) ou non (-PGA) par un composé pectique : le polygalacturonate (Fig. 37). L'analyse des données (Fig. 37) confirme que le mutant *opgG* présente toujours une activité fortement réduite par comparaison avec la souche sauvage et ce en conditions non-induite (37%) comme induite (163%). En revanche, après induction par du PGA, les souches sauvage et *opgG* présentent un niveau d'induction de la sécrétion de

pectinases d'un facteur 3,2 et 4,4 respectivement, ce qui prouve que la synthèse de pectinases est toujours inducible par les composés pectiques chez le mutant *opgG*. Les mutants *pecS*, *opgG pecS* et *pecT* présentent un niveau de production très important, 173%, 141% et 190% respectivement, par rapport à une souche sauvage en condition non-induite. Le niveau d'induction progresse en présence de PGA dans le milieu de culture d'un facteur 3, 2,3 et 3,2 respectivement. Par contre, les mutants *opgG pecT*, *kdgR* et *opgG kdgR* présentent un niveau de production très élevé (116%, 318% et 234% respectivement par rapport à une souche sauvage en condition non induite) et un facteur d'induction de 1,4, 1,1 et 1,2 respectivement ce qui montre que la synthèse de pectinases chez ces mutants n'est plus que faiblement inducible par les composés pectiques.

	sauvage	<i>opgG</i>	<i>pecS</i>	<i>opgG pecS</i>	<i>pecT</i>	<i>opgG pecT</i>	<i>kdgR</i>	<i>opgG kdgR</i>
Motilité	+	-	++	-	+	+	+	+
Mucosité	-	+	-	-	-	-	-	-

Tableau 3 : Motilité et Mucosité pour la souche sauvage (EC3937), les mutants *opgG* (NFB3723), *pecS* (A3953), *opgG pecS* (NFB7196), *pecT* (A2148), *opgG pecT* (NFB7362), *kdgR* (A4114) et *opgG kdgR* (NFB7299). La motilité et la mucosité ont été observées respectivement sur milieu LB agar 0,4% et sur milieu gélosé M63---glucose.

La mucosité et la motilité ont été observées respectivement sur milieu gélosé M63-glucose et LB agar 0,4% (Tableau 3). Toutes les souches étudiées excepté le mutant *opgG* forment des colonies d'aspect non mucoïde par opposition au mutant *opgG*. En revanche, le double mutant *opgG pecS* est non motile comme la souche *opgG* alors que la souche *pecS* est plus motile que la souche sauvage. Les mutants *pecT*, *opgG pecT*, *kdgR* et *opgG kdgR* montrent une motilité similaire à celle de la souche sauvage. L'inactivation de *pecS* dans une souche *opgG* ne restaure donc pas la motilité.

### 3.2 L'inactivation de *pecS* dans une souche *opgG* restaure la virulence en tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive.

Après l'étude des trois facteurs de virulence précédent (sécrétion de pectinases, motilité et mucosité), il nous restait à étudier in planta la capacité de nos doubles mutants *opgG pecT*, *opgG kdgR* et *opgG pecS* à développer la maladie. L'inactivation de *pecT* ou de *kdgR* en contexte *opgG* permet de restaurer la virulence uniquement en tubercule de pomme de terre (résultats non montrés).

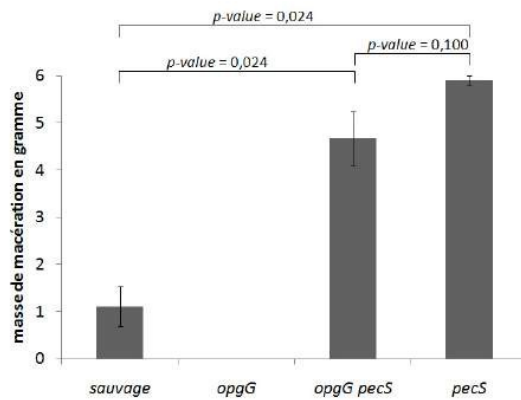


Figure 38 : Masse de la macération (en g) en tubercule de pomme de terre de la souche sauvage (EC3937), des mutants *opgG* (NFB3723), *pecS* (A3953) et *opgG pecS* (NFB7196). Ces résultats correspondent à un inoculum de 107 bactéries après une incubation de 72h à 28°C. Les barres d'erreur reflètent la déviation standard. Les *p*-value ont été obtenues par un test de Wilcoxon Mann Whitney à l'aide du logiciel Xlstat.

Comme attendu, le mutant *opgG* est non virulent aussi bien en tubercule de pomme de terre (Fig. 38) que sur feuille d'endive (Fig. 39) contrairement à la souche sauvage. Le mutant *pecS* présente comme prévu une virulence accrue en tubercule de pomme de terre (Fig. 38) comme sur feuille d'endive (Fig. 39). Le double mutant *opgG pecS* s'avère également virulent en tubercule de pomme de terre (Fig. 38) et sur feuille d'endive (Fig. 39). L'inactivation de *pecS* dans une souche *opgG* restaure donc la virulence en tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. Néanmoins, si le mutant *pecS* présente une induction de la virulence en tubercule de pomme de terre près de 6 fois supérieure à celle de la souche sauvage (Fig. 38), le double mutant *opgG pecS* ne présente plus qu'une induction d'un facteur 4,5 (Fig. 38). De plus, comme on peut le constater lors des expériences de virulence en endive (Fig. 39), la vitesse de colonisation du double mutant *opgG pecS* est identique à celle de la souche sauvage mais inférieure au mutant *pecS*.



Figure 39 : Evolution de la macération de la souche sauvage (EC 3937), des mutants *opgG* (NFB 3723), et *pecS* (A 3953) et du double mutant *opgG pecS* (NFB 7196) en endive. L'incubation est réalisée à 28°C avec un inoculum de  $10^7$  bactéries.

### 3.3 Le mutant dépourvu d'OPG montre une résistance accrue au stress oxydatif

L'inactivation du gène *pecS* conduit à la dérégulation de l'opéron *indABC* codant la synthèse d'un pigment bleu, l'indigoïdine, putativement impliqué dans la résistance au stress oxydatif [203]. Ainsi un mutant *pecS* synthétise en grande quantité ce pigment alors que pour une souche sauvage et un mutant *opgG*, aucune pigmentation n'est décelable (Fig. 40). On peut observer, Fig. 40, que le double mutant *opgG pecS* produit de l'indigoïdine en quantité équivalente à celle de la souche *pecS*. Il est à noter que cette production de pigment par les mutants *pecS* et *opgG pecS* s'observe aussi bien en culture liquide (Fig. 40) que lors du développement de la maladie *in planta* (Fig. 39).

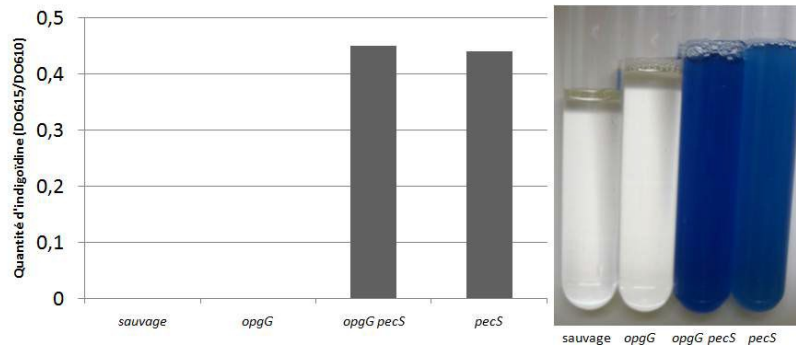


Figure 40 : Quantité d'indigoïdine synthétisée par les différentes souches de *D. dadantii*. Les cultures ont été réalisées en M63 + glycérol. (A gauche) Les valeurs correspondent à la quantité d'indigoïdine en fonction de la densité cellulaire. (A droite) DMSO contenant l'indigoïdine après extraction. On constate que seules les souches pour lesquelles le gène *pecS* est inactivé produisent de l'indigoïdine.

L'absence de virulence *in planta* des mutants *opgG* peut s'expliquer par une sensibilité plus importante de ces mutants aux mécanismes de défenses de la plante et notamment les ROS (pour Reactive Oxygen Species). Afin de vérifier cette hypothèse, la capacité de résistance au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) des 4 souches a été testée (Fig. 41).

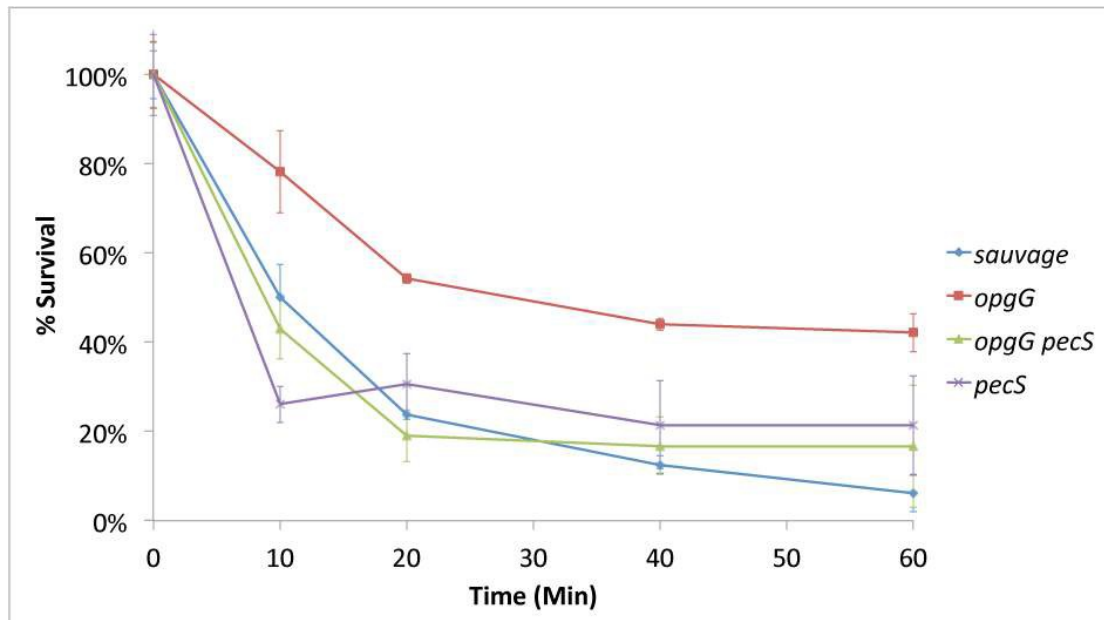


Figure 41 : Détermination du pourcentage de survie de souches de *D. dadantii* en présence de 6 mM d' $H_2O_2$ . Au cours du temps, un aliquot de la culture est prélevé et étalé pour dénombrement sur milieu LB. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport à l'étalement sur milieu LB après 0 min d'incubation.

Les 4 souches testées s'avèrent sensibles à la présence de 6 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'environnement cellulaire et on observe dans chaque cas une rapide diminution du nombre de bactéries viables (Fig. 41). Néanmoins, si la souche sauvage et les deux mutants *pecS* et *opgG pecS* voient leur population décroître jusque 20% de la population initiale en moins de 20 minutes d'incubation, le mutant *opgG* conserve plus de 40% de survie même au-delà d'une heure d'incubation. Le mutant *opgG* est donc plus résistant au stress oxydatif que la souche sauvage mais aussi de façon plus surprenante que les mutants *pecS* et *opgG pecS*.

### 3.4 Le double mutant *opgG pecS* est incapable de former une pellicule

Cultivée à 28°C sans agitation, la souche sauvage forme en 48h un biofilm, appelé pellicule, à l'interface air-liquide [235]. Des expériences menées au sein du laboratoire ont montré que la souche *opgG* en était incapable. Testées dans les mêmes conditions, la souche *pecS* forme également une pellicule caractérisée par la présence de pigment bleu (indigoïdine) tandis que le double mutant *opgG pecS* ne développe pas de pellicule (Fig. 42).

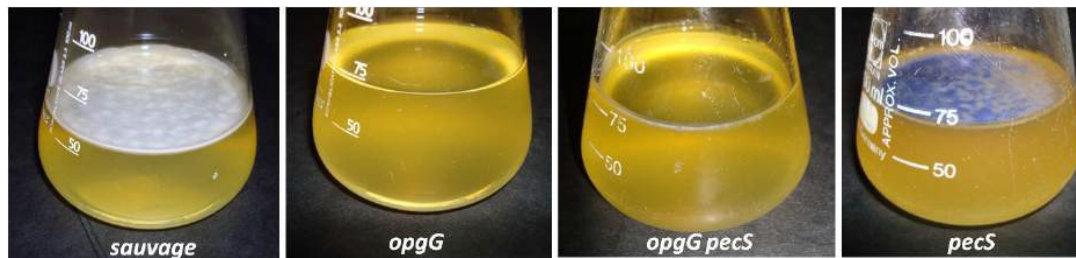


Figure 42 : Formation de pellicule après 48h d'incubation en milieu SOBG à 28°C sans agitation.

### 3.5 L'inactivation de l'harpine *hrpN* dans un mutant *opgG* ne restaure aucun phénotype

La virulence retrouvée du double mutant *opgG pecS* ne peut pas se résumer à une simple dérégulation généralisée de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes. De fait, la virulence des bactéries phytopathogènes repose sur la variation d'expression de gènes de virulence mais aussi de gènes d'avirulence, ces derniers activant les systèmes de défense de la plante hôte. Dans une souche *pecS*, l'harpine HrpN (Cf. introduction) est réprimée. Or cette harpine est connue pour être le principal éliciteur des défenses de la plante. La virulence du double mutant *opgG pecS* serait donc le fruit d'un côté d'une sécrétion abondante d'exoenzymes et de l'autre d'une faible induction des défenses de la plante. La surexpression de cette harpine HrpN pourrait être une conséquence supplémentaire de l'absence d'OPG et pourrait participer au phénotype non-virulent des mutants *opgG*. Afin de vérifier cette hypothèse, le gène *hrpN* a été inactivé en contexte *opgG*.

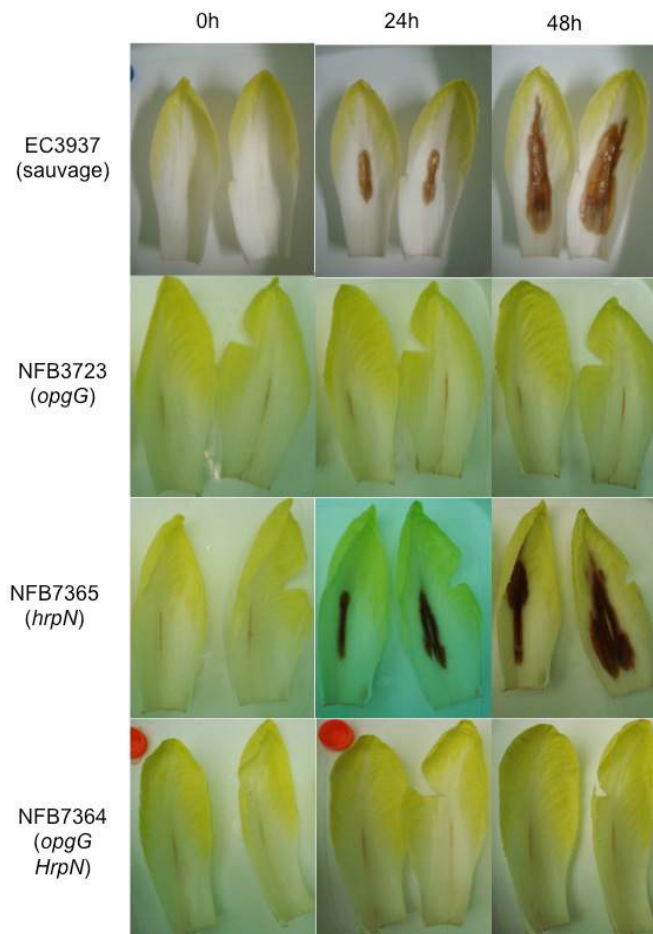


Figure 43 : Evolution de la macération de la souche sauvage (EC 3937), des mutants *opgG* (NFB 3723), et *hrpN* (NFB7365) et du double mutant *opgG hrpN* (NFB7364) en endive. L'incubation est réalisée à 28°C avec un inoculum de  $10^7$  bactéries.

Comme précédemment, le mutant *opgG* est non virulent en opposition à la souche sauvage (Fig. 43). L'inactivation du gène *hrpN* en contexte sauvage n'a pas d'impact sur le développement de la maladie de la pourriture molle. Par contre, l'inactivation du gène *hrpN* en contexte *opgG* ne permet pas de restaurer la virulence (Fig. 43).

Suite à ce résultat surprenant, nous avons procédé au dosage de l'expression du gène *hrpN* en contexte *opgG*, à haute et basse osmolarité (Fig. 44). En milieu LB, il n'y a pas de différence dans l'activité de la fusion *hrpN* quelque soit le contexte génétique.

En milieu LB-NaCl, l'osmolarité est faible donc la concentration d'OPG augmente. On voit que la baisse d'osmolarité entraîne la baisse de l'activité spécifique de la  $\beta$ -glucuronidase, chez le mutant *hrpN*. Cependant des résultats similaires sont observés avec le mutant *opgG hrpN* donc la baisse d'expression de *hrpN* n'est pas due à une régulation en fonction de la concentration en OPG. L'osmolarité semble néanmoins avoir un effet sur l'expression du gène *hrpN*.



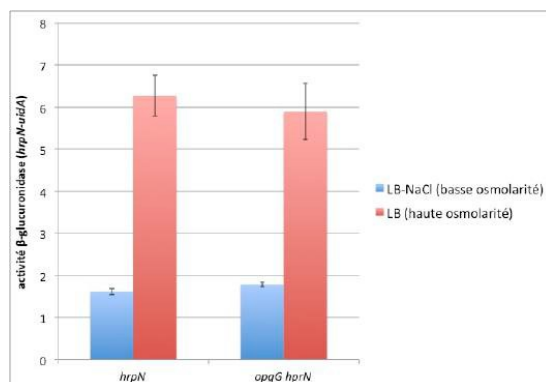


Figure 44 : Mesure de l'expression du gène *hrpN* en contexte sauvage (NFB7365) et en contexte *opgG* (NFB7364). Les bactéries ont été cultivées en milieu LB (haute osmolarité) ou LB-NaCl (faible osmolarité) jusqu'en phase exponentielle de croissance.

### 3.6 Discussion

La restauration partielle de la virulence dans un double mutant *rscC2 opgG* nous indique que le rôle moléculaire des OPG n'est pas totalement compris. Dans cette étude, le but était d'analyser le lien entre les OPG et les trois régulateurs majeurs de la virulence : PecS, PecT et KdgR. Après l'inactivation de chacun de ces régulateurs en contexte *opgG*, l'étude phénotypique nous a montré une restauration partiellement de la virulence pour les mutants *opgG pecT* et *opgG kdgR* alors que le mutant *opgG pecS* est virulent en tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. La présence de pectinases à elle seule justifie l'apparition de macération en tubercule de pomme de terre [236, 237]. Dans les doubles mutants *opgG pecT* et *opgG KdgR*, ces pectinases sont fortement exprimées. Par contre, ces deux doubles mutants ne parviennent pas à développer la maladie de la pourriture molle sur feuille d'endive. Ces résultats ne sont pas surprenants les travaux de co-inoculation in planta du mutant *opgG* avec une souche sauvage ont montré que, bien que viable, le mutant *opgG* ne pouvait pas se multiplier grâce aux enzymes sécrétées par la souche sauvage [40]. La restauration de la virulence du double mutant *opgG pecS* ne peut donc pas s'expliquer simplement par la dépression de la synthèse de pectinases.

Alors que la souche *opgG pecS* synthétise de l'indigoïdine, pigment impliqué dans la résistance aux ROS [203], ce double mutant n'est pas aussi résistant qu'une souche *opgG* au stress oxydatif. Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré qu'un mutant *opgG* présentait une activation constitutive des gènes de réponse aux stress [37] ce qui explique probablement le plus haut niveau de résistance au stress oxydatif de ces mutants. Que le double mutant *opgG pecS* se révèle donc plus sensible au stress oxydatif que le mutant *opgG* laisse donc supposer que chez le double mutant le niveau d'activation de certains gènes de réponse au stress est redevenu normal.

La virulence retrouvée du double mutant *opgG pecS* ne peut donc pas être le fruit d'une simple dérégulation généralisée de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes. Ce constat nous a amené à nous intéresser à l'harpine HrpN, connue pour être le principal éliciteur des défenses de la plante. En effet, la virulence des bactéries repose sur le dialogue moléculaire entre l'hôte et la bactérie. Le dosage de la fusion *hrpN::uidA* corrélé à une analyse phénotypique n'a pas montré de lien entre les OPG et l'harpine HrpN.

Notre bactérie stressée constitutivement se montre plus résistante au stress oxydatif. Puisque le régulateur PecS n'est pas un simple régulateur de la virulence comme PecT et KdgR mais un régulateur complexe régulant divers processus cellulaires, une question s'impose : le mutant *opgG* n'a-t-il pas induit toutes les réponses au stress ce qui gênerait l'inactivation des régulateurs de la virulence ? Dans le double mutant *opgG pecS*, ces mécanismes de réponses au stress seraient revenus à un état normal expliquant la restauration de la virulence. De plus amples investigations sont nécessaires pour répondre à cette question.

Nous pouvons retenir que le mutant *opgG* présente une perturbation complexe des réseaux de régulation impliqués dans le dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. Notre bactérie présente une altération dans ses interactions avec l'environnement ce qui conduit à un trouble des réseaux internes de régulation de la bactérie que nous pouvons par anthropomorphisme qualifier d'autisme.

## 4. *opgC* code une protéine transmembranaire nécessaire à la succinylation des OPG et est régulé par le phosphorelais RcsCDB chez *Dickeya dadantii*

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le Dr Edwige Madec.

La spectrométrie de masse a été réalisée par le Dr Catherine Robbe-Masselot (UMR 8576 CNRS-Lille1).

Chez *D. dadantii*, en sus des gènes de l'opéron *opgGH*, deux autres gènes semblent impliqués dans la synthèse des OPG. En effet, une étude précédente sur la structure des OPG a permis de mettre en évidence deux substituants : des résidus succinyles trouvés uniquement à haute osmolarité et des résidus acétyles en quantité constante quelle que soit l'osmolarité [16]. Il existe chez d'autres entérobactéries comme *E. coli* des gènes de substitutions des OPG. Ces gènes ont été trouvés à l'aide de divers cribles génétiques.

### 4.1 Identification du gène *opgC* codant la succinyl-transférase chez *D. dadantii*

Comme chez *D. dadantii*, les OPG de *E. coli* sont substitués par des résidus succinyles. La recherche d'un orthologue du gène *opgC* d'*E. coli* dans le génome de *D. dadantii* n'a pas permis d'identifier ce gène dans notre modèle. Des lors, nous avons mené une recherche de gènes candidats selon des critères de ressemblance structurale avec la succinyl-transférase d'*E. coli* : une protéine intrinsèque de membrane avec 10 segments transmembranaires portant un domaine acyl-transférase. Nous avons ainsi pu identifier trois gènes candidats : ABF0020261, ABF0020770 et ABF0016719.

Suite à l'inactivation de ces gènes, les OPG ont été extraits. Les résidus succinyles des OPG ont été quantifiés à l'aide d'un kit commercial (Boehringer). La souche sauvage (EC3937) ainsi que les mutants ABF0020770 (NFB7306) et ABF0016719 (NFB7307) montrent la présence de résidus succinyles sur les OPG respectivement à hauteur de  $21,58 \pm 0$ ,  $23,38 \pm 7,63$  et  $28,5 \pm 5,1$ . Par contre le mutant ABF0020261 (NFB7305) ne montrent pas de trace de résidus de succinyles. Afin de confirmer ce résultat, les OPG de ce mutant ont été analysés en spectrométrie de masse par le Dr Catherine Robbe-Masselot. Le spectre de masse de la souche sauvage (EC3937) montre des OPG de différents degrés de polymérisation avec un incrément de 100 Da s'ils sont succinylés ou de 42 Da s'ils sont acétylés (Fig. 45). Nous pouvons observer que dans le mutant (NFB7305) l'incrément de 100 Da correspondant au pic des OPG substitués par les résidus succinyles n'est plus présent. Par contre ce pic est à nouveau présent si on complémente la souche par le gène ABF0020261 (NFB7326). Ce gène code donc la succinyl-transférase.

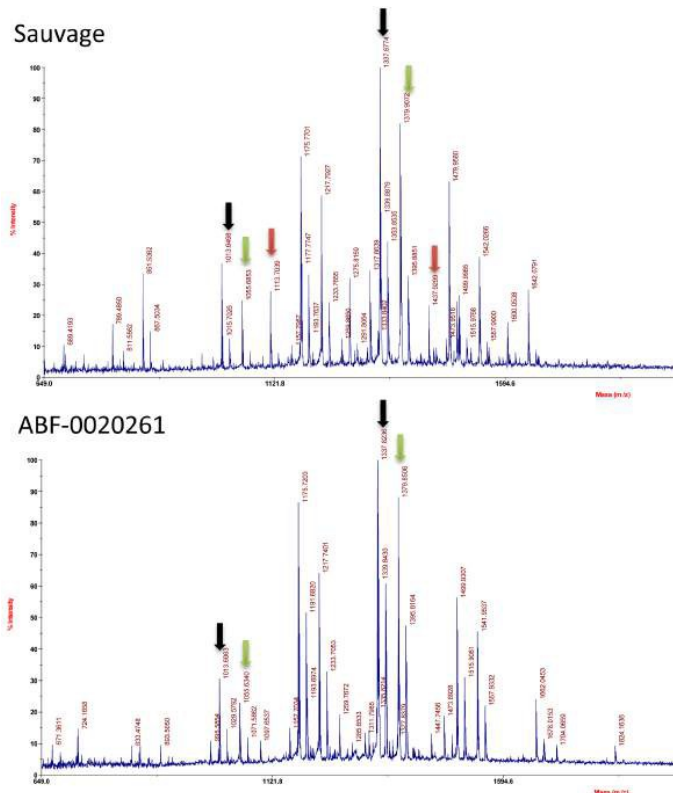


Figure 45 : Spectre de masse des souches sauvage (EC3937) et *opgC* (NFB7305). La flèche noire montre un exemple de pic d’OPG non substitué, la flèche verte des OPG acétylés et la flèche rouge des OPG succinylés.

## 4.2 Analyse phylogénétique d’OpgC

souche	gene(s)	<i>opgGH</i>		<i>opgC</i>		<i>opgB</i>	<i>opgE</i>	osmolarité du milieu	
		<i>E. coli</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>E. coli</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	basse	haute
<i>D. dadantii</i>	EC3937	-	+	-	+	-	-	/	succinate
	NFB7305	-	+	-	-	-	-	/	/
	NFB7431	+	-	-	+	-	-	/	succinate
	NFB7430	+	-	+	-	-	-	succinate	succinate
<i>E. coli</i>	JM83	+	-	+	-	+	+	succinate	succinate
	NFB4570	+	-	-	+	-	-	succinate	succinate
	NFB4571	+	-	+	-	-	-	succinate	succinate
	NFB4572	+	-	-	+	-	+	succinate	succinate
	NFB4573	+	-	-	+	-	+	succinate	succinate
	NFB4574	+	-	-	+	+	+	succinate	succinate
	NFB4575	-	+	+	-	-	-	succinate	succinate
NFB4548	+	-	-	-	-	-	/	/	

Tableau 4 : Récapitulatif des différents spectres réalisés sur divers contextes de souches d’*E. coli* et de *D. dadantii* cultivées à haute osmolarité (milieu LOS + 0,3M de NaCl) ou à basse osmolarité (milieu LOS).

La protéine OpgC<sub>DD</sub> de *D. dadantii* présente une faible identité avec les protéines OpgC<sub>EC</sub> (44 %) et OpgC<sub>RS</sub> (44 %), respectivement chez *Escherichia coli* et *Rhodobacter sphaeroides*. Nous avons alors entrepris une analyse phylogénétique d’OpgC. La figure 46 présente trois arbres phylogénétiques obtenus par la méthode du

maximum de parcimonie pour les protéines OpgG, OpgH et OpgC (Fig. 46). Trois cellulases synthases issues des cyanobactéries ont été utilisées pour enracer les arbres dans le cas d'OpgG et OpgH et trois acyl-transférases issues des cyanobactéries ont été utilisées dans le cas d'OpgC. Les arbres d'OpgG et d'OpgH sont particulièrement similaires. A l'inverse, notre analyse révèle clairement deux groupes d'orthologues, un autour d'*E. coli* et un autour de *D. dadantii* 3937. Au vu de cette différence de répartition pour OpgC, nous nous sommes alors demandé s'il pouvait y avoir complémentarité fonctionnelle. Nous avons alors construit différentes combinaisons de souches de *D. dadantii* et d'*E. coli* avec l'opéron *opgGH* ou le gène *opgC* de ces deux espèces. Ces souches ont été cultivées à haute et basse osmolarité, puis les OPG de ces souches ont été extraits et analysés en spectrométrie de masse (Tableau 4). Les OPG de la souche sauvage (EC3937) comme ceux de la souche de *D. dadantii* avec *opgGH<sub>EC</sub> opgC<sub>DD</sub>* (NFB7431) présentent des résidus succinyles uniquement à haute osmolarité (Tableau 4). A contrario, la souche de *D. dadantii* *opgGH<sub>EC</sub> opgC<sub>EC</sub>* présente des résidus succinyles quelle que soit l'osmolarité du milieu (Tableau 4). Ce résultat suggère que la régulation de la succinylation des OPG a lieu directement au niveau transcriptionnel chez *D. dadantii*. Chez *E. coli*, les différentes combinaisons de gènes montrent des OPG présentant des résidus succinyles quelle que soit l'osmolarité (Tableau 4). Il ne semble donc pas y avoir la même régulation chez *E. coli* que chez *D. dadantii*.

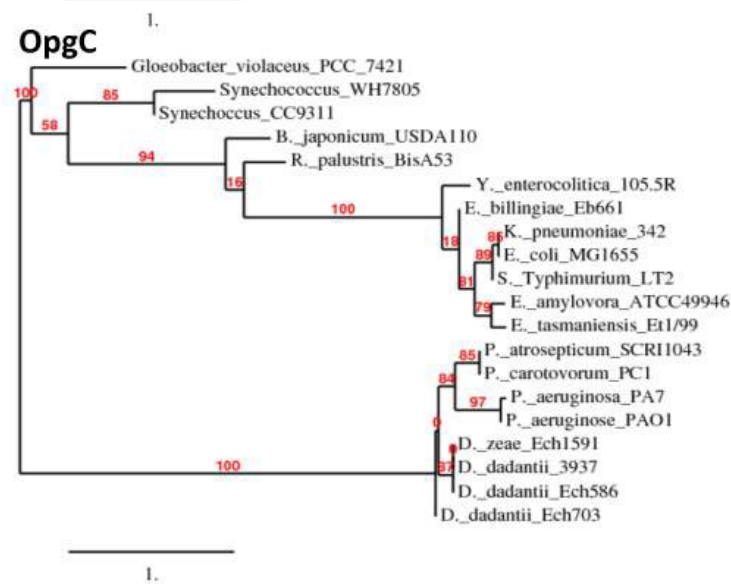
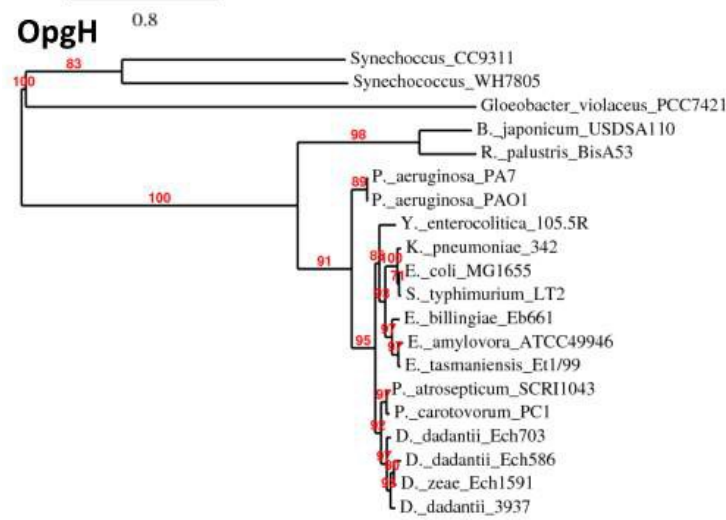
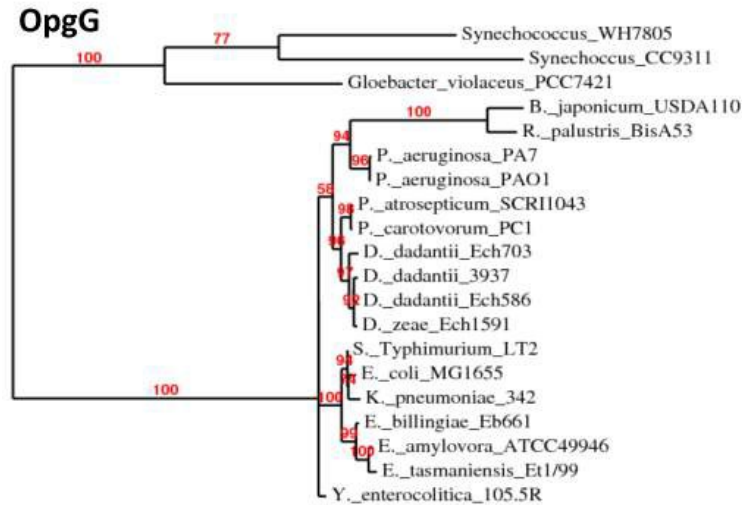


Figure 46 : Arbres phylogénétiques d'homologues d'OpgG, OpgH et OpgC réalisé selon la méthode du maximum de parcimonie (Phylogeny.fr [238]).

### 4.3 Le système phosphorelais RcsCDB régule la succinylation des OPG

Puisque l'osmolarité régule la succinylation des OPG, un système à deux composants impliqué dans la réponse à l'osmolarité ne pourrait-il pas être responsable de cette régulation. Nous avons donc cultivé à basse et haute osmolarité les souches *rscB* (NFB7279) et *ompR* (A4515), respectivement les mutants des régulateurs des systèmes RcsCD/RcsB et EnvZ/OmpR. Alors que dans le mutant *ompR* (A4515), nous observons le même profil que dans la souche sauvage (Résultat non montré). Dans le mutant *rscB*, les OPG ne sont plus succinylés à haute osmolarité (Fig. 47).

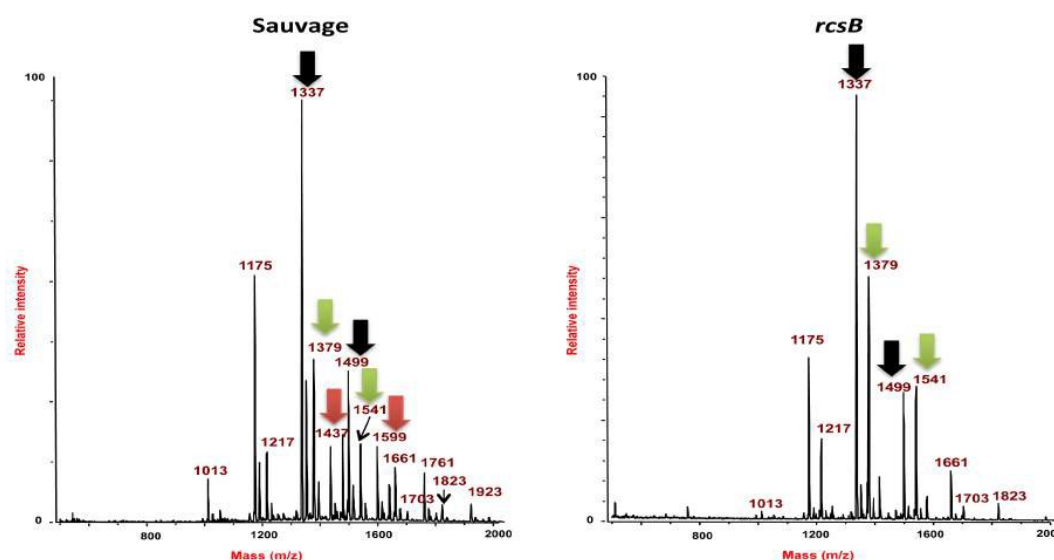


Figure 47 : Spectres de masse des souches sauvage (EC3937) et *rscB* (NFB7279). Les flèches noires montrent un exemple de pic d'OPG non substitué, les flèches vertes des OPG acétylés et les flèches rouges des OPG succinylés.

Nous avons poursuivi notre étude en dosant l'expression d'une fusion transcriptionnelle *opgC::uidA* en contexte sauvage (NFB7459) et *rscB* (NFB7461) (Fig. 48) à basse (LOS) et haute osmolarité (LOS+0,3M). L'expression d'*opgC* en contexte sauvage croît d'un facteur 2,6 entre une culture dans un milieu de basse osmolarité et une culture dans un milieu de haute osmolarité. Un niveau d'induction similaire (2x) est retrouvé pour la souche *rscB*. Par contre, si on s'intéresse au niveau d'expression, on constate que l'activité du gène *opgC* est similaire entre la souche sauvage à basse osmolarité et la souche *rscB* à haute osmolarité. Ce résultat montre que dans le mutant *rscB* l'induction du gène n'est pas perdue mais le gène reste faiblement exprimé à haute osmolarité. Or ce faible niveau d'expression en contexte *rscB* à haute osmolarité ne permet pas une succinylation des OPG.

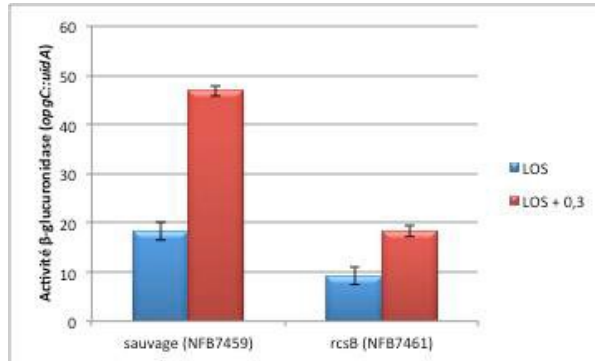


Figure 48 : Expression de la fusion *opgC-uidA* en contexte sauvage (NFB7459) et *rcsB* (NFB7461) en milieu de basse osmolarité (LOS, en bleu) ou en haute osmolarité (LOS + 0,3 M de NaCl, en rouge). Les bactéries ont été cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle, puis l'activité a été mesurée avec du PNPu comme substrat.

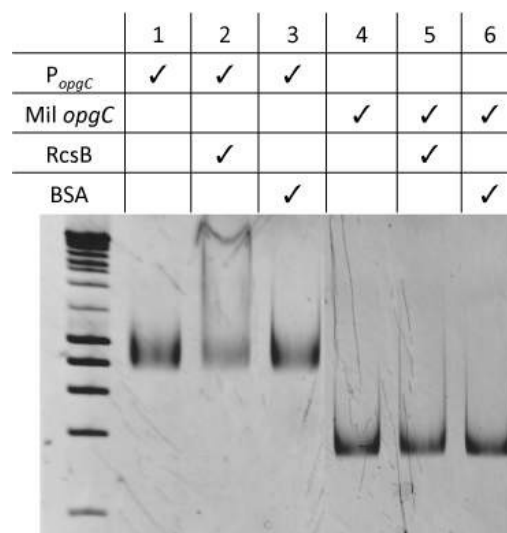


Figure 49 : Gel retard avec la région promotrice du gène *opgC* ( $P_{opgC}$ ) et le milieu de la phase codante du gène *opgC* (Mil *opgC*). La protéine RcsB ou l'albumine de sérum bovin (BSA) ont été utilisées à la concentration de 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Etonnamment, le système RcsCD RcsB régule donc la succinylation des OPG alors même que le niveau d'activation du dit système est régulé par la concentration périplasmique des OPG.

Puisque le régulateur RcsB est un activateur du gène *opgC*, nous nous sommes demandé si ce dernier pouvait se fixer directement en amont du promoteur du dit gène. Le Dr Edwige Madec a donc réalisé des expériences de retard sur gel (Fig. 49). D'un côté, la même séquence du promoteur d'*opgC* qui a permis de réaliser la fusion transcriptionnelle *opgC-uidA* a été utilisée (Fig. 49, lignes 1 à 3), et de l'autre, une partie de la phase codante du gène *opgC* a été utilisée comme témoin négatif (Fig. 49, lignes 4 à 6). Nous pouvons remarquer un retard de migration lorsque le promoteur d'*opgC* est incubé avec la protéine RcsB (Fig. 49, ligne 2). Par contre,



aucun retard n'est observé aussi bien avec le promoteur d'*opgC* incubé ou non avec de la BSA (Fig. 49, lignes 1 et 3) qu'avec le milieu du gène *opgC* (Fig. 49, lignes 4 à 6) incubé ou non avec la protéine RcsB (ou de la BSA). Ce résultat montre clairement que le régulateur RcsB se fixe directement sur le promoteur du gène *opgC*.

#### 4.4 L'inactivation du gène *opgC* n'affecte pas la virulence de *D. dadantii*

Ensuite, nous nous sommes interrogés sur l'effet de l'inactivation du gène *opgC* sur la virulence. Aucune différence dans le développement de la maladie n'a pu être observé entre la souche sauvage (EC3937) et la souche *opgC* (NFB7305) (Fig. 50). De plus l'évaluation de la capacité de ces souches à sécréter des exoenzymes (pectinases, cellulases, protéases) n'a pas permis d'observer de différences entre ces souches (Fig. 50). Aucun impact sur la motilité ou la mucosité n'a pu être détecté entre les deux souches (Fig. 50).



Souche	EC3937 Sauvage	NFB7305 <i>opgC</i>
Motilité	2	1,95
Pectinases	1,65	1,6
Cellulases	1,2	1,2
Protéases	+	+
Mucosité	-	-

Figure 50 : Test de virulence sur feuilles d'endive de la souche sauvage (EC3937) et du mutant *opgC* (NFB7305). Les bactéries ont été cultivées en LB puis  $10^7$  bactéries ont été inoculées au niveau de la scarification. Les endives ont été observées après 48h d'incubation. Les tests phénotypiques ont été réalisés sur milieu faiblement gélosé (motilité), PGA, CMC et LB-lait 10% (respectivement test pectinases, cellulases et protéases) et sur milieu minimum M63 glucose (mucosité). Les mesures ont été réalisées après 30h d'incubation à 28°C.

Pour conclure notre étude, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression d'*opgC in planta*. Les souches sauvage (NFB7459) et *rcsB* (NFB7461) ont été cultivées en milieu de basse osmolarité (LOS) puis inoculées sur feuille d'endive. La fusion transcriptionnelle *opgC::uidA* a été dosée avant inoculation puis après 48h d'incubation (Fig. 51). Aucune induction n'a été observé entre les contextes sauvage (NFB7459) et *rcsB* (NFB7461). Ce résultat – peu surprenant – est à corrélérer aux travaux sur la relation entre les OPG et le système RcsCDB. En effet, dans cette étude

nous avons montré qu'*in planta*, *D. dadantii* se comporte comme dans un milieu de basse osmolarité vis-à-vis des OPG et donc que ces derniers ne présentent pas de résidus succinyles.

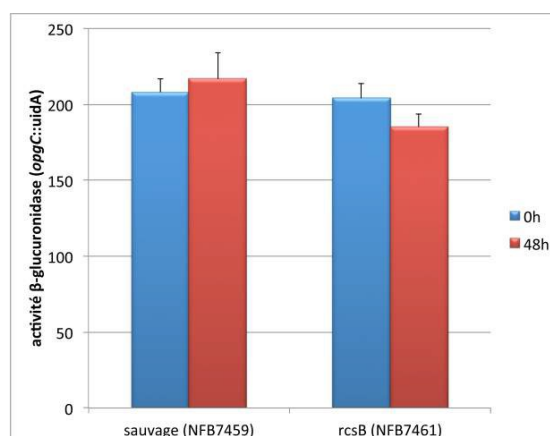


Figure 51 : Expression de la fusion *opgC-uidA* en contexte sauvage (NFB7459) et *rcsB* (NFB7461). L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée à l'aide de PNPU comme substrat. L'activité spécifique a été exprimée en DO<sub>410nm</sub>/min/10<sup>9</sup> bactéries. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

#### 4.5 Discussion

Les substituants des OPG varient selon les espèces. Chez *D. dadantii*, une étude précédente avait montré la présence de résidus acétates quelque soit l'osmolarité et des résidus succinyles uniquement à haute osmolarité [16]. La succinyl-transférase de *D. dadantii* ressemble structurellement à celle d'*E. coli* même s'il ne présente qu'une faible homologie de séquence. Cette protéine, dont l'expression est induite à haute osmolarité, est régulée par le système phosphorelais RcsCDB qui est un activateur du gène *opgC*.

L'étude de la relation entre les OPG et le système RcsCDB avait montré la nécessité d'une forte concentration d'OPG, synonyme de basse osmolarité, corrélé à un faible niveau d'activation du système RcsCDB pour une virulence optimale. L'analyse par spectrométrie de masse des OPG *in planta* avait montré l'absence de résidus succinyles. Ce résultat a été confirmé dans cette étude par l'analyse de l'expression du gène *opgC*. Mais est-ce qu'une hypersuccinylation des OPG aurait-elle un effet sur la virulence ? Une question reste en suspend quel est le rôle de la succinylation des OPG ?

Au final le modèle de biosynthèse des OPG chez *D. dadantii* comprend – pour le moment – trois protéines (Fig. 52). OpgG et OpgH sont responsables de la synthèse du squelette glucosidique des OPG. OpgC est nécessaire pour la succinylation des OPG. Il reste au moins une protéine à identifier : OpgF, responsable de l'acétylation des OPG.

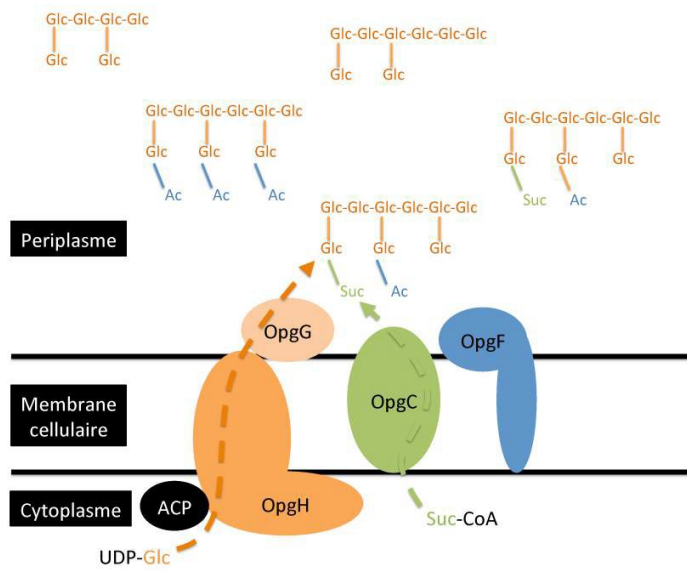


Figure 52 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *D. dadantii*. La variété dans les structures et dans les combinaisons des substitutions a été schématiquement représentée.

# Discussion

La cellule bactérienne interagit en continu avec son environnement. L'enveloppe joue, dans ces échanges avec l'environnement, un rôle majeur. Cependant, les propriétés physiques et mécanismes de cette dernière sont mal connues. Une adaptation permanente de l'enveloppe à son environnement permet à la bactérie de conserver – stable - la balance entre croissance et réponse aux stress [239].

Les systèmes à deux composants et phosphorelais sont la clef de voute de la perception de l'environnement. Les OPG interagissent avec au moins deux systèmes: EnvZ-OmpR et RcsCD-B. Alors que le système RcsCDB, impliqué dans la perception de nombreux stress, répond à la concentration périplasmique des OPG, le système EnvZ-OmpR, impliqué dans l'adaptation aux variations de l'osmolarité, ne réagit qu'à la perte des OPG. Notre glucane ne peut donc pas jouer le même rôle pour ces deux systèmes. Nous pouvons spéculer que les OPG pourraient être un absorbeur des fluctuations de l'osmolarité. La perte d'OPG conduirait à l'activation du système EnvZ-OmpR. Ce système classique répond selon le modèle proportionnellement à des signaux de faible intensité [162]. Cependant, ce type de réponse est couteux en énergie. Les OPG permettraient d'éviter une réponse trop intense du système EnvZ-OmpR face aux changements de l'osmolarité.

Une étude chez *E. coli* a montré que le système RcsCDB percevait les faibles changements de la fluidité des membranes [169]. Or, on sait que l'adaptation à l'environnement passe notamment par des modifications de la fluidité des membranes [240-243] et de l'homéoviscosité du périplasma [244]. Puisque les glucanes périplasmiques osmorégulés représentent jusque 5% de la masse sèche de la bactérie, ils pourraient jouer un rôle dans la régulation du volume du périplasma en réponse à un stress comme le suggèrent Sochacki *et al.* [245]. Le système RcsCDB ainsi activé conduit à une surproduction d'EPS et à une altération de la capacité à former un biofilm.

Ensuite, la perte des OPG conduit à une rigidification de la membrane par la saturation des acides gras des lipides [234, 246-248], et pourrait conduire à une modification de la viscosité du périplasma nuisant fortement au passage des solutés de l'environnement. Les problèmes de communications avec l'extérieur provoquent un sentiment de stress cellulaire observable notamment via un cycle de Krebs fermé [37]. Ce cycle peut, lorsqu'il est à son rendement maximal, provoquer la formation de radicaux libre [249] induisant la réponse au stress oxydatif. Cette induction rend le mutant *opgG* plus résistant que la souche sauvage au stress oxydatif.

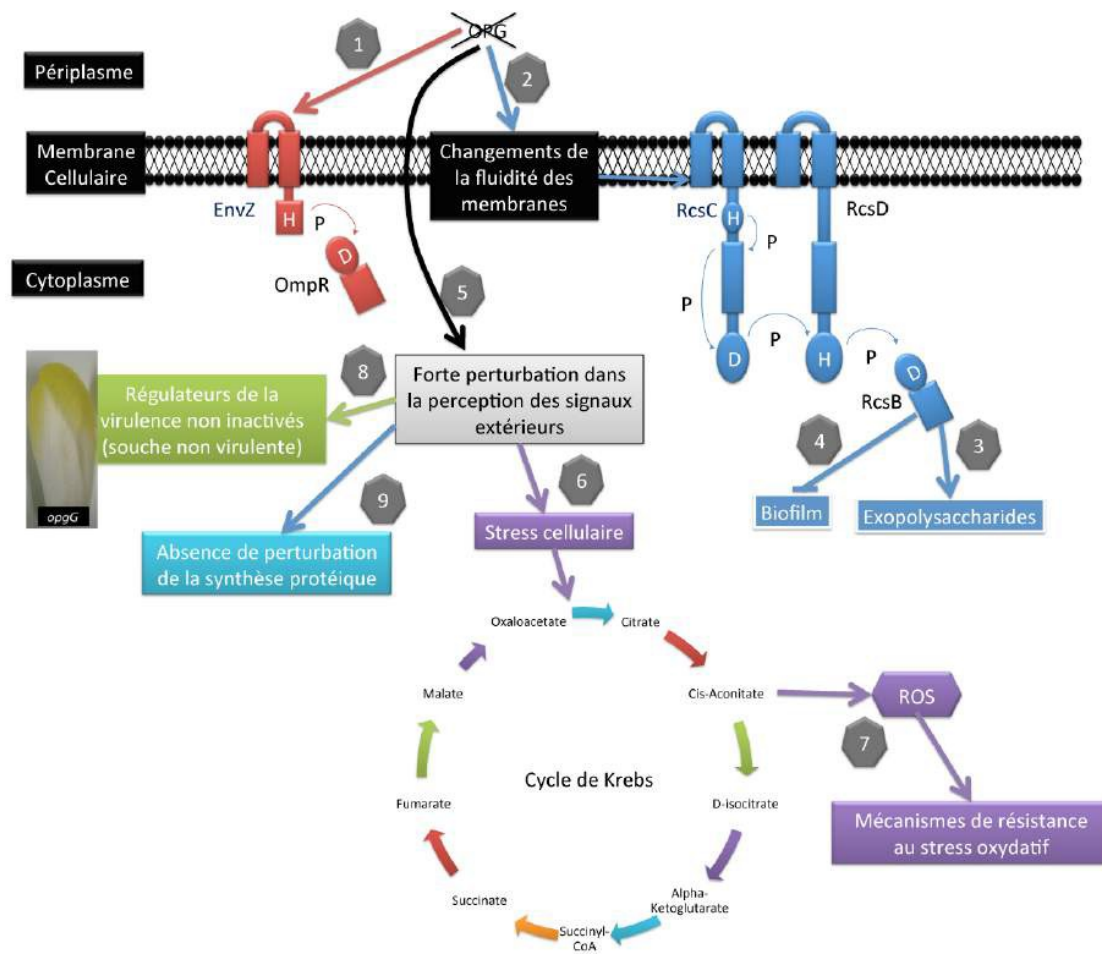


Figure 53 : Modèle d'un type d'autisme bactérien. La perte des OPG conduit à la perte de son rôle d'absorbant des fluctuations de l'osmolarité de l'environnement ce qui induit le système EnvZ-OmpR (1). De plus, cette perte des OPG conduit également à une perturbation de la fluidité des membranes (2), ce qui induit le système RcsCDB. L'activation de ce système provoque une surproduction d'exopolysaccharides (3) et entrave la capacité de la cellule à former un biofilm (4). La perte des OPG conduisant à des modifications de la viscosité du périplasm et à la fluidité des membranes coupe la bactérie de son environnement (5). Les problèmes de communication avec l'extérieur provoquent un stress cellulaire (6), ce qui conduit à un cycle de Krebs fermé produisant une grande quantité d'intermédiaires énergétiques. Cette production intense peut conduire à la formation de radicaux libres (7), induisant la réponse au stress oxydatif et rendant ainsi le mutant *opgG* résistant. Ensuite, la difficulté des molécules de l'extérieur à passer l'enveloppe empêche l'inactivation des régulateurs de la virulence rendant la bactérie non virulente (8). Enfin, la perte d' OPG ne semble pas provoquer de perturbation de la synthèse protéique (9).

De plus, les difficultés des molécules de l'extérieur à passer dans le cytoplasme empêcheraient l'inactivation des régulateurs (répresseurs PecS et KdgR) de la virulence rendant la souche dépourvue d'OPG non virulente. La restauration de la virulence du double mutant *opgG pecS* est assez surprenante. Cependant, le régulateur PecS n'est pas un simple régulateur comme le répresseur KdgR. En effet, il régule de nombreuses fonctions : synthèse des exoenzymes, motilité, résistance

aux stress oxydatifs. Un premier modèle du rôle de PecS dans la virulence avait été établi par Nasser *et al.*, 2005 [250]. Mais les études suivantes ont quelque peu compliqué le réseau de connexions permettant une virulence optimale. Un élément est cependant clair : en aucun cas la dérégulation des exoenzymes n'est responsable du retour de virulence sur feuille d'endive [40].

Par ailleurs, la perte d'OPG n'a pas d'impact visible ni sur la synthèse des protéines membranaires ou périplasmiques puisque le système CpxAR n'est pas activé, ni sur la structure globale de l'enveloppe de la cellule.

L'ensemble des résultats sur l'impact de la perte des OPG présenté ci-dessus nous montre une bactérie présentant des interactions et une communication anormale, que nous pouvons assimiler à une forme « d'autisme bactérien ». Ce modèle sur l'impact de l'absence des OPG est décrit dans la figure 53.

Enfin, l'étude de la biosynthèse des OPG et la découverte du gène *opgC*, codant la succinyl transférase, nous a conduit à relier le système RcsCDB à la régulation du gène *opgC*. Le niveau d'activation du système RcsCDB est proportionnellement inverse à la quantité d'OPG présentes dans le périplasme. Les résidus succinyles ne sont présents sur les OPG qu'à haute osmolarité lorsqu'il y a peu d'OPG et donc que le système RcsCDB est activé. Or, cette activation du système RcsCDB conduit à l'activation par RcsB de l'expression du gène *opgC*. Aucun rôle au résidu succinyle n'a pu être identifié. Quel peut bien être le rôle de cette boucle de régulation ?

Bien évidemment, afin de prouver la robustesse du modèle du rôle des OPG de plus amples investigations seront nécessaires. En premier lieu, la fluidité des membranes doit être étudiée en fonction de la concentration périplasmique des OPG. Provoquer une modification de la fluidité des membranes conduit-elle à une activation du système RcsCDB chez *D. dadantii* ? A l'apparition d'une partie des phénotypes d'un mutant *opgG* ?

# Procédures expérimentales



## 1. Souches, plasmides et milieux

### 1.1 Génotypes des souches et plasmides utilisés

Souches, plasmides	Génotype ou phénotype <sup>a</sup>	Source ou Référence
<b><i>D. dadantii</i></b>		
EC3937	souche sauvage	[40]
A2148	lmrT(Con)lacZ2 <i>pecT::uidA</i> -Cml	[251]
A3953	lmrT(Con)lacZ2 <i>pecS::MudIIPR13</i> -Cml	[202]
A4114	<i>kdgR::spe</i>	G. Condemine
A4229	lmrT(Con)lacZ2 <i>ompF::uidA</i> -Kan	[192]
A4239	<i>gacA::cml</i>	[132]
A4515	lmrT(Con)lacZ2 <i>ompR::Tet</i>	[192]
Ech380	<i>hrpN::uidA</i> -Kan	[132]
NFB3500	<i>opgG::uidA</i> -Kan	[40]
NFB3591	<i>opgG::uidA</i> -Kan <i>rscC2</i>	[61]
NFB3682	<i>rscC::Cml</i>	[61]
NFB3723	<i>opgG::Cml</i>	[252]
NFB3800	<i>flhD-uidA</i> -Kan	[61]
NFB3809	<i>ftsA-uidA</i> -Kan	[61]
NFB3835	<i>opgG::Cml</i> , P <sub>BAD</sub> <i>opgGH</i> -Spe	[252]
NFB3837	<i>opgG::Cml</i> , P <sub>BAD</sub> <i>opgGH</i> -Spe, <i>ftsA</i> -Kan	[252]
NFB7112	<i>rscB::Cml</i> , <i>rscCB<sub>D56N</sub>D</i> -Spe	[252]
NFB7127	<i>rscC::Cml</i> , <i>ftsA-uidA</i> -Kan	[61]
NFB7128	<i>rscC::Cml</i> , <i>flhD-uidA</i> -Kan	[61]
NFB7196	<i>opgG::uidA</i> -Kan, <i>pecS::MudIIPR13</i> -Cml	Cette étude
NFB7202	<i>rscB::Cml</i> , <i>flhD-uidA</i> -Kan	[61]
NFB7205	<i>rscB::Cml</i> , <i>ftsA-uidA</i> -Kan	[61]
NFB7274	<i>opgG::Cml</i> , <i>ftsA-uidA</i> -Kan	[252]
NFB7279	<i>rscB::Gm</i>	[252]
NFB7299	<i>opgG::cml</i> , <i>kdgR::spe</i>	Cette étude
NFB7300	<i>opgG::Cml</i> , P <sub>BAD</sub> <i>opgGH</i> -Spe, <i>flhD-uidA</i> -Kan	[252]
NFB7301	<i>opgG::Cml</i> , <i>flhD-uidA</i> -Kan	[252]
NFB7305	<i>ABF0020261::Cml</i>	E. Madec
NFB7306	<i>ABF0020770::Gm</i>	E. Madec
NFB7307	<i>ABF0016719::Gm</i>	E. Madec
NFB7326	<i>ABF0020261::Cml</i> , mTn5Spe- <i>ABF0020261</i>	E. Madec
NFB7362	<i>pecT::uidA</i> -Cml, <i>opgG::uidA</i> -Kan	Cette étude
NFB7364	<i>hrpN::uidA</i> -Kan, <i>opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7365	<i>hrpN::uidA</i> -Kan	Cette étude
NFB7366	<i>GacA::Cml</i>	Collection du laboratoire
NFB7367	<i>GacA::Cml</i> , <i>opgG::uidA</i> -Kan	Cette étude

NFB7368	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe</i>	[252]
NFB7369	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, flhD-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7371	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, ftsA-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7374	<i>ompF::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7374	<i>ompF::uidA-Kan, opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7386	mTn5 <i>spy::uidA-Kan</i>	Collection du laboratoire
NFB7389	<i>opgG::Cml, mTn5 spy::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7399	<i>rcsB::Cml, rcsCB<sub>D56ND</sub>-Spe, flhD-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7400	<i>opgG::FRT, rcsC::Cml, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe</i>	[252]
NFB7401	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, rcsCB<sub>D56ND</sub>-Tet</i>	[252]
NFB7402	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, rcsCB<sub>D56ND</sub>-Tet,</i>	[252]
NFB7403	<i>ftsA-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7404	<i>opgG::Cml, rcsB::Gm, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, rcsCB<sub>D56ND</sub>-Tet, flhD-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7405	<i>opgG::FRT, rcsC::Cml, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, flhD-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7406	<i>opgG::FRT, rcsC::Cml, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe, ftsA-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7408	<i>rcsB::Cml, rcsCB<sub>D56ND</sub>-Spe, ftsA-uidA-Kan</i>	[252]
NFB7420	<i>narL::Gm</i>	Cette étude
NFB7421	<i>narL::Gm, opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7422	<i>ompR::Gm</i>	Cette étude
NFB7423	<i>ompR::Gm, opgG::cml</i>	Cette étude
NFB7424	<i>hrpY::Gm</i>	Cette étude
NFB7425	<i>hrpY::Gm, opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7430	<i>ABF0020261::Cml, pNF239</i>	E. Madec
NFB7431	<i>opgG::Cml, pNF244</i>	E. Madec
NFB7441	<i>ompR::Gm, ompF::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7442	<i>ompR::Gm, opgG::Cml, ompF::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7444	<i>hrpY::Gm, hrpN::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7445	<i>hrpY::Gm, opgG::Cml, hrpN::uidA-Kan</i>	Cette étude
NFB7447	<i>cpxR::Gm</i>	Cette étude
NFB7448	<i>cpxR::Gm, opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7452	<i>spy::uidA-Kan, cpxR::Gm</i>	Cette étude
NFB7453	<i>spy::uidA-Kan, cpxR::Gm, opgG::Cml</i>	Cette étude
NFB7458	<i>ompF::uidA-Kan, opgG::Cml, P<sub>BAD</sub>opgGH-Spe</i>	Cette étude
NFB7459	<i>opgC::uidA-Kan</i>	E. Madec
NFB7461	<i>opgC::uidA-Kan, rcsB::Gm</i>	E. Madec

WPP92	<i>hrpY</i> ::Kan	[235]
<b><i>E. coli</i></b>		
BL21(DE3)	<i>ompT, hsdSB, gal, dcm</i>	Invitrogen
JM83	<i>ara Δ(lac-proAB), rpsL, thi, (φ80ΔlacZ-M15)</i>	[253]
S17-λpir	<i>recA1, thi, pro, hsdR-M+, RP4:2-Tc::Mu-Kan::Tn7, λpir</i>	[254]
NFB702	<i>opgG202</i> ::Kan	Collection du laboratoire
NFB732	JM83, <i>opgB214</i> ::Tn10	[29]
NFB1898	JM83, <i>opgB214</i> ::Tn5, <i>opgC1</i> ::Tn5	Collection du laboratoire
NFB1919	JM83, <i>opgC1</i> ::Tn5	[29]
NFB4570	NF4548, NFW412	Cette étude
NFB4571	NF4548, pNF239	Cette étude
NFB4572	NF732, pNFW412	Cette étude
NFB4573	NF1898, pNFW412	Cette étude
NFB4574	NF1919, pNFW412	Cette étude
NFB4575	NF702, pNFW32	Cette étude
NFB4548	JM83, <i>opgB214</i> ::Tn10, <i>opgC1</i> ::Tn5, <i>opgE2</i> ::Cml	Cette étude
<b>Plasmids</b>		
PUC18Not	Amp	[255]
pCRII	Amp Kan	Invitrogen
pJET1.2	Amp	ThermoScientific
pBAD18	Amp, <i>araC</i> , promoter P <sub>BAD</sub>	[218]
pNF239	pUC18 <i>opgGH, opgC</i>	Collection du laboratoire
pNF244	pUC18 <i>opgGH</i>	Collection du laboratoire
pNFW32	Amp, <i>opgGH</i>	[40]
pNFW412	pCRII-ABF-0020261	E. Madec
pNFW451	pCRII + <i>narL</i>	Cette étude
pNFW452	pNFW451 digéré BmgBI et insertion cassette Gm digéré par HpaI	Cette étude
pNFW454	pCRII + <i>hrpY</i>	Cette étude
pNFW455	pNFW454 digéré par MscI et insertion cassette Gm digéré par HpaI	Cette étude
pNFW456	pCRII + <i>ompR</i>	Cette étude
pNFW457	pNFW457 digéré par AfeI et insertion cassette Gm digéré par HpaI	Cette étude
pNFW460	pJET2,1 + <i>cpxR</i>	Cette étude

pNFW466 pNFW460 digéré par AfeI et  
insertion cassette Gm digéré  
par HpaI

Cette étude

Tableau 5 : Souches et plasmides. Amp :Ampicilline, Gm : Gentamycine, Kan : Kanamycine, Cml : Chloramphénicol, Tet : Tétracycline, Spe : Spectinomycine. uidA : utilisé comme gène rapporteur est issu de l'opéron gus d'*E. coli*, il code la  $\beta$ -glucuronidase. Tn5, mTn5, Tn10 : respectivement transposon 5, transposon 10 ou miniTransposon 5.

## 1.2 Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

Les bactéries sont cultivées à 28°C (*Dickeya dadantii*) ou à 37°C (*Escherichia coli*) avec une agitation de 125 rpm.

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Une densité optique de 1 correspond à  $10^9$  bactéries/ml.

La composition des milieux est décrite ci-dessous :

- Le milieu Lysogeny Broth ou LB [256]. L'omission de NaCl permet d'obtenir un milieu d'osmolarité réduite à 150 mosM.
- Le milieu minimum M63 est complété avec une source de carbone à la concentration de 0,2% [257], d'acides aminés et bases azotées à 40 mg/ml, de thiamine à 2 mg/ml.
- Le milieu LOS [16, 258], un milieu de basse osmolarité, se compose de  $K_2PO_4$  1mM,  $(NH_4)_2SO_4$  1,5mM,  $MgCl_2$  0,08mM,  $FeSO_4$  0,5mg/l, hydrolysate de caséine 4 g/l. Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris 1M. L'osmolarité de ce milieu est de 66 mosM et peut être augmentée par l'ajout de NaCl (4M).
- Le milieu SOBG (SOB Glycérol) se compose de 2% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,24% de  $MgSO_4$ , 0,0186% de KCl et 2% de glycérol.
- Le milieu Bas-Phosphate se compose de Tris HCl (120 mM), NaCl (90 mM), KCl (40mM),  $NH_4Cl$  (21mM),  $CaCl_2$  (0,1 mM),  $Na_2SO_4$  (25  $\mu$ M),  $KH_2PO_4$  (0,5 mM), bactopectone (0,25%), pH 7,4. Ce milieu carencé en phosphate est utilisé pour favoriser la perte des plasmides introduits chez *D. dadantii* par électroporation, Il est complété par une source de carbone et l'antibiotique adéquats.
- Le milieu PGA est un milieu M63 complété avec 0,4% de polygalacturonate (PGA) et 0,2% de glycérol.
- Le milieu CMC est un milieu M63 complété avec 0,2% de carboxyméthylcellulose (CMC), 0,2% de glycérol et 7mM de  $MgSO_4$ .
- Le milieu protéase est un milieu LB complété avec 1% de lait écrémé en poudre. Le milieu SOBG (SOB Glycérol) se compose de 2% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,24% de  $MgSO_4$ , 0,0186% de KCl et 2% de glycérol.
- Les milieux sont solidifiés par l'ajout d'agar à 1,5% excepté pour les tests de motilité qui sont solidifiés par de l'agar à 0,4%.

Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes ampicilline (Amp), 50 µg/ml ; kanamycine (Kan), 50 µg/ml ; chloramphénicol (Cml), 25 µg/ml ; tétracycline (Tet), 25 µg/ml, Spectinomycine (Spe), 100 µg/ml et Gentamycine (Gm), 3 µg/ml pour *E. coli* et divisées par deux pour *D. dadantii*.

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.

## 2. Techniques de génétique

### 2.1 Transduction

Les transductions chez *Dickeya dadantii* ont été effectuées en utilisant le phage FEC2 d'après Resibois et al., 1984 [259].

### 2.2 Conjugaison

Pour cette conjugaison, 1 bactérie donatrice pour 10 réceptrices dans 200 µl ( $4 \cdot 10^8$  bactéries) final sont déposées sur du LB gélosé. Après 30 min d'incubation à 28°C, les cellules sont resuspendues dans 2 ml de M63. Cette suspension est alors étalée sur le milieu sélectif.

### 2.3 Transformation

Les cellules d'*E. coli* sont rendues compétentes et transformées selon la méthode au chlorure de rubidium d'Hanahan (1983) [260].

### 2.4 Électroporation

Cette technique est notamment utilisée pour la construction de mutants par insertion de cassette. Les cellules de *D. dadantii* ont été transformées par électroporation d'après Sambrook et coll (1989) [261]. 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 [262].

## 3. Techniques de Biologie moléculaire

### 3.1 Extraction et purification d'ADN : plasmide et ADNg

- L'extraction des plasmides est réalisée en utilisant le kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) ou le kit Wizard Plus SV DNA Purification System (Promega).

- L'ADN chromosomique est préparé en utilisant le kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel).
- L'extraction de bande dans des gels s'effectue grâce au kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

### 3.2 Enzymes de restriction et de modification

- Les endonucléases de restriction (New England Biolabs) ont été utilisées selon les recommandations du fabricant. Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% en présence de bromure d'éthidium (1 µg/mL) dans du TAE (Tris 40mM, EDTA 1 mM, ajusté à pH 8,5 par 20mM d'acide acétique). Le marqueur de masse moléculaire est le « Smart ladder » d'Eurogentec.
- L'ADN-ligase du bactériophage T4 (ThermoScientific) a été utilisée dans le tampon fourni par Biolabs, pendant la nuit à 4°C ou une heure à température ambiante.

### 3.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les ADN polymérase utilisées sont la phusion (ThermoScientific) pour les clonages nécessaires à l'inactivation de gènes et la Taq-ADN-polymerase (ThermoScientific) pour la vérification des insertions. Les PCR ont été réalisées selon les conditions standards préconisées par le fabricant. Les réactions sont réalisées dans un volume de 50µL. Les PCR sont faites avec 100 ng d'ADN génomique ou de plasmides.

### 3.4 Séquençage

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

### 3.5 Construction des mutants

#### 3.5.1 Mutant narL

La PCR NarLF (AGGTACCTGCACGACAAGCTCGGCCA)-NarLR (AGGTACCGAATCGCCAGCCAGTGCA) contenant le gène narL a été clonée dans le pCRII (pNFW451). Ce plasmide a été digéré par BmgBI et la cassette de résistance à la gentamicine digérée par HpaI a été insérée pour donner le plasmide (pNFW452).

#### 3.5.2 Mutant hrpY

La PCR HrpYF (AGGTACCAATACGCCAACCCCGCCACG)-HrpYR (AGGTACCCCTGCAGCGTCAGCGGCA) contenant le gène hrpY a été clonée dans le pCRII (pNFW454). Ce plasmide a été digéré par MscI et la cassette de résistance à la gentamicine digérée par HpaI a été insérée pour donner le plasmide (pNFW455).

#### 3.5.3 Mutant cpxR

La PCR cpxRF (AGGTACCATCTGCTGCCGACGCTCTG)-cpxRR (AGGTACCGTGCCGTTTCGCCAGACT)

contenant le gène *cpxR* a été clonée dans le pJET1.2 (pNFW460). Ce plasmide a été digéré par *AfeI* et la cassette de résistance à la gentamicine digérée par *HpaI* a été insérée pour donner le plasmide (pNFW466).

#### 3.5.4 Mutant *ompR*

La PCR *ompRKpnIF* (AGGTACCGCAAACGCAGCAGGCGCTAC) - *OmpRKpnIR* (AGGTACCGCGTTGAGGTCTGGCCACTT) contenant le gène *ompR* a été clonée dans le pCRII (pNFW456). Ce plasmide a été digéré par *AfeI* et la cassette de résistance à la gentamicine digérée par *HpaI* a été insérée pour donner le plasmide (pNFW466).

## 4. Techniques de Biochimie

### 4.1 Dosage des OPG

L'extraction des OPG est réalisée selon la méthode établie par Kennedy, 1982 [258]. Une culture en phage exponentielle ou stationnaire est centrifugée puis resuspendue dans un volume de milieu 63 correspondant à 20% du volume initial de la culture. Les bactéries sont lysées par ajout d'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 5%. Après une agitation forte de 10 min et centrifugation, le surnageant est récupéré.

Ce surnageant subit différents traitements selon le cas :

- Soit, pour une extraction rapide, de l'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) est ajouté afin neutraliser le TCA.
- Soit, pour éliminer notamment les exopolysaccharides, un volume de charbon actif correspondant à 40% du volume initial de la culture. Les OPG vont ainsi d'adsorber suite à une forte agitation. Le charbon est culoté et nettoyé deux fois par de l' $\text{H}_2\text{O}$ . Les OPG sont récupérés par lavage des OPG avec de la pyridine à 15%.
- Soit, dans le cas de culture en grand volume, un traitement volume/volume avec du chloroforme/méthanol (2 :1) après ajout de l'ammoniaque afin d'éliminer les débris cellulaires notamment.

Les OPG sont ensuite concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif et purifiés sur colonne de filtration sur Biogel P4 medium (BioRad). La colonne (2 x 45cm) est équilibrée avec de l'acide acétique 0,5% ou avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  MQ. L'échantillon est élué à une vitesse de 15ml/H. Chaque fraction contient 1,5ml.

Lorsque l'échantillon doit être analysé en spectrométrie de masse, il est dessalé sur colonne de filtration sur Biogel P2 (BioRad). La colonne (1,5 x 75cm) est équilibrée avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  MQ. L'échantillon est élué à une vitesse de 15ml/H. Chaque fraction contient 1ml.

## 4.2 Dosages à l'anthrone

Les OPG sont révélés selon la méthode colorimétrique utilisant de l'anthrone dans de l'acide sulfurique (Sprio, 1966) [263]. Ce dosage à l'anthrone permet de mesurer les sucres totaux réducteurs qui possèdent des fonctions carbonyles (C=O). Les sucres par déshydratation en condition acides donnent des résidus furfuraux qui sont quantifiables. La réaction entre l'anthrone et les sucres est visualisée par une teinte verte dont l'intensité est mesurée à 620 nm.

La quantité d'OPG est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de concentration de glucose. Les fractions contenant les OPG sont rassemblées et un dosage précis est effectué selon la méthode de Spiro.

## 4.3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford (1976) [264] (Bio-Rad protein assay) avec une solution de sérum-albumine bovine comme référence.

## 4.4 Dosages d'activités enzymatiques

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 (5 mL à 7000g, 10min, 4°C) et reprises dans 1 ml de milieu 63. Les cellules sont ensuite lysés par sonication. Puis l'extrait est centrifugé (7000g, 10min, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les dosages ont été réalisés trois fois sur des extraits indépendants.

### 4.4.1 Dosage de la $\beta$ -galactosidase

L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par hydrolyse de l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside (OPNG, 4mg/mL), dans du milieu 63 à 37°C, en suivant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm. La réaction en microplaque se fait avec 40  $\mu$ L de substrat, 40 $\mu$ L d'échantillon et 120  $\mu$ L de milieu 63.

### 4.4.2 Dosage de la $\beta$ -glucuronidase

L'activité  $\beta$ -glucuronidase est mesurée dans du milieu minimum 63, à 37°C, par hydrolyse du 4-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (PNPU, 4mg/mL), en suivant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm. La réaction en microplaque se fait avec 40 $\mu$ L de substrat, 40  $\mu$ L d'échantillon et 120  $\mu$ L de milieu minimum 63.

### 4.4.3 Dosage des pectates-lyases

L'activité pectinase est mesurée à partir du surnageant de culture en phase stationnaire en milieu M63 complémenté par du glycérol comme seule source de carbone ou par du glycérol et de l'acide polygalacturonique (PGA, Sigma-Aldrich) permettant d'induire l'expression des gènes pel. L'activité est mesurée à 37°C dans



du tampon PL (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, PGA 0,05%) par dégradation du PGA en oligogalacturonides insaturés absorbant à 230 nm [265].

#### 4.4.4 Dosage de l'indigoïdine (D'après Rouanet *et al.*, 2001 [266])

*D. dadantii* est cultivée dans du M63 supplémenté avec du glycérol. 1 ml de culture en phase stationnaire est centrifugé. Le culot est suspendu dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pur. La suspension est centrifugée. Le surnageant qui contient l'indigoïdine est prélevé. La concentration d'indigoïdine est mesurée à au spectrophotomètre à une DO de 615 nm.

## 4.5 Spectrométrie de masse

### 4.5.1 Q-TOF (Dr Catherine Robbe-Masselot)

Les analyses MALDI-TOF (Ionisation par Désorption Laser Assistée par une Matrice, analyseur à temps de vol) sont réalisées sur un spectromètre de masse Voyager Elite (DESTR, PerSeptive Biosystem®). La désorption et l'ionisation sont obtenues à l'aide d'un laser à azote pulsé (longueur d'onde : 337 nm). Le spectromètre opère en mode réflectron positif ou négatif avec une tension d'accélération de 20 KV, le délai d'extraction étant de 200 nsec. Les données présentées résultent de l'accumulation de spectres acquis après 100 à 200 tirs laser.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés sont solubilisés respectivement dans du méthanol/eau (50:50, v/v). 1µL d'échantillon est mélangé, directement sur la cible MALDI, à 1 µL de matrice DHB (acide 2,5 dihydroxy benzoïque à 10 mg/mL en solution dans l'eau/méthanol 50/50 v/v).

### 4.5.2 Nano-LC-MS/MS (Dr Anne-Sophie Vercouter)

Les spots d'intérêts de la protéomique sont découpés à partir des gels, décolorés et digérés à la trypsine (G)Biosciences, Agro-Bio, La ferté Saint-Aubin, France). L'identification protéique est réalisée par Nano-LC-ESI-MS/MS (Q-star, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). L'identification des protéines a été réalisée à l'aide du serveur Mascot (Matrix Science) à partir de la banque de données Swiss-Prot.

## 5. Technique de protéomique

### 5.1 Extraction des protéines membranaires

Un litre de culture en LB sans NaCl est arrêté en phase exponentielle de croissance à une DO<sub>620nm</sub> de 0,6. Après une centrifugation à 7000 g pendant 20 min à 4°C, le culot est lavé par 500 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 8. Les cellules sont centrifugées à 7000 g à 4°C pendant 20 min pour reprendre le culot par 25 mL de

tampon composé de phosphate de potassium pH 6,6 0,1 M, de MgSO<sub>4</sub> 20 mM et d'un cocktail d'antiprotéases (Complete, ROCHE). Les cellules sont ensuite cassées par deux passages en presse de French à 1,4.10<sup>7</sup> Pascal. Les bactéries intactes sont éliminées par centrifugation à 3000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 16000 g à 4°C 30 min pour séparer la fraction membranaire de la fraction soluble. Le culot membranaire est repris par le même volume de tampon phosphate pH 6,6, 1 M, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, RNase 10 µg/mL, DNase 10 µg/mL que le surnageant. De la DNase et RNase à 10 µg/mL sont ajoutées dans la fraction membranaire puis incubées à 4°C 30 min. La fraction est centrifugée à 45000 g 30 min à 4°C. Le culot membranaire est resuspendu dans du tampon phosphate de potassium pH 6,6 0,1 M, MgSO<sub>4</sub> 20 mM et un cocktail d'antiprotéases. Les échantillons sont conservés à -80°C.

## **5.2 Electrophorèse bidimensionnelle des membranes (Dr Christophe Tastet).**

Après extraction des protéines des membranes, elles ont été chargées sur un premier gel CTAB-PAGE afin d'être séparé selon leurs poids moléculaire. Une fois cette première dimension terminée, le gel est équilibré puis préparé pour réaliser la seconde dimension dans un gel SDS-PAGE pour être séparé selon leurs poids moléculaires. La différence d'affinité avec les deux détergents permet une dispersion des protéines de part et d'autres de la diagonale (Fig. 54).

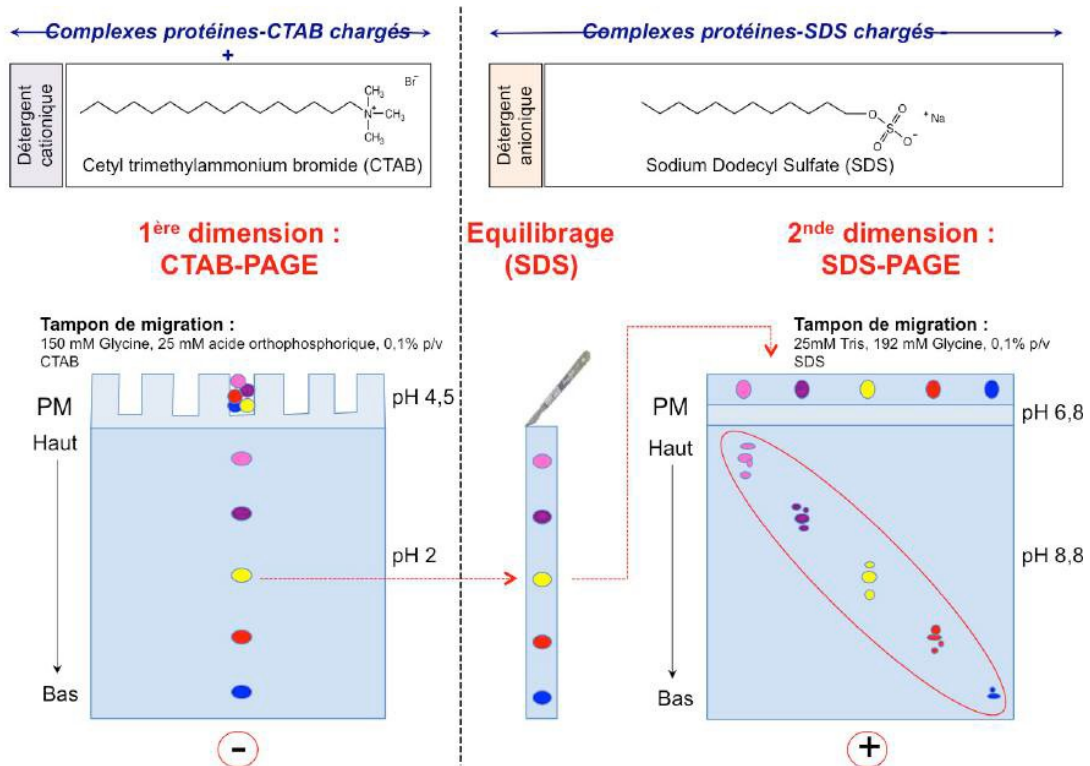


Figure 54 : Principe de la protéomique des membranes (C. Tastet).

### 5.3 Gel PhosTag

Cette méthode repose sur un gel SDS-PAGE dont une partie des molécules d'acrylamide sont greffés à une molécule de Phos-Tag<sup>TM</sup>. Dans un tel gel, le Phos-Tag<sup>TM</sup> retarde la migration de toute protéine phosphorylée par rapport à la même protéine phosphorylée permettant de séparer ces deux entités. Ce gel peut être ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose afin de réaliser un Western-Blot ou coloré au bleu de coomassie.

## 6. Analyse phénotypique et test de virulence

### 6.1 Exoenzymes

#### 6.1.1 Pectinases

Pour les tests pectinases,  $10^7$  bactéries sont déposées sur milieu PGA gélosé. Après 30h d'incubation à 28°C, la boîte de Pétri est recouverte par une solution d'acétate de cuivre (10%) révélant un halo translucide correspondant à la zone de dégradation du PGA. Le diamètre du halo est mesuré.

#### 6.1.2 Cellulases

Pour les tests cellulases,  $10^7$  bactéries sont déposées sur milieu CMC gélosé. Après 30h d'incubation à 28°C, la boîte de Pétri est recouverte par une solution de rouge

Congo (1mg/ml) pendant 15 min suivi de trois lavages de 5 à 10 min par du NaCl 1M. Un halo translucide jaune sur fond rouge dû à l'hydrolyse de la cellulose apparaît. Le diamètre du halo est mesuré.

### 6.1.3 Protéases

Pour les tests protéases, 10<sup>7</sup> bactéries sont déposées sur milieu protéase gélosé. Après 48h d'incubation à 28°C, un halo transparent sur fond trouble apparaît autour des colonies suite à l'hydrolyse des protéines du lait.

## 6.2 Infection sur feuille d'endive et en tubercule de pomme de terre

Les bactéries sont cultivées une nuit en LB ou en M63 complété par une source de carbone adéquate en présence ou non de L-arabinose, centrifugées, puis remises en suspension dans de l'eau physiologique stérile à la concentration de 2.10<sup>9</sup> bactéries par ml. Les tubercules de pomme de terre (variété Mona Lisa ou Samba) sont stérilisés par du NaOCl 0,5% puis rincés avec de l'eau stérile et séchés. L'inoculation est réalisée avec 10<sup>7</sup> bactéries dans un trou creusé à l'aide d'un cône stérile de micropipette. Les tubercules sont incubés à 28°C pendant 48h à 72h en atmosphère humide. Les feuilles d'endives sont scarifiées dans la longueur à l'aide d'un scalpel stérile. Un inoculum de 10<sup>7</sup> bactéries est déposé au niveau de l'incision. Les feuilles sont incubées à 28°C pendant 24h à 72h en atmosphère humide.

### 6.3 Test de production d'exopolysaccharides

10<sup>7</sup> bactéries sont déposées sur milieu minimum 63 gélosé contenant 0,2% de glycérol. Après 48h d'incubation à 28°C, la mucosité (aspect visqueux des colonies) est observée.

### 6.4 Test de motilité

10<sup>6</sup> bactéries (dans 5µL) sont déposées sur un milieu faiblement gélosé (0,4%). Après 30h d'incubation à 28°C, les souches motiles ont formé un halo de nage qui est mesuré.

### 6.5 Sensibilité au stress oxydatif (D'après Haque *et al.*, 2009 [267])

6 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) sont ajoutés à une culture en milieu LB de bactéries en phase stationnaire. La suspension est incubée à 28°C avec agitation. A différents temps, un aliquot de la culture est prélevé, les bactéries sont diluées de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup> et étalées sur milieu LB. Après 24h, le nombre d'UFC (unité formatrice de colonies) est compté et le pourcentage de survivants calculé.

### **6.6 Formation d'une pellicule (D'après Haque *et al.*, 2009 [267])**

Le milieu SOBG est inoculé par  $10^6$  bactéries/ml. La formation de la pellicule s'observe après 48h d'incubation à 28°C sans agitation.

## **7. Analyses statistiques**

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Xlstat. Le test utilisé est celui de Wilcoxon Mann Whitney.

# Bibliographie

1. McIntire, F.C., W.H. Peterson, and A.J. Riker, *A polysaccharide produced by the crown-gall organism*. Journal of Biological Chemistry, 1942. **143**(2): p. 491-496.
2. Vanden Boom, T. and J.E. Cronan, Jr., *Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism*. Annu Rev Microbiol, 1989. **43**: p. 317-43.
3. Kadner, R.J., *Cytoplasmic membrane*, in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, Editor. 1996, American Society for Microbiology: Washington, DC. p. 58-87.
4. Ruiz, N., D. Kahne, and T.J. Silhavy, *Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(9): p. 677-83.
5. Sato, T., K. Ito, and T. Yura, *Membrane proteins of Escherichia coli K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes*. Eur J Biochem, 1977. **78**(2): p. 557-67.
6. Pallen, M.J. and N.J. Matzke, *From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(10): p. 784-90.
7. Cayley, D.S., H.J. Guttman, and M.T. Record, Jr., *Biophysical characterization of changes in amounts and activity of Escherichia coli cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress*. Biophys J, 2000. **78**(4): p. 1748-64.
8. Graham, L.L., T.J. Beveridge, and N. Nanninga, *Periplasmic space and the concept of the periplasm*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(9): p. 328-9.
9. Stock, J.B., B. Rauch, and S. Roseman, *Periplasmic space in Salmonella typhimurium and Escherichia coli*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7850-61.
10. Hobot, J.A., et al., *Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods*. J Bacteriol, 1984. **160**(1): p. 143-52.
11. Van Golde, L.M., *Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1368-72.
12. Miller, K.J., E.P. Kennedy, and V.N. Reinhold, *Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides*. Science, 1986. **231**(4733): p. 48-51.
13. Bohin, J.P., *Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **186**(1): p. 11-9.
14. Bohin, J.P. and J.M. Lacroix, *Osmoregulation in the periplasm*, in *The periplasm*, M. Ehrmann, Editor. 2006, American Society for Microbiology Washington, DC. p. 325--341.
15. Goldberg, D.E., M.K. Rumley, and E.P. Kennedy, *Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglyceroltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5513-7.
16. Coge, V., et al., *Osmoregulated periplasmic glucans of Erwinia chrysanthemi*. J Bacteriol, 2001. **183**(10): p. 3127-33.
17. Talaga, P., B. Fournet, and J.P. Bohin, *Periplasmic glucans of Pseudomonas syringae pv. syringae*. J Bacteriol, 1994. **176**(21): p. 6538-44.
18. Breedveld, M.W. and K.J. Miller, *Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae*. Microbiol Rev, 1994. **58**(2): p. 145-61.

19. Rolin, D.B., et al., *Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from Bradyrhizobium japonicum USDA 110*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1116**(3): p. 215-25.
20. Talaga, P., et al., *Cell-associated glucans of Burkholderia solanacearum and Xanthomonas campestris pv. citri: a new family of periplasmic glucans*. J Bacteriol, 1996. **178**(8): p. 2263-71.
21. York, W.S., *A conformational model for cyclic beta-(1-->2)-linked glucans based on NMR analysis of the beta-glucans produced by Xanthomonas campestris*. Carbohydr Res, 1995. **278**(2): p. 205-25.
22. Talaga, P., et al., *Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum*. Eur J Biochem, 2002. **269**(10): p. 2464-72.
23. Debarbieux, L., A. Bohin, and J.P. Bohin, *Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6692-8.
24. Weissborn, A.C. and E.P. Kennedy, *Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from Escherichia coli for the elongation of beta 1----2-linked polyglucose chains*. J Biol Chem, 1984. **259**(20): p. 12644-51.
25. Loubens, I., et al., *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, 1993. **10**(2): p. 329-40.
26. Lequette, Y., et al., *Identification of mdoD, an mdoG paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures*. J Bacteriol, 2004. **186**(12): p. 3695-702.
27. Jackson, B.J. and E.P. Kennedy, *The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membrane-bound phosphoglycerol transferase*. J Biol Chem, 1983. **258**(4): p. 2394-8.
28. Lequette, Y., et al., *Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in Escherichia coli: the membrane-bound and the soluble periplasmic phosphoglycerol transferases are encoded by the same gene*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 2): p. 476-83.
29. Lacroix, J.M., et al., *The mdoC gene of Escherichia coli encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans*. J Bacteriol, 1999. **181**(12): p. 3626-31.
30. Bontemps-Gallo, S., et al., *Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in Escherichia coli: the phosphoethanolamine transferase is encoded by opgE*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 371429.
31. Lacroix, J.M., et al., *The mdoA locus of Escherichia coli consists of an operon under osmotic control*. Mol Microbiol, 1991. **5**(7): p. 1745-53.
32. Lacroix, J.M., et al., *Molecular cloning and expression of a locus (mdoA) implicated in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1989. **3**(9): p. 1173-82.



33. Poolman, B., et al., *How do membrane proteins sense water stress?* Mol Microbiol, 2002. **44**(4): p. 889-902.
34. Bhagwat, A.A., et al., *Further Studies of the Role of Cyclic  $\beta$ -Glucans in Symbiosis. An *ndvC* Mutant of *Bradyrhizobium japonicum* Synthesizes Cyclodecakis-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glucosyl.* Plant Physiology, 1999. **119**(3): p. 1057-1064.
35. Cogež, V., et al., *The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans.* Eur J Biochem, 2002. **269**(10): p. 2473-84.
36. Chen, R., et al., *Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic beta-(1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum*.* Can J Microbiol, 2002. **48**(11): p. 1008-16.
37. Bouchart, F., et al., *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, 2007. **153**(Pt 3): p. 760-7.
38. Cooper, B., et al., *Proteomic pleiotropy of *OpgGH*, an operon necessary for efficient growth of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* under low-osmotic conditions.* J Proteome Res, 2012. **11**(3): p. 1720-7.
39. Liu, L., et al., *Osmoregulated periplasmic glucans are needed for competitive growth and biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in leafy-green vegetable wash waters and colonization in mice.* FEMS Microbiol Lett, 2009. **292**(1): p. 13-20.
40. Page, F., et al., *Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity.* J Bacteriol, 2001. **183**(10): p. 3134-41.
41. Ebel, W., et al., *Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*.* J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6858-61.
42. Fiedler, W. and H. Roterling, *Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides.* J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14684-9.
43. Bhagwat, A.A., et al., *Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* are required for optimal virulence in mice.* Microbiology, 2009. **155**(Pt 1): p. 229-37.
44. Liu, L., et al., *Osmoregulated periplasmic glucans synthesis gene family of *Shigella flexneri*.* Arch Microbiol, 2010. **192**(3): p. 167-74.
45. Dylan, T., D.R. Helinski, and G.S. Ditta, *Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1 $\rightarrow$ 2)-glucan.* J Bacteriol, 1990. **172**(3): p. 1400-8.
46. Rajagopal, S., et al., *Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for sodium dodecyl sulfate resistance in *Escherichia coli*.* FEMS Microbiol Lett, 2003. **223**(1): p. 25-31.

47. Bouchart, F., *Impact des mutations OPG chez Erwinia chrysanthemi : Recherche de supprimeurs et analyse protéomique des mutants* 2006, Université de Lille 1.
48. Lequette, Y., et al., *Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the opgGH locus of Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2007. **153**(Pt 10): p. 3255-63.
49. Mahajan-Miklos, S., et al., *Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model*. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 47-56.
50. Arellano-Reynoso, B., et al., *Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(6): p. 618-25.
51. Martirosyan, A., et al., *Brucella beta 1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(11): p. e1002983.
52. Puvanesarajah, V., et al., *Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1985. **164**(1): p. 102-6.
53. Minsavage, G.V., et al., *Importance of opgHXcv of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in host-parasite interactions*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004. **17**(2): p. 152-61.
54. Young, G.M. and V.L. Miller, *Identification of novel chromosomal loci affecting Yersinia enterocolitica pathogenesis*. *Mol Microbiol*, 1997. **25**(2): p. 319-28.
55. Geremia, R.A., et al., *A Rhizobium meliloti mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(2): p. 880-4.
56. Dunlap, J., et al., *Nodule development induced by mutants of Bradyrhizobium japonicum defective in cyclic B-glucan synthesis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1996. **9**(7): p. 546-55.
57. Nothaft, H., et al., *Campylobacter jejuni free oligosaccharides: function and fate*. *Virulence*, 2010. **1**(6): p. 546-50.
58. Nothaft, H., et al., *Study of free oligosaccharides derived from the bacterial N-glycosylation pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(35): p. 15019-24.
59. Mogensen, J.E. and D.E. Otzen, *Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins*. *Mol Microbiol*, 2005. **57**(2): p. 326-46.
60. Dartigalongue, C., D. Missiakas, and S. Raina, *Characterization of the Escherichia coli sigma E regulon*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(24): p. 20866-75.
61. Bouchart, F., et al., *The virulence of a Dickeya dadantii 3937 mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans is restored by inactivation of the RcsCD-RcsB phosphorelay*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(13): p. 3484-90.
62. Hoch, J.A., *Two-component and phosphorelay signal transduction*. *Curr Opin Microbiol*, 2000. **3**(2): p. 165-70.
63. Mizuno, T., et al., *Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated ompC and ompF genes of Escherichia coli. Studies with wild-type and mutant OmpR proteins*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(2): p. 1008-12.
64. Clarke, D.J., *The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway*. *Future Microbiol*, 2010. **5**(8): p. 1173-84.

65. Szurmant, H., R.A. White, and J.A. Hoch, *Sensor complexes regulating two-component signal transduction*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(6): p. 706-15.
66. Gao, R. and A.M. Stock, *Biological insights from structures of two-component proteins*. *Annu Rev Microbiol*, 2009. **63**: p. 133-54.
67. Stock, A.M., V.L. Robinson, and P.N. Goudreau, *Two-component signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 183-215.
68. Mascher, T., J.D. Helmann, and G. Unden, *Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. **70**(4): p. 910-38.
69. Taylor, B.L. and I.B. Zhulin, *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(2): p. 479-506.
70. Goudreau, P.N. and A.M. Stock, *Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling*. *Curr Opin Microbiol*, 1998. **1**(2): p. 160-9.
71. Djordjevic, S. and A.M. Stock, *Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system*. *J Struct Biol*, 1998. **124**(2-3): p. 189-200.
72. Buelow, D.R. and T.L. Raivio, *Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases*. *Mol Microbiol*, 2010. **75**(3): p. 547-66.
73. Jiang, P. and A.J. Ninfa, *Regulation of autophosphorylation of Escherichia coli nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(6): p. 1906-11.
74. Pioszak, A.A., P. Jiang, and A.J. Ninfa, *The Escherichia coli PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module*. *Biochemistry*, 2000. **39**(44): p. 13450-61.
75. Pioszak, A.A. and A.J. Ninfa, *Genetic and biochemical analysis of phosphatase activity of Escherichia coli NRII (NtrB) and its regulation by the PII signal transduction protein*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(4): p. 1299-315.
76. Pioszak, A.A. and A.J. Ninfa, *Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) That prevent dephosphorylation by the NRII-PII complex in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(17): p. 5730-40.
77. Cano, D.A., et al., *Regulation of capsule synthesis and cell motility in Salmonella enterica by the essential gene igaA*. *Genetics*, 2002. **162**(4): p. 1513-23.
78. Raivio, T.L., et al., *Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the cpx envelope stress response*. *Mol Microbiol*, 2000. **37**(5): p. 1186-97.
79. Raivio, T.L. and T.J. Silhavy, *The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses*. *Curr Opin Microbiol*, 1999. **2**(2): p. 159-65.
80. Majdalani, N., et al., *Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(19): p. 6770-8.

81. Otto, K. and T.J. Silhavy, *Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2287-92.
82. Shin, S. and C. Park, *Modulation of flagellar expression in Escherichia coli by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR*. J Bacteriol, 1995. **177**(16): p. 4696-702.
83. Prigent-Combaret, C., et al., *Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in Escherichia coli via regulation of the csgD gene*. J Bacteriol, 2001. **183**(24): p. 7213-23.
84. Forst, S.A., J. Delgado, and M. Inouye, *DNA-binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of ompF in Escherichia coli are altered by envZ mutations and medium osmolarity*. J Bacteriol, 1989. **171**(6): p. 2949-55.
85. Khorchid, A., M. Inouye, and M. Ikura, *Structural characterization of Escherichia coli sensor histidine kinase EnvZ: the periplasmic C-terminal core domain is critical for homodimerization*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 1): p. 255-64.
86. Mizuno, T. and S. Mizushima, *Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes*. Mol Microbiol, 1990. **4**(7): p. 1077-82.
87. Jo, Y.L., et al., *Purification and characterization of the OmpR protein, a positive regulator involved in osmoregulatory expression of the ompF and ompC genes in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1986. **261**(32): p. 15252-6.
88. Kawaji, H., T. Mizuno, and S. Mizushima, *Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1979. **140**(3): p. 843-7.
89. Norioka, S., et al., *Interaction of a transcriptional activator, OmpR, with reciprocally osmoregulated genes, ompF and ompC, of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1986. **261**(36): p. 17113-9.
90. Gerken, H., et al., *MzrA: a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon*. Mol Microbiol, 2009. **72**(6): p. 1408-22.
91. Gerken, H. and R. Misra, *MzrA-EnvZ interactions in the periplasm influence the EnvZ/OmpR two-component regulon*. J Bacteriol, 2010. **192**(23): p. 6271-8.
92. Lau-Wong, I.C., et al., *Activation of the Cpx regulon destabilizes the F plasmid transfer activator, TraJ, via the HslVU protease in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2008. **67**(3): p. 516-27.
93. McEwen, J. and P. Silverman, *Chromosomal mutations of Escherichia coli that alter expression of conjugative plasmid functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 513-7.
94. Raivio, T.L. and T.J. Silhavy, *Transduction of envelope stress in Escherichia coli by the Cpx two-component system*. J Bacteriol, 1997. **179**(24): p. 7724-33.

95. Dorel, C., P. Lejeune, and A. Rodrigue, *The Cpx system of Escherichia coli, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities?* Res Microbiol, 2006. **157**(4): p. 306-14.
96. Raivio, T.L., S.K. Leblanc, and N.L. Price, *The Escherichia coli Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity.* J Bacteriol, 2013. **195**(12): p. 2755-67.
97. Vogt, S.L. and T.L. Raivio, *Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response.* FEMS Microbiol Lett, 2012. **326**(1): p. 2-11.
98. Hunke, S., R. Keller, and V.S. Muller, *Signal integration by the Cpx-envelope stress system.* FEMS Microbiol Lett, 2012. **326**(1): p. 12-22.
99. Wolfe, A.J., et al., *Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR.* J Bacteriol, 2008. **190**(7): p. 2314-22.
100. Raivio, T.L., D.L. Popkin, and T.J. Silhavy, *The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition.* J Bacteriol, 1999. **181**(17): p. 5263-72.
101. Buelow, D.R. and T.L. Raivio, *Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP.* J Bacteriol, 2005. **187**(19): p. 6622-30.
102. Snyder, W.B., et al., *Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway.* J Bacteriol, 1995. **177**(15): p. 4216-23.
103. Sledjeski, D.D. and S. Gottesman, *Osmotic shock induction of capsule synthesis in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol, 1996. **178**(4): p. 1204-6.
104. Mariscotti, J.F. and F. Garcia-del Portillo, *Genome expression analyses revealing the modulation of the Salmonella Rcs regulon by the attenuator IgaA.* J Bacteriol, 2009. **191**(6): p. 1855-67.
105. Carballes, F., et al., *Regulation of Escherichia coli cell division genes ftsA and ftsZ by the two-component system rcsC-rcsB.* Mol Microbiol, 1999. **34**(3): p. 442-50.
106. Francez-Charlot, A., et al., *RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2003. **49**(3): p. 823-32.
107. Garcia-Calderon, C.B., et al., *Virulence attenuation in Salmonella enterica rcsC mutants with constitutive activation of the Rcs system.* Microbiology, 2005. **151**(Pt 2): p. 579-88.
108. Huang, Y.H., L. Ferrieres, and D.J. Clarke, *The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae.* Res Microbiol, 2006. **157**(3): p. 206-12.
109. Majdalani, N. and S. Gottesman, *The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system.* Annu Rev Microbiol, 2005. **59**: p. 379-405.
110. Hagiwara, D., et al., *Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in Escherichia coli.* J Bacteriol, 2003. **185**(19): p. 5735-46.
111. Shiba, Y., et al., *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, 2004. **186**(19): p. 6526-35.
112. Shiba, Y., K. Matsumoto, and H. Hara, *DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in Escherichia coli.* Genes Genet Syst, 2006. **81**(1): p. 51-6.
  113. Krin, E., A. Danchin, and O. Soutourina, *RcsB plays a central role in H-NS-dependent regulation of motility and acid stress resistance in Escherichia coli.* Res Microbiol, 2010. **161**(5): p. 363-71.
  114. Stratmann, T., et al., *RcsB-BglJ activates the Escherichia coli leuO gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants.* Mol Microbiol, 2012. **83**(6): p. 1109-23.
  115. Pescaretti Mde, L., et al., *Transcriptional autoregulation of the RcsCDB phosphorelay system in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Microbiology, 2010. **156**(Pt 12): p. 3513-21.
  116. Fields, P.I., E.A. Groisman, and F. Heffron, *A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells.* Science, 1989. **243**(4894 Pt 1): p. 1059-62.
  117. Beier, D. and R. Gross, *Regulation of bacterial virulence by two-component systems.* Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(2): p. 143-52.
  118. Kato, A., H. Tanabe, and R. Utsumi, *Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in Escherichia coli K-12: identification of extracellular Mg<sup>2+</sup>-responsive promoters.* J Bacteriol, 1999. **181**(17): p. 5516-20.
  119. Minagawa, S., et al., *Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of Escherichia coli.* J Bacteriol, 2003. **185**(13): p. 3696-702.
  120. Choi, E., E.A. Groisman, and D. Shin, *Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake.* J Bacteriol, 2009. **191**(23): p. 7174-81.
  121. Llama-Palacios, A., et al., *The Erwinia chrysanthemi phoP-phoQ operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue.* Mol Microbiol, 2003. **49**(2): p. 347-57.
  122. Llama-Palacios, A., E. Lopez-Solanilla, and P. Rodriguez-Palenzuela, *Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of Erwinia chrysanthemi strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes.* J Bacteriol, 2005. **187**(6): p. 2157-62.
  123. Venkatesh, B., et al., *The Erwinia chrysanthemi 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants.* J Bacteriol, 2006. **188**(8): p. 3088-98.
  124. Hagiwara, D., T. Yamashino, and T. Mizuno, *A Genome-wide view of the Escherichia coli BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses.* Biosci Biotechnol Biochem, 2004. **68**(8): p. 1758-67.
  125. Lee, L.J., J.A. Barrett, and R.K. Poole, *Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured Escherichia coli to zinc.* J Bacteriol, 2005. **187**(3): p. 1124-34.

126. Perez, J.C. and E.A. Groisman, *Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 283-93.
127. Merighi, M., et al., *Role of Salmonella enterica serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription*. J Bacteriol, 2006. **188**(1): p. 141-9.
128. Hyytiainen, H., et al., *The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen Erwinia carotovora ssp. carotovora*. Mol Microbiol, 2003. **50**(3): p. 795-807.
129. Tomenius, H., et al., *The Escherichia coli BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract*. BMC Microbiol, 2006. **6**: p. 27.
130. Zhang, J.P. and S. Normark, *Induction of gene expression in Escherichia coli after pilus-mediated adherence*. Science, 1996. **273**(5279): p. 1234-6.
131. Lapouge, K., et al., *Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour*. Mol Microbiol, 2008. **67**(2): p. 241-53.
132. Lebeau, A., et al., *The GacA global regulator is required for the appropriate expression of Erwinia chrysanthemi 3937 pathogenicity genes during plant infection*. Environ Microbiol, 2008. **10**(3): p. 545-59.
133. Chavez, R.G., et al., *The physiological stimulus for the BarA sensor kinase*. J Bacteriol, 2010. **192**(7): p. 2009-12.
134. Ishige, K., et al., *A novel device of bacterial signal transducers*. EMBO J, 1994. **13**(21): p. 5195-202.
135. Pernestig, A.K., O. Melefors, and D. Georgellis, *Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 225-31.
136. Heeb, S. and D. Haas, *Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria*. Mol Plant Microbe Interact, 2001. **14**(12): p. 1351-63.
137. Pernestig, A.K., et al., *The Escherichia coli BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources*. J Bacteriol, 2003. **185**(3): p. 843-53.
138. Cui, Y., A. Chatterjee, and A.K. Chatterjee, *Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of Erwinia carotovora subsp. carotovora on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc*. Mol Plant Microbe Interact, 2001. **14**(4): p. 516-26.
139. Parkins, M.D., H. Ceri, and D.G. Storey, *Pseudomonas aeruginosa GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation*. Mol Microbiol, 2001. **40**(5): p. 1215-26.
140. Reimann, C., et al., *The global activator GacA of Pseudomonas aeruginosa PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase*. Mol Microbiol, 1997. **24**(2): p. 309-19.
141. Castaneda, M., et al., *The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6787-93.

142. Whistler, C.A., et al., *The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in Pseudomonas fluorescens Pf-5*. J Bacteriol, 1998. **180**(24): p. 6635-41.
143. Hirsch, M. and T. Elliott, *Role of ppGpp in rpoS stationary-phase regulation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(18): p. 5077-87.
144. Mukhopadhyay, S., et al., *Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in Escherichia coli is dependent on BarA, a probable two-component regulator*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 371-81.
145. Chatterjee, A., Y. Cui, and A.K. Chatterjee, *RsmC of Erwinia carotovora subsp. carotovora negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by binding FlhD and modulating transcriptional activity of the master regulator, FlhDC*. J Bacteriol, 2009. **191**(14): p. 4582-93.
146. Sonnleitner, E. and D. Haas, *Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in Pseudomonas species*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(1): p. 63-79.
147. Yang, S., et al., *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, 2008. **21**(1): p. 133-42.
148. Wei, Z., J.F. Kim, and S.V. Beer, *Regulation of hrp genes and type III protein secretion in Erwinia amylovora by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS*. Mol Plant Microbe Interact, 2000. **13**(11): p. 1251-62.
149. Wei, Z.M., B.J. Sneath, and S.V. Beer, *Expression of Erwinia amylovora hrp genes in response to environmental stimuli*. J Bacteriol, 1992. **174**(6): p. 1875-82.
150. Li, Y., et al., *The plant phenolic compound p-coumaric acid represses gene expression in the Dickeya dadantii type III secretion system*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(5): p. 1223-8.
151. Yap, M.N., C.H. Yang, and A.O. Charkowski, *The Response regulator HrpY of Dickeya dadantii 3937 regulates virulence genes not linked to the hrp cluster*. Mol Plant Microbe Interact, 2008. **21**(3): p. 304-14.
152. Grimm, C., W. Aufsatz, and N.J. Panopoulos, *The hrpRS locus of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit*. Mol Microbiol, 1995. **15**(1): p. 155-65.
153. Alfano, J.R. and A. Collmer, *Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall*. Plant Cell, 1996. **8**(10): p. 1683-1698.
154. Goodman, R.N. and A.J. Novacky, *The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon* 1994.
155. Caspi, R., et al., *The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D473-9.
156. Iuchi, S. and E.C. Lin, *Adaptation of Escherichia coli to respiratory conditions: regulation of gene expression*. Cell, 1991. **66**(1): p. 5-7.



157. Jovanovic, G., C. Engl, and M. Buck, *Physical, functional and conditional interactions between ArcAB and phage shock proteins upon secretin-induced stress in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2009. **74**(1): p. 16-28.
158. Perrenoud, A. and U. Sauer, *Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(9): p. 3171-9.
159. Salmon, K.A., et al., *Global gene expression profiling in Escherichia coli K12: effects of oxygen availability and ArcA*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15084-96.
160. Stewart, V., *Dual interacting two-component regulatory systems mediate nitrate- and nitrite-regulated gene expression in Escherichia coli*. Res Microbiol, 1994. **145**(5-6): p. 450-4.
161. Constantinidou, C., et al., *A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as Escherichia coli K12 adapts from aerobic to anaerobic growth*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4802-15.
162. Kim, J.R. and K.H. Cho, *The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in E. coli realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises*. Comput Biol Chem, 2006. **30**(6): p. 438-44.
163. Bourret, R.B., et al., *Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7085-8.
164. Grebe, T.W. and J.B. Stock, *The histidine protein kinase superfamily*. Adv Microb Physiol, 1999. **41**: p. 139-227.
165. Capra, E.J. and M.T. Laub, *Evolution of two-component signal transduction systems*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 325-47.
166. Oshima, T., et al., *Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of Escherichia coli K-12*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 281-91.
167. Yamamoto, K., et al., *Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1448-56.
168. Zhou, L., et al., *Phenotype microarray analysis of Escherichia coli K-12 mutants with deletions of all two-component systems*. J Bacteriol, 2003. **185**(16): p. 4956-72.
169. Clarke, E.J. and C.A. Voigt, *Characterization of combinatorial patterns generated by multiple two-component sensors in E. coli that respond to many stimuli*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(3): p. 666-75.
170. Ache, B.W. and J.M. Young, *Olfaction: diverse species, conserved principles*. Neuron, 2005. **48**(3): p. 417-30.
171. Bar-Cohen, Y., *Biomimetics--using nature to inspire human innovation*. Bioinspir Biomim, 2006. **1**(1): p. P1-P12.
172. Winslow, C.E., et al., *The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types*. J Bacteriol, 1920. **5**(3): p. 191-229.

173. Hauben, L., et al., *Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae*. Syst Appl Microbiol, 1998. **21**(3): p. 384-97.
174. Kwon, S.W., et al., *Phylogenetic analysis of Erwinia species based on 16S rRNA gene sequences*. Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(4): p. 1061-7.
175. Samson, R., et al., *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, 2005. **55**(Pt 4): p. 1415-27.
176. Pérombelon, M.C.M., *Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis*. Plant Pathology, 2002. **51**(1): p. 1-12.
177. Hélias, V., A.C. Le Roux, and F. Monfort, *Potato blackleg in France : incidence of causal Erwinias species and field symptoms expression.*, in *1st International Erwinia workshop*. 2006: Dundee, Scotland.
178. Costechareyre, D., et al., *Dickeya dadantii, a plant pathogenic bacterium producing Cyt-like entomotoxins, causes septicemia in the pea aphid Acyrthosiphon pisum*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30702.
179. Costechareyre, D., et al., *Transcriptome of Dickeya dadantii infecting Acyrthosiphon pisum reveals a strong defense against antimicrobial peptides*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54118.
180. Grenier, A.M., et al., *The phytopathogen Dickeya dadantii (Erwinia chrysanthemi 3937) is a pathogen of the pea aphid*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(3): p. 1956-65.
181. Charkowski, A.O., et al., *The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity*. Annual Review of Phytopathology, 2012. **50**(1): p. 425-449.
182. Goudeau, D.M., et al., *The salmonella transcriptome in lettuce and cilantro soft rot reveals a niche overlap with the animal host intestine*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(1): p. 250-62.
183. Yamazaki, A., et al., *Commensal effect of pectate lyases secreted from Dickeya dadantii on proliferation of Escherichia coli O157:H7 EDL933 on lettuce leaves*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(1): p. 156-62.
184. Albersheim, P., et al., *An hypothesis; the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants*, in *Pectins and pectinases*, J. Visser and A.G.J. Voragen, Editors. 1996, Elsevier Science BV: Amsterdam. p. 47-55.
185. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., et al., *Regulation of pectinolysis in Erwinia chrysanthemi*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 213-57.
186. Laurent, F., et al., *Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of Erwinia chrysanthemi strain 3937*. Gene, 1993. **131**(1): p. 17-25.
187. Shevchik, V.E. and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, *Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Microbiol, 1997. **24**(6): p. 1285-301.

188. Boccara, M., J.L. Aymeric, and C. Camus, *Role of endoglucanases in Erwinia chrysanthemi 3937 virulence on Saintpaulia ionantha*. J Bacteriol, 1994. **176**(5): p. 1524-6.
189. Zhou, S., et al., *Enhancement of expression and apparent secretion of Erwinia chrysanthemi endoglucanase (encoded by celZ) in Escherichia coli B*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(6): p. 2439-45.
190. Delepelaire, P. and C. Wandersman, *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, 1991. **5**(10): p. 2427-34.
191. Blot, N., et al., *The oligogalacturonate-specific porin KdgM of Erwinia chrysanthemi belongs to a new porin family*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7936-44.
192. Condemine, G. and A. Ghazi, *Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of Dickeya dadantii (Erwinia chrysanthemi)*. J Bacteriol, 2007. **189**(16): p. 5955-62.
193. Nasser, W., V.E. Shevchik, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, *Analysis of three clustered polygalacturonase genes in Erwinia chrysanthemi 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator*. Mol Microbiol, 1999. **34**(4): p. 641-50.
194. Shevchik, V.E., et al., *The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 1999. **181**(13): p. 3912-9.
195. Shevchik, V.E. and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, *PaeX, a second pectin acetylesterase of Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 2003. **185**(10): p. 3091-100.
196. Shevchik, V.E., et al., *Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 1999. **181**(5): p. 1652-63.
197. Boyer, J.S., *Growth-induced water potentials originate from wall yielding during growth*. J Exp Bot, 2001. **52**(360): p. 1483-8.
198. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., N. Blot, and S. Reverchon, *Identification of TogMNAB, an ABC transporter which mediates the uptake of pectic oligomers in Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Microbiol, 2001. **41**(5): p. 1113-23.
199. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and S. Reverchon, *Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Microbiol, 2001. **41**(5): p. 1125-32.
200. Lallemand, V., *Dissection des interactions entres les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)*. , in Institut national des sciences appliquées de Lyon. 2010.
201. Nasser, W., S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy, *Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of Erwinia chrysanthemi*. Mol Microbiol, 1992. **6**(2): p. 257-65.

202. Reverchon, S., W. Nasser, and J. Robert-Baudouy, *pecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in Erwinia chrysanthemi*. Mol Microbiol, 1994. **11**(6): p. 1127-39.
203. Reverchon, S., et al., *Characterization of indigoidine biosynthetic genes in Erwinia chrysanthemi and role of this blue pigment in pathogenicity*. J Bacteriol, 2002. **184**(3): p. 654-65.
204. Hommais, F., et al., *PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 2008. **190**(22): p. 7508-22.
205. Condemine, G., et al., *The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in Erwinia chrysanthemi*. Mol Plant Microbe Interact, 1999. **12**(1): p. 45-52.
206. Gouesbet, G., et al., *Characterization of the Erwinia chrysanthemi osmoprotectant transporter gene ousA*. J Bacteriol, 1996. **178**(2): p. 447-55.
207. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., H. Dominguez, and J. Robert-Baudouy, *Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 1992. **174**(23): p. 7807-18.
208. Lojkowska, E., et al., *Characterization of the pell gene encoding a novel pectate lyase of Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Microbiol, 1995. **16**(6): p. 1183-95.
209. Nachin, L. and F. Barras, *External pH: an environmental signal that helps to rationalize pel gene duplication in Erwinia chrysanthemi*. Mol Plant Microbe Interact, 2000. **13**(8): p. 882-6.
210. Masclaux, C., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and D. Expert, *Iron is a triggering factor for differential expression of Erwinia chrysanthemi strain 3937 pectate lyases in pathogenesis of African violets*. Mol. Plant - Microbe Interact, 1996. **9**: p. 198-205.
211. Sauvage, C. and D. Expert, *Differential regulation by iron of Erwinia chrysanthemi pectate lyases : Pathogenicity of iron transport regulatory (cbr) mutants*. Mol. Plant - Microbe Interact, 1994. **7**: p. 71-77.
212. Perombelon, M.C.M. and A. Kelman, *Ecology of the Soft Rot Erwinias*. Annual Review of Phytopathology, 1980. **18**(1): p. 361-387.
213. Reverchon, S., et al., *The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in Erwinia chrysanthemi*. J Bacteriol, 1997. **179**(11): p. 3500-8.
214. Nasser, W., et al., *Characterization of the Erwinia chrysanthemi expl-expR locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules*. Mol Microbiol, 1998. **29**(6): p. 1391-405.
215. Castang, S., et al., *Direct evidence for the modulation of the activity of the Erwinia chrysanthemi quorum-sensing regulator ExpR by acylhomoserine lactone pheromone*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29972-87.
216. Reverchon, S., et al., *Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in Erwinia chrysanthemi*. Mol Microbiol, 1998. **29**(6): p. 1407-18.

217. Nasser, W., et al., *Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of Dickeya dadantii*. Environ Microbiol, 2013. **15**(3): p. 865-80.
218. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
219. Latasa, C., et al., *Salmonella biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB*. J Bacteriol, 2012. **194**(14): p. 3708-22.
220. Wood, J.M., *Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(1): p. 230-62.
221. Barbieri, C.M. and A.M. Stock, *Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents*. Anal Biochem, 2008. **376**(1): p. 73-82.
222. Gao, R. and A.M. Stock, *Probing kinase and phosphatase activities of two-component systems in vivo with concentration-dependent phosphorylation profiling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(2): p. 672-7.
223. Wang, D., et al., *Genome-wide identification of genes regulated by the Rcs phosphorelay system in Erwinia amylovora*. Mol Plant Microbe Interact, 2012. **25**(1): p. 6-17.
224. Yoshida, T., et al., *Transcription regulation of ompF and ompC by a single transcription factor, OmpR*. J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17114-23.
225. Hagenmaier, S., Y.D. Stierhof, and U. Henning, *A new periplasmic protein of Escherichia coli which is synthesized in spheroplasts but not in intact cells*. J Bacteriol, 1997. **179**(6): p. 2073-6.
226. Quan, S., et al., *Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(3): p. 262-9.
227. Yap, M.N., et al., *Harpin mediates cell aggregation in Erwinia chrysanthemi 3937*. J Bacteriol, 2006. **188**(6): p. 2280-4.
228. Humphreys, S., et al., *Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of Salmonella enterica serotype Typhimurium*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4654-61.
229. Ayraud, S., et al., *Polyphosphate kinase: a new colonization factor of Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **243**(1): p. 45-50.
230. Ogawa, N., et al., *Inorganic polyphosphate in Vibrio cholerae: genetic, biochemical, and physiologic features*. J Bacteriol, 2000. **182**(23): p. 6687-93.
231. Stumpf, J.D. and P.L. Foster, *Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2005. **57**(3): p. 751-61.
232. Lechaire, J.P., et al., *Elemental characterization of microorganism granules by EFTEM in the tube wall of a deep-sea vent invertebrate*. Biol Cell, 2002. **94**(4-5): p. 243-9.
233. Braun, R.J., et al., *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1033-45.
234. Bohin, A., et al., *GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives*. Anal Biochem, 2005. **340**(2): p. 231-44.

235. Yap, M.N., et al., *The Erwinia chrysanthemi type III secretion system is required for multicellular behavior*. J Bacteriol, 2005. **187**(2): p. 639-48.
236. Barras, F., F. Van Gijsegem, and A.K. Chatterjee, *Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot Erwinia*. Annual Review of Phytopathology, 1994. **32**(1): p. 201-234.
237. Collmer, A. and N.T. Keen, *The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis*. Annual Review of Phytopathology, 1986. **24**(1): p. 383-409.
238. Dereeper, A., et al., *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W465-9.
239. Huffer, S., et al., *Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(18): p. 6400-8.
240. Aricha, B., et al., *Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4638-44.
241. Brown, J.L., et al., *Acid habituation of Escherichia coli and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance*. Int J Food Microbiol, 1997. **37**(2-3): p. 163-73.
242. Kieft, T.L., et al., *Survival and phospholipid Fatty Acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(4): p. 1531-42.
243. Mejia, R., M.C. Gomez-Eichelmann, and M.S. Fernandez, *Escherichia coli membrane fluidity as detected by excimerization of dipyrenylpropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(1): p. 156-60.
244. Kingston, A.W., et al., *A sigmaW-dependent stress response in Bacillus subtilis that reduces membrane fluidity*. Mol Microbiol, 2011. **81**(1): p. 69-79.
245. Sochacki, K.A., et al., *Protein diffusion in the periplasm of E. coli under osmotic stress*. Biophys J, 2011. **100**(1): p. 22-31.
246. Baer, S.H., H.P. Blaschek, and T.L. Smith, *Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol, 1987. **53**(12): p. 2854-61.
247. Burdette, D.S., et al., *Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C(30)) fatty acids in alcohol tolerance of Thermoanaerobacter ethanolicus*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(4): p. 1914-8.
248. Ding, J., et al., *Tolerance and stress response to ethanol in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **85**(2): p. 253-63.
249. Kohanski, M.A., et al., *Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death*. Cell, 2008. **135**(4): p. 679-90.
250. Nasser, W., et al., *PecS and PecT coregulate the synthesis of HrpN and pectate lyases, two virulence determinants in Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Plant Microbe Interact, 2005. **18**(11): p. 1205-14.

251. Surgey, N., J. Robert-Baudouy, and G. Condemine, *The Erwinia chrysanthemi pecT gene regulates pectinase gene expression*. J Bacteriol, 1996. **178**(6): p. 1593-9.
252. Bontemps-Gallo, S., et al., *Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria Dickeya dadantii*. Environ Microbiol, 2013. **15**(3): p. 881-94.
253. Vieira, J. and J. Messing, *The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers*. Gene, 1982. **19**(3): p. 259-68.
254. de Lorenzo, V. and K.N. Timmis, *Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons*. Methods Enzymol, 1994. **235**: p. 386-405.
255. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p. 103-19.
256. Bertani, G., *Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems*. J Bacteriol, 2004. **186**(3): p. 595-600.
257. Miller, J.H., *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. 1992: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
258. Kennedy, E.P., *Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(4): p. 1092-5.
259. Resibois, A., et al., *phiEC2, a new generalized transducing phage of Erwinia chrysanthemi*. Virology, 1984. **137**(1): p. 102-12.
260. Hanahan, D., *Studies on Transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol., 1983. **166**: p. 557-580.
261. Sambrook, J.E., F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
262. Torriani, A., *Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo*. J Bacteriol, 1968. **96**(4): p. 1200-7.
263. Spiro, R.G., *Analysis of sugars found in glycoproteins*, in *Methods in Enzymology*. 1966, Academic Press. p. 3-26.
264. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
265. Moran, F., S. Nasuno, and M.P. Starr, *Extracellular and intracellular polyglacturonic acid trans-eliminases of Erwinia carotovora*. Arch Biochem Biophys, 1968. **123**: p. 298-306.
266. Rouanet, C. and W. Nasser, *The PecM protein of the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi, membrane topology and possible involvement in the efflux of the blue pigment indigoidine*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 309-18.

267. Haque, M.M., et al., *SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in Dickeya dadantii 3937*. J Bacteriol, 2009. **191**(17): p. 5409-18.