

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Présentée par

Gilles Boussemart

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

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

**Rôle des glucanes périplasmiques osmorégulés
dans la perception du signal par les systèmes à
deux composants chez *Dickeya dadantii***

Soutenue le 18 octobre 2010, devant la commission d'examen composée de :

Président :	Jean-Claude Michalski
Rapporteurs :	Nicolas Bayan Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat
Examineurs :	Laurent Debarbieux Michel Simonet
Directeur de Thèse :	Jean-Marie Lacroix

Sommaire

Sommaire

• Remerciements	7
• Introduction	9
A. L'enveloppe de Bactéries à Gram négatif	9
I. La membrane interne ou membrane cytoplasmique	9
1. La double couche lipidique	9
2. Les protéines de la membrane interne	10
II. La membrane externe	10
1. La double couche lipidique	10
2. Les protéines de la membrane externe	12
III. Le périplasme	12
1. Le peptidoglycane	12
2. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)	13
3. Les protéines périplasmiques	13
IV. Les structures associées à l'enveloppe	14
1. La capsule	14
2. Les flagelles	14
3. Les Pilis	15
4. Les systèmes de transports des protéines	15
a. La machinerie Sec	15
b. Le système TAT	16
c. Les voies de sécrétion	17
▪ Le système de type I	17
▪ Le système de type II	18
▪ Le système de type III	18
▪ Le système de type IV	19
▪ Le système de type V	19
▪ Le système de type VI	19
B. Notre modèle d'étude <i>Dickeya dadantii</i> EC3937	20
I. Historique de la dénomination de notre modèle	20
II. <i>D. dadantii</i> , un phytopathogène	21

C. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)	23
I. Structures des OPG	23
1. Famille I	24
2. Famille II	24
3. Famille III	24
4. Famille IV	24
II. La biosynthèse des OPG chez <i>E. coli</i> et <i>D. dadantii</i>	25
III. Régulation de la biosynthèse des OPG	27
IV. Rôle des OPG	28
D. Les systèmes à deux composants	30
I. Structure	30
II. Le système EnvZ-OmpR	31
III. Le système RcsCD-RcsB	32
1. Les protéines du phosphorelais Rcs	33
2. Signalisation du système RcsCD-RcsB	34
a. La cascade de phosphorylation	34
b. Les cibles du système RcsCD-RcsB	35
c. Les protéines influençant l'activité du système RcsCD-RcsB	36
3. Induction du système RcsCD-RcsB	37
a. Conditions de croissance	37
b. Perturbations au niveau de l'enveloppe	37
IV. La perception par les systèmes à deux composants	37
• Objectifs de travail	39
• Résultats	40
A. Analyse des relations entre le système phosphorelais RcsCD-RcsB et les OPG	40
I. Impact des mutations sur la mucosité de <i>D. dadantii</i>	40
II. Impact des mutations sur la motilité de <i>D. dadantii</i>	41
III. Impact des mutations sur la production et la sécrétion d'exoenzymes	41
1. Les protéases	41
2. Les cellulases	41
3. Les pectinases	41
IV. Impact des mutations sur la virulence de <i>D. dadantii</i> .	44
1. Virulence sur tubercule de pomme de terre	44
2. Virulence sur feuille d'endive	44

V. Impact des mutations sur l'activité de deux gènes régulés par le système Rcs	45
1. <i>flhDC</i>	46
2. <i>ftsAZ</i>	46
VI. La mutation <i>rscC2</i> est co-dominante	48
VII. Conclusion	50
B. Influence de la quantité d'OPG synthétisés sur l'activité du système RcsCD RcsB	53
I. Construction d'un système de synthèse contrôlée d'OPG	53
1. Efficacité de la construction chez <i>E. coli</i>	53
2. Le miniTn5 Sp/Sm <i>araC</i> P _{BAD} <i>opgGH</i>	54
II. Phénotypes de la souche NFB3835	54
1. La motilité	54
2. Activité des exoenzymes	55
a. Les protéases	55
b. Les cellulases	56
c. Les pectinases	56
3. Virulence sur tubercule de pomme de terre	57
4. La mucosité	57
5. Bilan	58
III. Evaluation du niveau de transcription de l'opéron <i>opgGH</i> sous le contrôle du promoteur P _{BAD}	59
1. La fusion transcriptionnelle P _{BAD} <i>opgG-uidA-Kan</i>	59
2. Activité transcriptionnelle du promoteur P _{BAD} en fonction de la quantité d'arabinose	59
IV. Dosage de la quantité d'OPG produite par la souche NFB3837 en fonction de la quantité d'arabinose	60
V. Effet de la variation de la quantité d'OPG sur l'activité du système RcsCD-RcsB	62
C. Recherche de gènes cibles des OPG	66
I. La démarche expérimentale	66
1. Construction du système de création de fusions transcriptionnelles aléatoires	66
2. Optimisation de la localisation des insertions	66
3. Crible de la mutagenèse au miniTn5-GGm	68
II. Fusions transcriptionnelles sensibles à la présence d'OPG	69
1. Insertion II84 : ABF-0046981 <i>gnd</i>	69

2. Insertion V84 : ABF-0014778 GTP cyclohydrolase de type II	70
3. Insertion IV53 : ABF-0016070 <i>untM</i>	73
4. Insertion I20 et insertion 60 : ABF-0020341 <i>sttC</i> et ABF-0020342 <i>sttD</i>	75
5. Insertion 56 : à localiser	77
6. Insertion 77 : à localiser.	78
7. Insertion V28 : ABF-0015071	79
8. Insertion 62 : en amont de ABF-0046577 <i>yniA</i>	80
III. Bilan	82
D. Inactivation de gènes codant des régulateurs de systèmes à deux composants	85
• Discussion et perspectives	87
• Matériel et méthodes	99
A. Souches et milieux	99
I. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries	99
II. Génotypes des souches utilisées	100
III. Plasmides utilisés	104
B. Techniques génétiques	105
I. Transduction	105
II. Conjugaison	106
III. Transformation	106
IV. Electroporation	106
C. Techniques de biologie moléculaire	107
I. Extraction et purification d'ADN : plasmide, bande, ADNg	107
II. Enzymes de restriction et de modification	107
III. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR, PCR inverse, Tail PCR)	107
IV. Séquençage	111
D. Clonages moléculaires	112
I. Clonage du locus <i>rcsCBD</i>	112
II. Constructions des mutants (<i>rcsC</i> , Δ <i>rcsCBD</i> et <i>rcsB</i> ,)	113
1. Construction du mutant <i>rcsC</i>	113
2. Délétion du locus <i>rcsCBD</i> : Δ <i>rcsCBD</i>	114
3. Construction du mutant <i>rcsB</i>	114
4. Construction du mutant <i>rcsC2 rcsB</i>	115

III. Construction des fusions transcriptionnelles	115
1. Construction de la fusion <i>ftsA-uidA</i>	115
2. Construction de la fusion <i>flhD-uidA</i>	116
IV. Clonage de l'opéron <i>opgGH</i> sous le promoteur P _{araBAD}	116
V. Construction de la fusion transcriptionnelle P _{araBAD} <i>opgG-uidA</i>	119
VI. Construction du mutant <i>uvrY</i>	119
VII. Construction du mutant ABF-0046568	121
VII. Construction du mutant ABF-0015810	123
E. Techniques de biochimie	125
I. Dosage des protéines	125
II. Dosage des OPG	125
III. Dosage des activités β -glucuronidase	126
IV. Test phénotypiques : pectinase, cellulase, protéase	126
F. Test de virulence	127
• Références	128
• Annexes	140

Remerciements

Remerciements

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

Je tiens à remercier Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et Monsieur Nicolas Bayan d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, Monsieur Laurent Debarbieux et Monsieur Michel Simonet d'examiner ma thèse et Monsieur Jean-Claude Michalski de présider le jury.

Je remercie Jean-Pierre Bohin de m'avoir à l'époque accueilli dans son équipe. Merci à Jean-Marie Lacroix qui après avoir repris le flambeau m'a également accordé sa confiance dans la conduite des différents projets. Je le remercie également pour son encadrement, ses conseils et les discussions que nous avons pu échanger pendant ces années de thèse.

Je remercie Anne-France Prouvost, Edwige Madec ainsi que Franck Bouchart pour nos différents travaux en collaboration.

Merci à tous les membres passés et présents de l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes : Carmen Ödberg-Ferragut partie en retraite il y a peu de temps qui m'a supporté pendant tout ce temps et avec qui j'ai appris des rudiments d'espagnol "A palabras necias, oidos sordos" ; Virginie Cogez qui m'a encadré pendant mon master recherche et avec qui les discussions scientifiques sont toujours passionnées, je te souhaite bonne chance dans ces nouveaux horizons ; Jacqueline Dondeyne pour son aide précieuse, son soutien et sa confiance, tu es un peu la « maman » des GEBien ; Olivier Vidal pour toutes les discussions scientifiques « ou pas » ; Edwige Madec pour son aide en cette fin de thèse et Brigitte Delrue pour son aide dans le recherche d'emploi. Je n'oublie pas tous les étudiants du labo : Franck Bouchart, Eglantine Rollet, Aurélie Delangle, Anne-France Prouvost, Gaëlle Ezeque, Cendrella Lepleux et Sebastien Bontemps-Gallo pour tous les bons moments passés. Merci également à Peggy Gruau pour son aide en TP.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du C9 pour leur accueil et les différents échanges pendant ces années de thèse en particulier David Dauvillée, Dominique Legrand, Joël Mazurier, Gérard Vergoten et Philippe Lagant

Merci à mes amis qui m'ont soutenu et je ne parle pas que de soirées trop arrosées. Vous êtes un peu plus loin maintenant mais c'est presque comme si je n'avais pas déménagé : Melanie et Vincent qui a même accepté de relire ce manuscrit t'inquiète on passera vous voir en Australie ; Xav, Robin, Yannick les matchs de foot sans vous c'est pas pareil ; Julie on se refait un tours de cave ? ; Bibi c'est bientôt la fin pour toi, Vivi et Thomas avec qui je me sens tout de suite pro sur mon mountain... ; Nico et Stef même si on s'est un peu perdu de vue ; Sylvain mon partenaire de sport et tous les autres Charlotte, Marion, Fab, Gaby, Cléa, Laetitia, Aurore, Anthony, Florence, Sophien, Claude, Phiphine et j'en oublie sûrement.

Un grand merci à toute ma famille et surtout à mes parents et à ma grand-mère qui m'ont toujours soutenu et permis d'arriver jusqu'ici.

Je remercie également l'ensemble de la famille Prouvost pour leur accueil au sein de la famille. Le modèle de vache demandé est très rare sur le marché mais je ne désespère pas de réunir le troupeau...

Enfin un grand merci à toi Anne-France pour ton soutien, ton amour et bien plus encore... Nous découvrons la Touraine ensemble et découvrirons ensemble beaucoup d'autres choses...

Introduction

A. L'enveloppe de Bactéries à Gram négatif

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est composée de deux membranes (bicouche lipidiques) délimitant un compartiment à part entière : le périplasma (Figure 1). L'enveloppe bactérienne assure de nombreux rôles : garante de l'intégrité cellulaire, elle est également un lieu d'échange avec l'environnement (nutriments, exoenzymes, informations...).

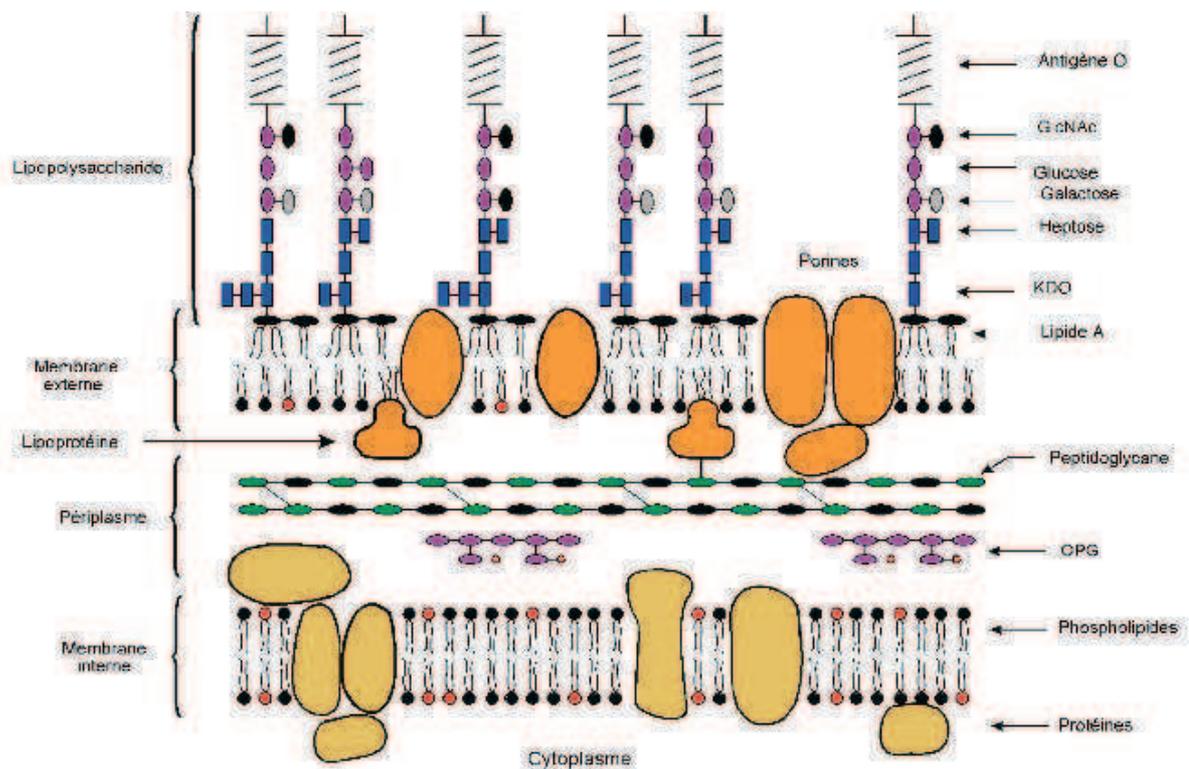


Figure 1 : Schéma de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (d'après Raetz 1986)

I. La membrane interne ou membrane cytoplasmique

1. La double couche lipidique

La membrane interne est une barrière hydrophobe sélective séparant le cytoplasme de son environnement. Elle régule le flux de nutriments et de métabolites entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette membrane est une double couche lipidique composée approximativement de 50% protéines et de 50% de phospholipides (Kadner, 1996). On retrouve trois phospholipides majeurs dont la proportion varie selon la souche et les conditions de cultures. Cependant, on estime qu'une membrane interne type d'*Escherichia coli* contient 70 à 80% de phosphatidyléthanolamine (PE), 15 à 25% de phosphatidylglycérol

(PG) et 5 à 10% de cardiolipide (CL) (Vanden Boom et Cronan 1989). Cette membrane peut également contenir des produits intermédiaires de biosynthèse en faible quantité. La composition en phospholipide influence de nombreuses fonctions telles que la réplication du chromosome, la translocation des protéines ou encore la résistance aux antibiotiques (Kadner 1996, Dowhan 1997). Les phospholipides servent également de précurseurs pour la synthèse d'autres molécules. Ainsi les groupements phosphoéthanolamines des PE et phosphoglycérols des PG peuvent être transférés aux glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) (Van Golde 1973) (cf chapitre C. Les OPG).

2. Les protéines de la membrane interne

La composition protéique de la membrane interne est variable. En effet selon la phase de croissance ou les conditions environnementales, le nombre et la proportion des espèces protéiques sont différents (induction ou répression de certains système de transport...). Chez *E. coli*, on estime qu'environ 800 ORFs codent des protéines de la membrane interne (Luirink et coll. 2005). Les protéines de la membrane interne interviennent dans un grand nombre de processus telles que la production d'énergie, le transport de molécules, la translocation ou la sécrétion de protéines, la perception de l'environnement... C'est également au niveau de cette membrane que sont synthétisés de nombreux constituants de l'enveloppe comme le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, les phospholipides, les OPG... (Kadner et coll. 1996)

II. La membrane externe

La membrane externe représente la partie de la bactérie exposée à l'environnement. De ce fait, elle possède de nombreuses fonctions de protections. Ainsi elle protège contre l'action de certains antibiotiques, des détergents, elle participe à l'inhibition de la phagocytose... (Kadner 1996)

1. La double couche lipidique

La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique. La couche exposée du côté périplasmique est composée des mêmes phospholipides que ceux de la membrane interne (PE, PG et CL) dans des proportions similaires (Delcour 2009). La couche exposée vers le milieu extérieur est composée de lipopolysaccharide (LPS). Le LPS joue un rôle structurale au sein

de la membrane externe mais il participe également, de part sa charge négative, à la résistance vis à vis des composés hydrophobes et à l'échappement à la phagocytose. Le LPS est composé de trois parties (figure 1 et 2) :

-La base : Le lipide A qui est la partie hydrophobe ancrée dans la membrane. Il est composé de deux glucosamines liés en $\beta 1,6$ et substitués par 6 à 7 acides gras saturés.

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

-La partie distale : L'antigène O qui est une partie polysaccharidique hydrophile. Il est composé d'unités répétitives de glucides (3 à 5 résidus selon les souches) et n'est pas présent chez *E. coli* K12.

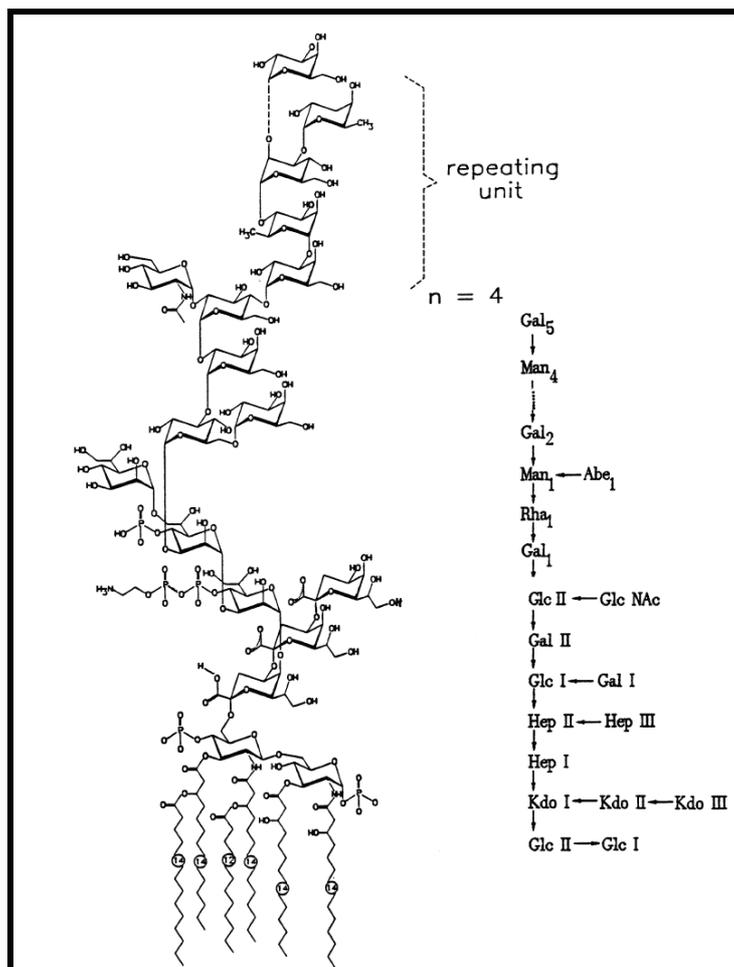


Figure 2 : Modèle de structure du lipopolysaccharide chez les entérobactéries (Kastowsky et coll. 1992)

2. Les protéines de la membrane externe

Les protéines de la membrane externe encore appelées OMP (Outer Membrane Protein) sont différentes de celles retrouvées dans la membrane interne. Parmi ces protéines, on retrouve des protéines transmembranaires et des protéines associées à la membrane grâce à une extrémité hydrophobe, les lipoprotéines (Nikaido 1996).

Les OMP transmembranaires peuvent assurer diverses fonctions, on retrouve ainsi des porines non spécifiques comme OmpC et OmpF (Pratt et coll. 1996) ou spécifiques comme LamB pour les maltodextrines (charbit 2003), des récepteurs de haute affinité comme par exemple BtuB pour la vitamine B12 (Fuller-Schaefer et Kadner 2005), des protéines de structure, des enzymes, des protéines participant à la sécrétion des protéines extracellulaires...

Chez *E. coli* on dénombre 90 lipoprotéines. La plus connue est la lipoprotéine de Braun présente en très grand nombre de copies dans la membrane externe. Près d'un tiers des lipoprotéines de Braun sont liées de façon covalente au peptidoglycane par leur extrémité C-terminale périplasmique permettant une fois de plus la stabilité de la membrane externe (Nikaido 1996). On peut également citer LolB, une lipoprotéine essentielle impliquée dans la mise en place des lipoprotéines dans la membrane externe (Narita et Tokuda 2006). D'autres lipoprotéines sont impliquées dans la signalisation des systèmes à deux composants. Par exemple, la lipoprotéine RcsF intervient dans la signalisation du système à deux composants RcsCD-RcsB (Majdalani et coll. 2005).

III. Le périplasme

Délimité par la membrane interne et la membrane externe, ce compartiment représente 20 à 40% du volume cellulaire (Stock et coll. 1977). Il formerait une sorte de gel visqueux (Hobot et coll., 1984) dans lequel on retrouve des protéines et deux types de glycanes spécifiques au monde bactérien : le peptidoglycane et les OPG.

1. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (figure 3), également appelé muréine, est un hétéropolymère composé de chaînes glycaniques (un motif disaccharidique répété de N-acétylglucosamine liés en β -1,4 à un acide N-acétylmuramique) reliées entre elles par des peptides. Ainsi le peptidoglycane forme un réseau dense autour de la cellule. Il permet de protéger la cellule des pressions osmotiques auxquelles elle peut être exposée. Il détermine également sa forme et sa taille

puisque la cellule n'est capable de s'allonger et de se diviser que si le peptidoglycane s'est élargit (Vollmer et coll. 2008). Le peptidoglycane contribue, enfin, à l'aspect visqueux du périplasme.

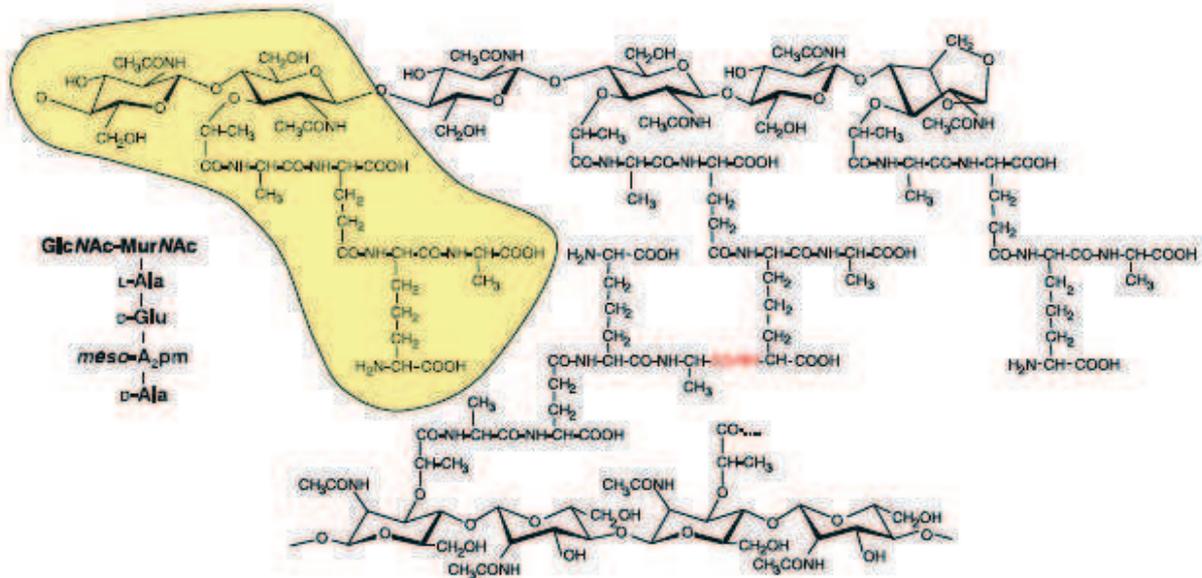


Figure 3 : Structure du peptidoglycane d'*Escherichia coli*.

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

2. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)

Les OPG sont des oligosaccharides présents dans le périplasme de la plupart des bactéries à Gram négatif. Leur concentration dépend de l'osmolarité du milieu. En effet, plus l'osmolarité est faible plus la quantité d'OPG est importante (Bohin et Lacroix 2007). Un chapitre décrit plus précisément les OPG dans la suite de l'introduction (cf chapitre C. Les OPG).

3. Les protéines périplasmiques

Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus (Oliver 1996), tels que :

- la synthèse et l'assemblage des constituants de l'enveloppe comme le peptidoglycane, le LPS ou les OPG.

- la sécrétion de protéines ou de polysaccharides extracellulaires.

-la mise en conformation des protéines comme la formation des ponts disulfure catalysée par DsbA et DsbC.

-la mise en place de structures telles que les pilis ou les flagelles.

-la détoxification en dégradant des toxiques comme la β -lactamase.

-la dégradation et/ou le transport de nutriments.

-la signalisation.

IV. Les structures associées à l'enveloppe

1. La capsule

La capsule est une structure associée à la membrane externe composée d'exopolysaccharides de haut poids moléculaire. La présence de la capsule se traduit par un phénotype muqueux des colonies sur milieu gélosé. La capsule est indispensable pour la colonisation de certaines niches. Elle intervient également dans la défense de la bactérie contre la phagocytose (Vimr et coll. 1995). Chez *E. coli* et *Dickeya dadantii* la synthèse des exopolysaccharides s'effectue par le produit des gènes *cps* pour « capsular polysaccharide synthesis ». Des conditions environnementales telles que la température, l'osmolarité, la dessiccation affectent la transcription des gènes *cps*. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire d'un système à deux composants le système RcsCD-RcsB (« regulator of capsule synthesis ») (Ebel et coll. 1997) (cf chapitre D. Les systèmes à deux composants).

2. Les flagelles

Les flagelles sont les organes de locomotion de la bactérie dans un milieu liquide. Leur nombre et l'emplacement des flagelles dépendent de l'espèce bactérienne considérée. Ainsi la bactéries du genre *Pseudomonas* ne possèdent qu'un flagelle polaire, alors qu'*E. coli* possède plusieurs flagelles répartis sur toute la surface bactérienne. Pour cette raison, *E. coli* est une bactérie dite péritriche.

Le flagelle est composé de trois parties (Figure 4) :

-le corps basal est le moteur flagellaire. Il est inclus dans l'enveloppe bactérienne.

-le crochet fait la liaison entre le corps basal et le filament. Il transmet la rotation du corps basal au filament.

-le filament d'une longueur variable (5 à 10 μm) est constitué de plusieurs sous unité d'une même protéine la flagelline.

Selon le sens de rotation du flagelle la bactérie nage ou culbute. Les bactéries s'éloignent d'un milieu hostile ou se rapprochent d'un milieu favorable en contrôlant le temps pendant lequel elles nagent ou tournent sur elle même.

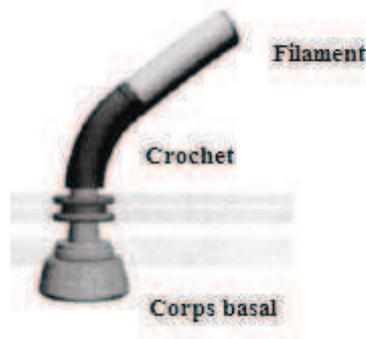


Figure 4 : Schéma représentant un flagelle (d'après Aizawa et Kubori, 1998)

3. Les Pilis

Les pilis sont des appendices protéiques situés sur la surface bactérienne. Ils sont constitués de protéines appelées pilines et participent à l'interaction avec les surfaces. Il en existe différents types. Les pilis de type I jouent un rôle dans les interactions hôte-pathogène en permettant l'attachement de la bactérie à des surfaces comme les cellules eucaryotes. Les pilis sexuels jouent un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne. Ils permettent l'attachement initial des partenaires. Les pilis de types IV interviennent dans le déplacement des bactéries sur des surfaces solides.

4. Les systèmes de transports des protéines

Chez *E. coli*, il existe deux systèmes de transport de protéines dont le translocon est inséré dans la membrane interne, le système Sec et le système TAT. Ces systèmes permettent le passage de protéines à travers la membrane interne (Figure 5). Ils sont également impliqués dans des voies de sécrétion.

a. La machinerie Sec

Le système Sec est le système majoritaire. Il utilise l'ATP pour exporter dans ou à travers la membrane interne des protéines non conformées. L'export peut s'effectuer de manière post-traductionnelle ou co-traductionnelle. Dans les deux cas, les protéines transloquées possèdent une séquence signal en N-terminale. Dans le premier cas, la protéine immature est reconnue

doivent donc être conformées avant d'être transloquées. Chez *E. coli*, le système TAT assure entre autre la translocation de la protéine OpgD impliquée dans la synthèse des OPG (Stanley et coll. 2001) (cf chapitre C. Les OPG).

c. Les voies de sécrétion

La sécrétion des protéines joue un rôle central dans la modulation des interactions des bactéries avec leur environnement. Chez les bactéries à Gram négatif, 6 systèmes de sécrétions ont été décrits jusqu'à présent (Figure 6).

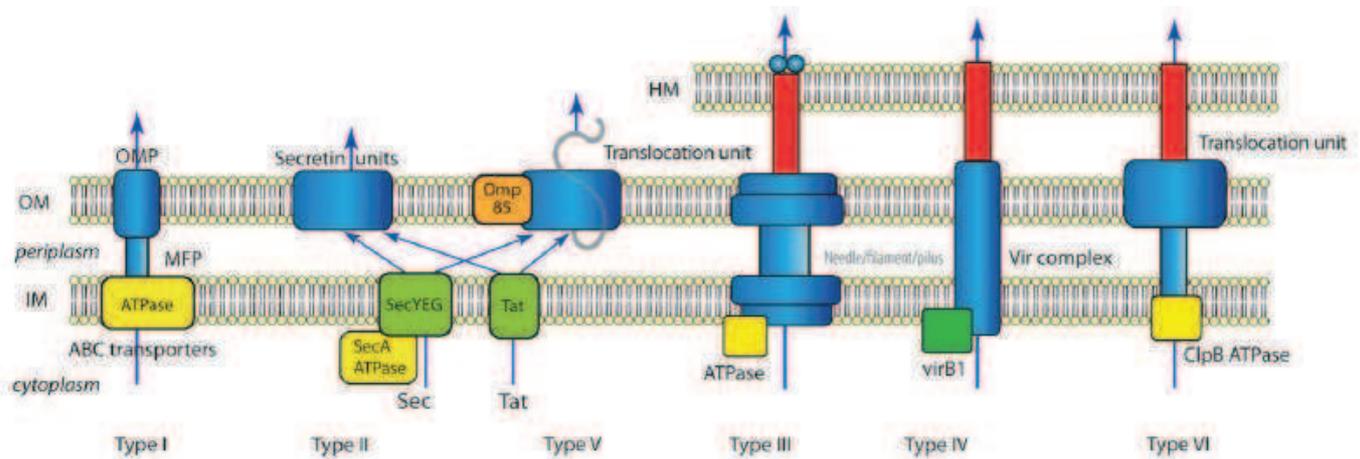


Figure 6 : Schéma représentant les systèmes de sécrétions chez les bactéries à Gram négatif (d'après Tseng et coll. 2009)

Le système de type I

Le système de sécrétion de type I utilise l'ATP pour exporter des protéines du cytoplasme vers le milieu extérieur. Il contient trois composants majeurs :

- un transporteur de type ABC (ATP-binding cassette).
- une protéine de la membrane externe (OMP).
- une protéine fusionnée à la membrane (MFP) qui fait le lien entre le transporteur de type ABC et la protéine de la membrane externe.

Le système de type I le plus décrit est celui de la sécrétion de l'hémolysine (HlyA) chez *E. coli* uropathogène. Ce transport fait intervenir les protéines HlyB (ABC) HlyD (MFP) et TolC (OMP) (Wandersman et Delepelaire 1990). Le facteur protéique de la membrane externe TolC peut également interagir avec d'autres types de transporteurs par exemple il intervient dans la résistance à de multiples agents antimicrobiens en formant en association avec AcrA

et AcrB une pompe à efflux. Ainsi chez *Erwinia amylovora* le complexe AcrAB/TolC confère la résistance aux phytoalexines produits par la plante (Burse et coll. 2004).

Le système de type II

La sécrétion via le système de type II s'effectue en deux étapes. La translocation à travers la membrane interne est prise en charge par le système Sec ou le système TAT. La deuxième étape met en jeu un complexe protéique (une quinzaine de protéines différentes) comprenant un large pore dans la membrane externe composé de plusieurs sous unités de sécrétine (Tseng et coll. 2009, Bayan et coll. 2006). Chez *D. dadantii* le pore est formé de sous unités de la protéine OutD (ce système est nommé le système Out). Les autres protéines du complexe sont impliquées dans l'ancrage du pore jusqu'à la membrane interne et dans l'ouverture et la fermeture du pore. On retrouve donc des protéines de la membrane interne, des pseudopilines qui traversent le périplasme jusqu'au pore et une ATPase intracellulaire fournissant l'énergie nécessaire à l'ouverture et à la fermeture du pore. La structure de cet ancrage ressemble beaucoup aux pilis de type IV. Ce système est impliqué dans la sécrétion de nombreux déterminant de la virulence telles que la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* et les pectinases et pectate lyases de notre modèle d'étude *D. dadantii*. Il existe parfois un deuxième système de sécrétion de type II indépendant du système Out, tel que le système Stt décrit récemment chez *D. dadantii* (Ferrandez et Condemine 2008).

Le système de type III

Ce système également appelé l'injectisome est typique des bactéries qui interagissent (pathogénie ou mutualisme) avec un hôte (animal ou végétal). Il présente de grandes analogies avec le flagelle. De nombreuses protéines sont nécessaires pour édifier l'injectisome. Dans de nombreux cas, les gènes codant les systèmes de type III sont retrouvés dans des îlots de pathogénie. La principale fonction connue de ce système est de délivrer à travers les membranes de la bactérie et de l'hôte des protéines qui vont moduler des fonctions de la cellule hôte. Par exemple le système Hrp est retrouvé chez de nombreux phytopathogènes tel que *D. dadantii* (Alfano et coll. 1997). Ce système est sous le contrôle du système à deux composants HrpX/HrpY (Yap et coll. 2005).

Le système de type IV

Le système de sécrétion de type IV se distingue des autres du fait qu'en plus de transporter des protéines, il est capable d'effectuer le transport d'acides nucléiques. Ce transfert s'effectue aussi bien vers des cellules animale ou végétale que des levures ou d'autres bactéries. On retrouve le système Tra d'*E. coli* ou le système VirB d'*agrobacterium tumefaciens* (Tseng et coll. 2009).

Le système de type V

Ce système permet la sécrétion de protéines telles que des adhésines, des toxines, des protéases...

On distingue trois sous classes de système de sécrétion de type V (Tseng et coll. 2009) :

-Les protéines sécrétées par la sous-classe Va sont appelées des autotransporteurs. En effet, après avoir traversé la membrane interne par la voie générale, ces protéines sont capables d'elle même de traverser la membrane externe grâce à un domaine en C-terminale formant un tonneau bêta. Cependant la protéine YaeT (Omp85) faciliterait cette translocation (Bernstein 2007).

-Le procédé de sécrétion par la sous-classe Vb est également appelé sécrétion à deux partenaires (TPS). En effet, une protéine contient le domaine en tonneau bêta et l'autre protéine est sécrétée grâce à la première. Ainsi l'adhésine HecA/HecB de *D. dadantii* est sécrétée par ce système.

-Les protéines de la sous-classe Vc sont des trimères où chaque polypeptide participe à la formation du tonneau bêta.

Le système de type VI

Ce système a été décrit très récemment (Filloux et coll. 2008). De nombreux composants sont nécessaires à la machine de sécrétion, cependant l'architecture exacte du système n'est pas encore connue. Ce système est requis pour la virulence de nombreux pathogènes. Chez *Vibrio cholerae*, il permettrait l'injection des protéines Hcp et VgrG dans les cellules hôtes. Cependant le rôle précis de ces effecteurs n'est pas connu.

B. Notre modèle d'étude *Dickeya dadantii* EC3937**I. Historique de la dénomination de notre modèle**

D. dadantii est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *enterobacteriaceae*. Cette protéobactérie est un phytopathogène responsable de la formation d'une pourriture molle sur un large spectre de plantes hôtes. Dans la littérature, *D. dadantii* était tout d'abord, et jusqu'à récemment, dénommée *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder et coll. 1953). L'espèce *E. chrysanthemi* tient son nom du fait qu'elle fut isolée à partir d'infection de chrysanthème (*Chrysanthemum morifolium*) (Burkholder et coll. 1953). A l'origine le genre *Erwinia* regroupait toutes les bactéries phytopathogènes à Gram négatif possédant des flagelles péritriches (Winslow et coll. 1917). Le genre *Erwinia* était donc très hétérogène. Puis les phytobactériologistes se sont accordés à suivre une classification établie par Dye (1968, 1969a, 1969b et 1969c) basée sur des critères de virulence. Ainsi le genre *Erwinia* était divisé en 4 groupes :

- Le groupe *amylovora* rassemble les *Erwiniae* ne produisant pas d'enzymes pectinolytique ni de pigment jaune et provoquant la mort nécrotique des plantes infectées. L'espèce la plus connue est *E. amylovora* responsable du feu bactérien.

- Le groupe *carotovora* rassemble les *Erwiniae* possédant une forte activité pectinolytique qui leur permet de causer la macération de tissus. On y retrouve *E. carotovora* et *E. chrysanthemi*.

- Le groupe *herbicola* rassemble les *Erwiniae* non pathogène ou pathogène opportuniste produisant un pigment jaune telles que *Erwinia herbicola* ou *Erwinia uredovora*.

- Le dernier groupe est le groupe des *Erwiniae* atypiques tel que *Erwinia dissolve*.

Suite à une étude phylogénétique *E. chrysanthemi* a été reclassé dans le genre *Pectobacterium* et renommée *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben et coll.1998). Plus récemment *E. chrysanthemi* a été transférée dans le genre *Dickeya* et porte désormais le nom de *Dickeya dadantii* (Samson et coll. 2005).

II. *D. dadantii*, un phytopathogène

D. dadantii est une bactérie phytopathogène à large spectre d'hôte capable d'infecter les tubercules de pomme de terre, les feuilles d'endives, le saintpaulia... Elle engendre la maladie dite de la pourriture molle. *D. dadantii* pénètre dans la plante par des blessures ou par des entrées naturelles. A l'intérieur de la plante, elle est retrouvée dans les espaces intercellulaires et dans une moindre mesure dans le système vasculaire. Elle peut rester ainsi dans les tissus végétaux pendant un long moment avant de provoquer la maladie. Différents obstacles doivent être surmontés afin de permettre la multiplication des bactéries et déclencher la maladie (disponibilité de nutriments, défenses de l'hôte). Cependant la principale condition environnementale permettant le passage de la période de latence à la maladie est la disponibilité d'eau libre (Pérombelon 2001). La maladie se manifeste alors par la pourriture qui est le résultat de la désorganisation du tissu végétal. Ces symptômes sont dus à la dégradation de la paroi des cellules végétales par une batterie d'enzymes sécrétées par *D. dadantii*. Parmi ces enzymes on retrouve des pectinases qui jouent un rôle prépondérant, des cellulases et des protéases.

-Les cellulases : *D. dadantii* produit deux cellulases. EGZ, codée par le gène *celZ*, est l'endoglucanase majeure, elle est sécrétée dans le milieu. EGY codée par le gène *celY* est une protéine périsplasmique. Ces cellulases semblent jouer un rôle mineur dans la pathogénie de *D. dadantii* (Boccaro et coll. 1994).

-Les protéases : Elles sont au nombre de quatre (PrtA, PrtB, PrtC et PrtG) et ne sont pas essentielles à la virulence. Ces métalloprotéases sont sécrétées dans le milieu par l'intermédiaire d'un système de sécrétion de type I, le système Prt composé des protéines PrtD, PrtE et PrtF (Delepelaire et Wandersman 1991).

-Les pectinases : *D. dadantii* possède un arsenal d'enzymes permettant la dégradation de la pectine. On retrouve une dizaine de pectate lyases, des pectine-estérases, une pectine lyase, des polygalacturonases et une oligogalacturonate lyase (Kazemi-Pour et coll. 2004). Cette grande diversité dans les activités enzymatiques reflète la complexité du polymère à dégrader. De plus le nombre important d'isoformes peut expliquer la capacité qu'a *D. dadantii* à infecter un large spectre de plantes hôtes. La production de pectinases est soumise à de nombreuses régulations. Chez *D. dadantii*, la présence des produits de dégradation de pectine est le principal signal déclenchant l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la pectinolyse. D'autres facteurs environnementaux influencent l'expression des gènes codant

les pectinases tels que la présence de métabolites de la plante hôte, la température, l'oxygène, la carence en fer ou en azote ou l'osmolarité. La production de pectinase est également dépendante de la phase de croissance et soumise à la répression catabolique (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll. 1996).

D'autres facteurs interviennent dans la virulence de *D. dadantii* tels que le système de sécrétion de type III Hrp (Yang et coll. 2002), les exopolysaccharides (Condemine et coll. 1999), le LPS (Shoonejans et coll. 1987), la motilité (Antúnez-Lamas et coll. 2009), l'assimilation du fer grâce aux deux sidérophores produits par *D. dadantii* la chrysobactine et l'achromobactine (Franza et coll. 2005, Enard et coll. 1988), la capacité à résister aux mécanismes de défense de la plante (López-Solanilla et coll. 2001, Santos 2001, Hassouni et coll. 1999) et les OPG décrits dans le chapitre suivant (Page et coll. 2001).

C. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)

Les OPG sont présents dans le périplasme de la plupart des bactéries à Gram négatif. Ils présentent différentes structures selon les espèces bactériennes les produisant, cependant ils partagent certaines caractéristiques communes (Bohin, 2000) :

- ce sont des oligosaccharides constitués d'un nombre limité d'unités c'est à dire de 5 à 24 unités.

- le seul sucre les constituant est le D-glucose.

- les unités de glucose sont liées majoritairement par des liaisons β -glucosidique

- Mises à part quelques exceptions, la concentration de ces glucanes dans le périplasme augmente en réponse à une baisse de l'osmolarité du milieu environnant.

Chez certaines espèces bactériennes, le squelette glucosidique des OPG peut être décoré par différents substituants. Ces substituants semblent appartenir à deux classes :

- les résidus originaires de phospholipides membranaires tel que le phosphoglycérol, la phosphoéthanolamine ou la phosphocholine.

- les résidus issus du métabolisme intermédiaire tel que le succinyle, l'acétyle et le méthylmalonyle.

I. Structures des OPG

Les structures des OPG ont été décrites chez de nombreuses espèces de protéobactérie des subdivisions alpha, bêta et gamma. Les OPG ont été classés en quatre familles sur la base de l'organisation de leur squelette (Figure 7).

1. Famille I

Les OPG de la famille I sont retrouvés chez *E. coli* (Kennedy, 1996), *Pseudomonas syringae* (Talaga et coll., 1994), *D. dadantii* (Cogez et coll., 2001), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (F. Norel, V. Robbe-Saule, A. Bohin et J.-P. Bohin, résultats non publiés) et *P. aeruginosa* (Y. Lequette et coll., 2007). Les structures retrouvées chez ces bactéries sont très similaires. Chez *E. coli*, les OPG sont hétérogènes au niveau de leur taille. Celle-ci varie de 5 à 12 résidus de glucose et les espèces principales sont celles contenant 8 ou 9 résidus de glucose. Le squelette glucosidique, constitué d'unités de glucose liées par des liaisons β 1,2, est ramifié par des glucoses liés en β 1,6. L'hétérogénéité des OPG est amplifiée

par l'ajout de différents substituants. En effet, les OPG d'*E.coli* sont substitués par du phosphoglycérol, du succinyle et de la phosphoéthanolamine (Kennedy, 1996). Ceux de *D. dadantii* sont plus faiblement substitués et uniquement par du succinate et de l'acétate (Cogez et coll., 2001). En revanche, les OPG de *P. syringae* ne sont pas substitués (Talaga et coll. 1994).

2. Famille II

Les OPG de la famille II sont retrouvés chez différents membres de la famille des *Rhizobiaceae* comme *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Brucella* ou *Mesorhizobium* (Briones et coll. 1997 et Chomaa et Komaniécka 2003). Le squelette de cette famille d'OPG composé de glucose lié en β 1,2 est cyclique (Breedveld et miller 1994). Leur taille varie de 17 à 25 résidus. De même la substitution est variable et représenté par du phosphoglycérol du succinyle et du méthylmalonyle.

3. Famille III

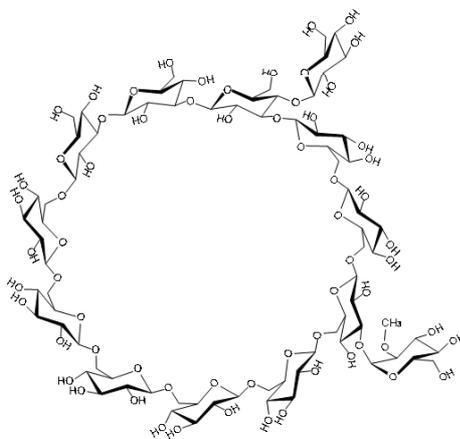
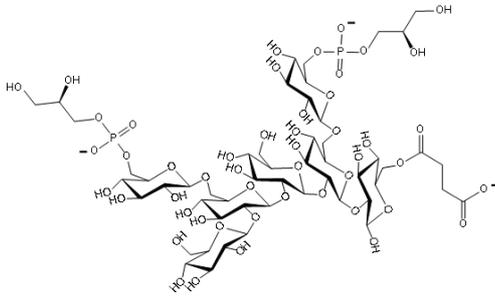
La structure décrite dans la figure 7 est celle des OPG de *Azospirillum brasilense*. Ceux sont des glucanes cycliques contenant 11 unités de glucose liées par des liaisons β 1,3, β 1,6 et un résidu de glucose branché en β 1,4. Ils peuvent porter un glucose supplémentaire lié en α 1,3 qui peut être substitué par un groupement 2-O-méthyle. Les OPG de la famille III diffèrent de ceux de la famille II par la nature des liaisons glucosidiques mais également par un contrôle stricte de la taille de l'anneau. Bien que les OPG de cette famille soient principalement non chargés, les OPG de *Bradyrhizobium japonicum* peuvent être substitués par de la phosphocholine (Rolin et coll. 1992).

4. Famille IV

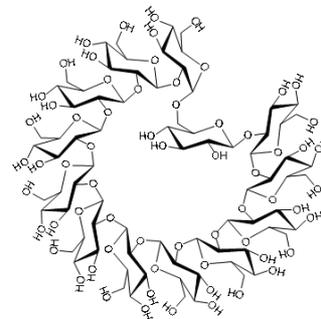
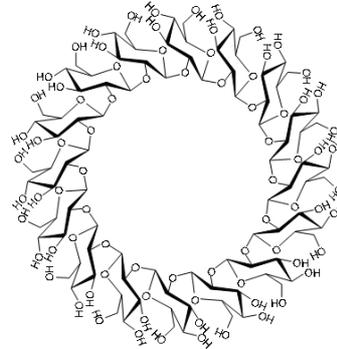
Les OPG de la famille IV sont retrouvés chez *Ralstonia solanacearum* (Talaga et coll. 1996), *Xanthomonas campestris* (Talaga et coll. 1996 ; York 1995) et chez *Rhodobacter sphaeroides* (Talaga et coll. 2002). Ces OPG sont cycliques et possèdent un degré de polymérisation unique (respectivement 13, 16 et 18). Les unités de glucose sont liés par des liaisons β 1,2 à l'exception d'une liaison en α 1,6. Les OPG de *R. solanacearum* et de *X. campestris* ne sont pas substitués. Alors que ceux de *R. sphaeroides* peuvent être substitués par des résidus de succinyle et d'acétyle.

Famille I

E. coli
D. dadantii
P. aeruginosa
 etc.

**Famille II**

S. meliloti
A. tumefaciens
B. abortus

**Famille III**

B. japonicum
A. caulinodans
A. brasilense

Famille IV

R. sphaeroides
X. campestris
R. solanacearum

Figure 7 : Représentation des quatre familles d'OPG (de I à IV) (Bohin, 2000).

II. La biosynthèse des OPG chez *E. coli* et *D. dadantii*

Les OPG synthétisés par *E. coli* et *D. dadantii* appartiennent à la famille structurale I. Chez ces deux espèces bactériennes, les gènes *opgG* et *opgH* sont organisés en opéron et une mutation nulle dans l'un de ces deux gènes abolit complètement la synthèse des OPG. De plus, l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* introduit chez *E. coli* est capable de compléter les mutations de l'opéron *opgGH* endogène (Page et coll. 2001). Il semble donc que la synthèse des OPG soit semblable dans ces deux modèles bactériens. L'étude du modèle de biosynthèse des OPG de la famille I (Figure 8) a été effectuée chez *E. coli*. Deux protéines sont nécessaires et suffisantes à la synthèse du squelette glucosidique des OPG.

-OpgH est une protéine de 97kDa possédant 8 segments transmembranaires et 3 grandes régions cytoplasmiques (Debarbieux et coll. 1997). Il a été postulé que ces 8 segments transmembranaires formeraient un tunnel permettant la translocation des OPG naissants vers le périplasma. *In vitro*, la protéine OpgH produit des chaînes linéaires de glucoses liés en β 1,2 à partir d'UDP-glucose. Cependant pour des raisons encore inconnues, cette activité nécessite la présence de l'ACP (Acyl Carrier Protein) connue pour être impliquée dans la synthèse des acides gras (Thérisod et coll. 1986).

-OpgG est une protéine périplasmique de 56kDa dont la fonction exacte n'a pas encore été établie. Nous avons vu qu'*in vitro* la protéine OpgH associée à l'ACP était capable de produire des chaînes linéaires de glucose. Cependant, *in vivo*, l'absence de la protéine OpgG abolit la synthèse à la fois du précurseur et d'OPG matures (Lacroix et coll. 1991). Il semblerait que la protéine OpgG interagisse avec OpgH permettant ainsi la translocation des molécules d'OPG naissantes. De plus, OpgG catalyserait l'addition de branches de glucose liées en β 1,6.

Chez *E. coli*, une troisième protéine est présente et influence la synthèse des squelettes glucosidiques. Cette protéine, OpgD est absente chez *D. dadantii*. OpgD est le produit du gène *opgD* qui est un paralogue du gène *opgG* (Lequette et coll. 2004). L'inactivation du gène *opgD* ne modifie pas la quantité d'OPG synthétisés mais altère la structure de leur squelette. En effet en absence d'OpgD les souches d'*E. coli* produisent des OPG possédant un degré de polymérisation plus élevé. La protéine OpgD semble être impliquée dans le contrôle de la machinerie de biosynthèse des OPG. D'autres protéines peuvent être présentes au niveau de la machinerie de biosynthèse des OPG. Celles-ci ont pour rôle la substitution des OPG. On retrouve ainsi chez *E. coli* :

-le gène *opgC* codant une protéine membranaire qui catalyse le transfert de résidus succinate sur les chaînes d'OPG (Lacroix et coll. 1999).

-le gène *opgB* codant les protéines OpgB membranaire et OpgB' périplasmique résultant du clivage et de la libération de la partie périplasmique de la protéine OpgB (Lequette et coll. 2008). OpgB catalyse le transfert de phosphoglycérol à partir de phosphatidylglycérol sur les chaînes naissantes d'OPG. OpgB' transfère le phosphoglycérol d'une molécule d'OPG à une autre.

-le gène *opgE* a récemment été identifié par Virginie Cogez au sein de notre laboratoire. OpgE catalyse la substitution des OPG par la phosphoéthanolamine à partir de phosphatidyléthanolamine.

Chez *D. dadantii* l'opéron *opgGH* est présent. Et même si les OPG de *D. dadantii* peuvent être substitués par de l'acétyle et du succinyle, aucun gène codant ces activités n'a été identifié. De plus on ne retrouve pas d'homologue du gène *opgC* d'*E. coli* dans le génome de *D. dadantii*.

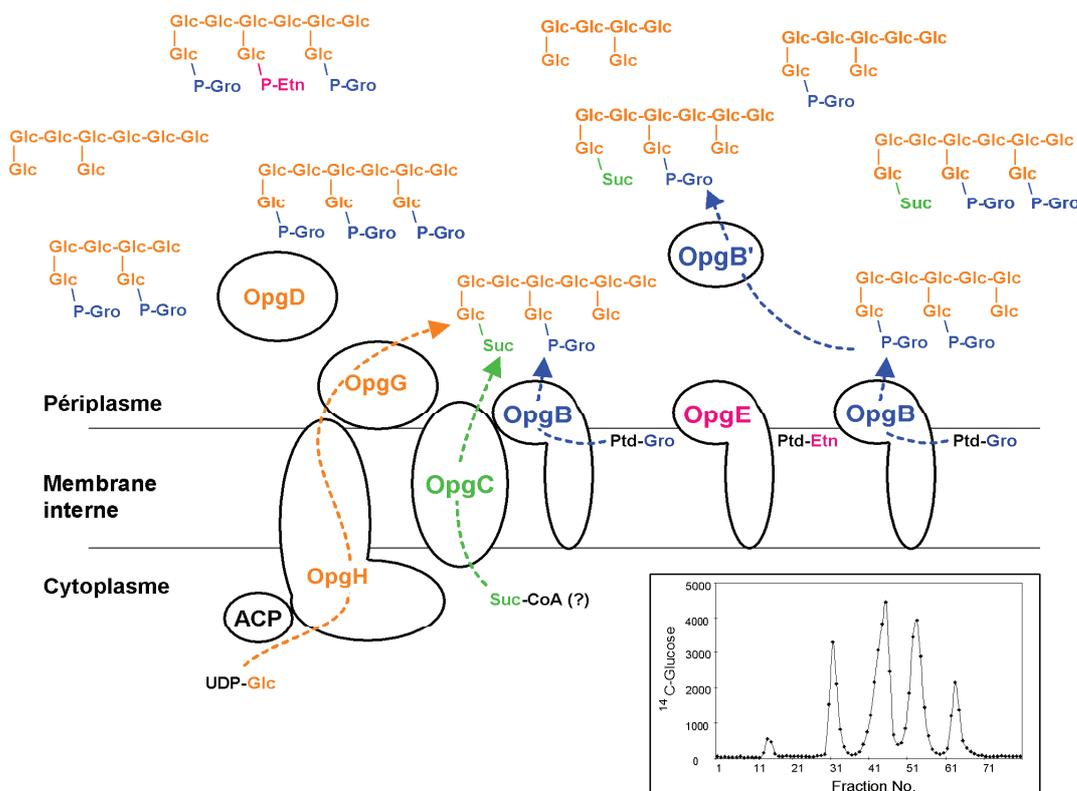


Figure 8 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *E. coli* (Bohin et Lacroix, 2007)

III. Régulation de la biosynthèse des OPG

La synthèse des OPG est régulée par l'osmolarité chez un large éventail de protéobactéries (Bohin 2000). En général la quantité d'OPG augmente lorsque l'osmolarité du milieu diminue (Figure 9). Ainsi pour une souche d'*E. coli* cultivée dans un milieu de faible osmolarité, la quantité d'OPG représente 5% du poids sec de la cellule, alors que la quantité d'OPG diminue jusque 0,5% du poids sec de la cellule lorsque les bactéries sont cultivées en milieu de haute osmolarité. Cette régulation osmotique s'effectue selon les espèces au niveau transcriptionnel

et/ou au niveau post-transcriptionnel. Ainsi chez *E. coli*, la transcription de l'opéron est osmorégulée (Lacroix et coll. 1991) et l'activité enzymatique est également influencée par l'osmolarité (Lacroix 1989 ; Kennedy 1996). De plus indépendamment de l'osmolarité, on observe un contrôle négatif exercé par le produit final (Bohin et Lacroix 2007). Enfin chez *E. coli*, l'opéron *opgGH* est activé par le facteur σ^E qui répond à un stress causé par la présence de protéines mal conformées au sein de l'enveloppe bactérienne (Dartigalongue et coll. 2001). Des études récentes au sein de notre laboratoire n'ont pas permis de confirmer chez *D. dadantii* l'appartenance de l'opéron *opgGH* au régulon σ^E (Lepleux 2009).

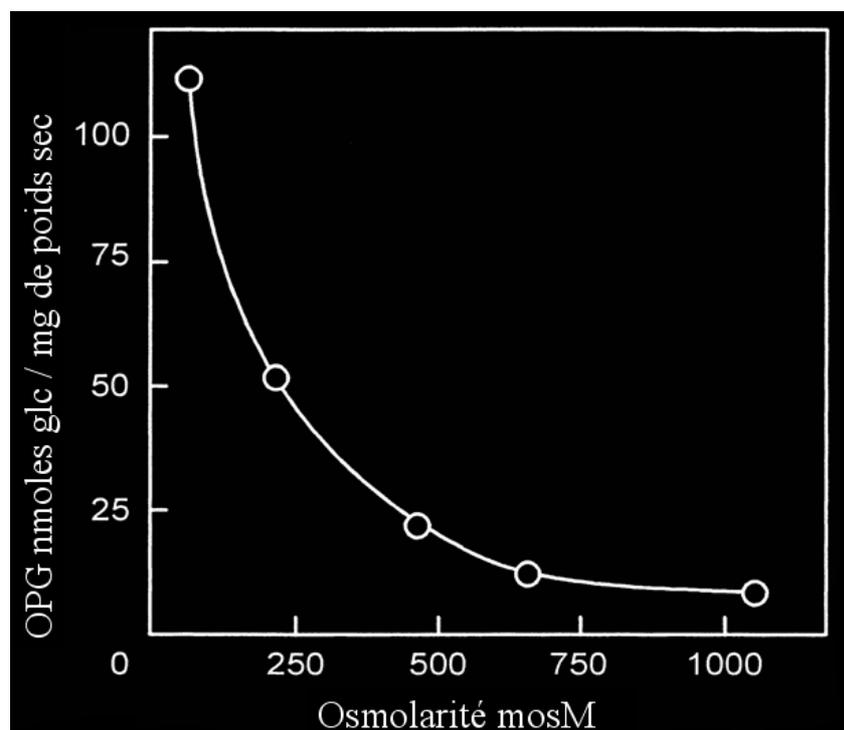


Figure 9 : Régulation osmotique de la synthèse des OPG chez *E. coli* (Lacroix 1989)

IV. Rôle des OPG

Les premiers mutants affectés dans la synthèse des OPG ont été obtenus lors de cribles visant à rechercher des mutants affectés dans la virulence ou complètement non virulents. Ceci montre bien l'importance des OPG durant la pathogénèse. Ainsi des mutants ne produisant pas d'OPG chez *P. syringae* pv. *syringae* présentent une virulence fortement atténuée vis à vis de la plante hôte. De plus ces mutants ne déclenchent pas la réponse hypersensible sur des plantes non hôtes (Loubens et coll. 1993 ; Bohin et Lacroix 2007). Un mutant dépourvu d'OPG chez *P. aeruginosa* PA14 présente une forte réduction de la virulence vis à vis d'*Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* et *Caenorhabditis elegans*

(Mahajan-Miklos et coll. 1999). Récemment il a été montré qu'un mutant de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium dépourvu d'OPG présentait une augmentation de 2 log dans la DL₅₀ nécessaire à infecter la souris (Bhagwat et coll. 2009). Chez notre modèle d'étude *D. dadantii*, un mutant *opgG* ou *opgH* ne produisant pas d'OPG présente un phénotype pléiotrope incluant :

- Une diminution de la motilité.
- Une augmentation de la production d'exopolysaccharides se traduisant par un aspect muqueux des colonies.
- Une diminution de la résistance aux sels biliaires.
- Une forte réduction de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes (protéases, cellulases et pectinases).
- La perte totale de la virulence sur tubercule de pomme de terre et feuille d'endive.

La diminution de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes n'explique pas à elle seule la perte de virulence. En effet la coinoculation d'une souche sauvage avec un mutant *opgG* ne permet pas de restaurer à la souche *opgG* la capacité à croître dans la plante (Page et coll. 2001). Ces phénotypes indiquent une modification de la composition de l'enveloppe bactérienne. Ceci a été confirmé par l'analyse du protéome soluble d'un mutant *opgG* (Bouchart et coll. 2007). Cette étude a de surcroît montré un changement profond dans la physiologie bactérienne dû à cette absence d'OPG : métabolisme général perturbé, induction d'une réponse au stress. Il semble donc que le phénotype avirulent d'une souche *opgG* s'explique non seulement par une modification des propriétés de l'enveloppe bactérienne mais également par une modification de la perception de son environnement par la bactérie. Ainsi la bactérie n'est plus capable de reconnaître la plante hôte et de déclencher la virulence.

Chez les bactéries, la perception de l'environnement est assurée majoritairement par un groupe de protéines appelées système à deux composants, ou encore phosphorelais, décrits dans le chapitre suivant (cf. chapitre D. Les systèmes à deux composants). Les premiers indices permettant de relier les OPG à de tels systèmes ont été découverts chez *E. coli*. Ainsi, il a été proposé que les OPG d'*E. coli* pourraient être un signal perçu par deux capteurs membranaires de systèmes à deux composants : EnvZ (Fiedler et Rotering 1988) et RcsC (Ebel et coll. 1997). Au sein de notre laboratoire, nous avons pu mettre en évidence une relation entre le système RcsCD-RcsB et les OPG chez *D. dadantii*. Lors d'un crible visant à rechercher la restauration de la motilité chez un mutant *opgG*, suite à une mutagenèse à la nitrosoguanidine, Franck Bouchart a isolé une mutation suppressive du phénotype Opg⁻. En

effet cette mutation permet dans un contexte *opgG* de restaurer la motilité et la sécrétion des exoenzymes. De plus la souche n'est plus muqueuse et elle est virulente sur tubercule de pomme de terre. Cependant, ni la virulence sur feuille d'endive ni la résistance aux sels biliaires ne sont restaurées. La mutation a été localisée, elle se situe au niveau du gène *rcsC*. L'allèle muté a été nommé *rcsC2*.

Même si le rôle exact des OPG reste à définir, l'ensemble des données suggère que les OPG participent à la perception de l'environnement par la bactérie en influençant l'activité de systèmes à deux composants.

D. Les systèmes à deux composants

Dans leurs milieux naturels, les bactéries sont souvent confrontées à de nombreuses variations environnementales. La survie des bactéries requiert la capacité à sentir ces variations (stimuli) et à y répondre rapidement. Au niveau physiologique, la réponse de la bactérie face à ces stimuli est souvent une modification de l'expression de différents gènes. Les systèmes à deux composants appelés également systèmes capteur-régulateur ou encore systèmes phosphorelais remplissent ces fonctions. Chez *D. dadantii*, 32 de ces systèmes ont été annotés (Bohin JP, communication personnelle).

I. Structure

Il existe différents niveaux de complexité selon les systèmes mais le principe général est le suivant : Un capteur perçoit un signal le plus souvent au niveau d'un domaine périplasmique. Ce capteur, une histidine kinase (HK), est le plus souvent membranaire et fonctionne en homodimère. Le stimulus déclenche la transphosphorylation des HK au niveau d'une histidine conservée. Le groupement phosphate est ensuite transféré au niveau d'un résidu aspartate d'un régulateur (RR) qui le plus souvent va agir au niveau transcriptionnel en activant ou réprimant la transcription de gènes cibles (Figure 10). Bien souvent la nature exacte du signal est inconnue. Dans la majorité des cas, le capteur possède également une activité phosphatase permettant de la déphosphorylation du régulateur en absence de signal. La transmission du groupement phosphate est généralement directe (Figure 10a) c'est le cas du système EnvZ-OmpR. Cependant certains systèmes impliquent un phosphotransfert multiple ($\text{His1} \rightarrow \text{Asp1} \rightarrow \text{His2} \rightarrow \text{Asp2}$), on parle alors de phosphorelais (Figure 10b). Ces

systèmes impliquent la présence de domaines et/ou d'une protéine supplémentaire. Le système RcsCD-RcsB servira d'exemple.

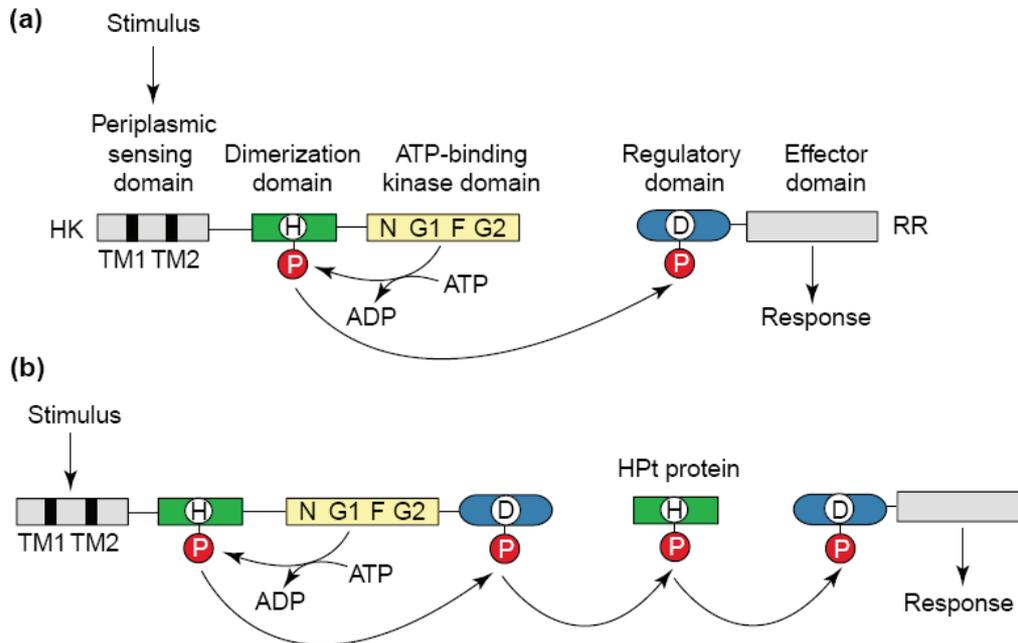


Figure 10 : Schéma représentant deux types de système à deux composants. (a) Le système à deux composants classique comprenant un capteur (histidine kinase) et un régulateur. (b) Le système dit phosphorelais comprenant un capteur hybride (une histidine kinase possédant des domaines supplémentaires impliqués dans le relais de l'information) et un régulateur. Selon les phosphorelais le domaine HPt peut se trouver sur une protéine supplémentaire.

II. Le système EnvZ-OmpR

Chez *E. coli*, on retrouve deux porines majeures (OmpC et OmpF) permettant le passage de molécules hydrophiles à travers la membrane externe. La différence majeure entre ces porines est la diamètre de leurs pores (OmpF=1,2nm et OmpC=1,1nm). Il en résulte un débit plus rapide de diffusion à travers OmpF par rapport à OmpC. Le système à deux composants EnvZ-OmpR contrôle la transcription des gènes *ompC* et *ompF* en réponse à l'osmolarité. EnvZ est le capteur (HK), il possède également une activité phosphatase. OmpR est le régulateur (RR) et agit au niveau transcriptionnel (Figure 11).

A faible osmolarité, EnvZ est peu phosphorylé. Par conséquent il y a peu de OmpR phosphorylé (OmpR-P). Les OmpR-P se fixent aux sites de forte affinité du promoteur de *ompF* et activent sa transcription. Dans l'eau douce, la porine majoritaire est OmpF, elle permet une diffusion élevée à travers la membrane externe afin d'importer les nutriments qui sont présents en quantité limitée.

A haute osmolarité, la phosphorylation de EnvZ augmente et donc la phosphorylation de OmpR augmente. Dans ce cas OmpR-P se fixe aux sites de haute affinité mais également aux sites de faible affinité des promoteurs de *ompF* et de *ompC*. Il en résulte une activation de la transcription de *ompC* et une répression de la transcription de *ompF* due à la formation d'une boucle au niveau de son promoteur. Dans l'intestin, les nutriments sont présents en quantité élevée mais il y a également beaucoup de molécules toxiques. *E. coli* diminue donc sa perméabilité aux composés hydrophiles en augmentant la quantité de OmpC et en diminuant la quantité de OmpF.

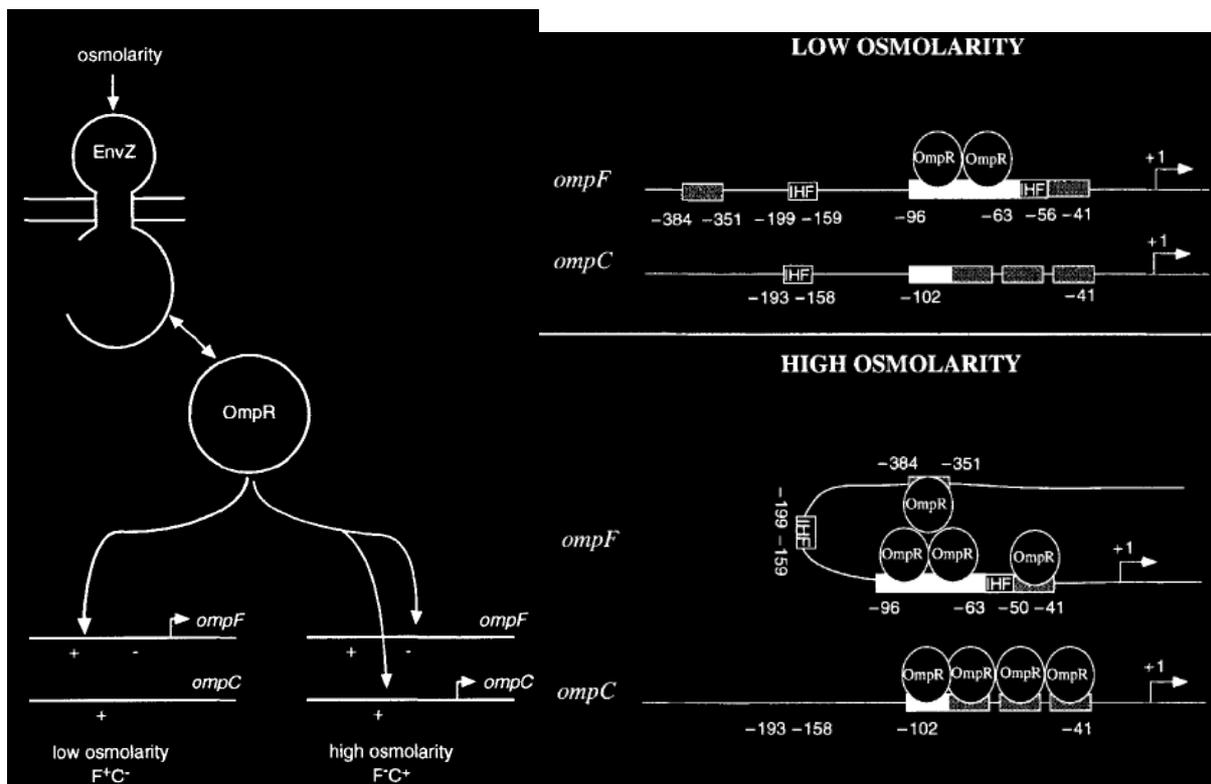


Figure 11 : Régulation de *ompF* et *ompC* par le système à deux composants EnvZ-OmpR (d'après Pratt et coll. 1996)

III. Le système RcsCD-RcsB

Initialement découvert chez *E. coli* comme régulateur de la synthèse des exopolysaccharides (Gottesman et coll. 1985), ce système est retrouvé uniquement chez les entérobactéries. Il est composé de trois protéines qui forment un phosphorelais : RcsC, RcsD et RcsB. Les gènes codant ces protéines sont organisés de la même manière chez la plupart des entérobactéries : *rcsDB-rscC* (Figure 12a).

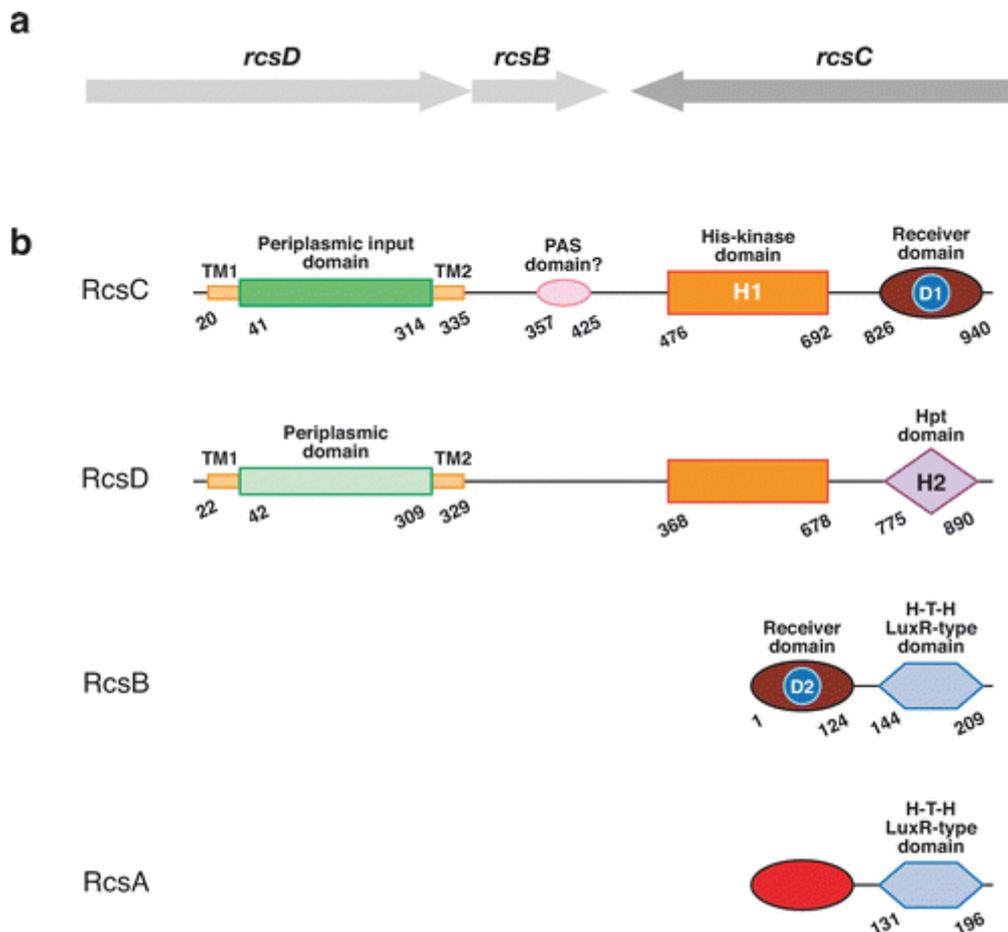


Figure 12 : Le phosphorelais RcsCD-RcsB chez *E. coli* (Madjalani et Gottesman 2005) (a) Organisation génétique du locus *rcsDB-rcsC*. (b) Organisation des domaines des protéines du système RcsCD-RcsB et de RcsA

1. Les protéines du phosphorelais Rcs

-RcsC (Figure 12b) est une histidine kinase hybride de la membrane interne. Elle possède entre ses deux segments transmembranaires un large domaine périplasmique par lequel le signal serait perçu. Le reste de cette protéine est cytoplasmique et comprend un domaine histidine kinase (un domaine de dimérisation comprenant l'histidine phosphorylable H1 et un domaine de fixation de l'ATP) et un domaine receveur comprenant l'aspartate phosphorylable D1. RcsC posséderait également un domaine PAS. La mutation suppressive du phénotype Opg^- isolée au sein du laboratoire (*rcsC2*) consiste au changement d'une cytosine en thymine au niveau du gène *rcsC*. Ce changement a pour conséquence le remplacement de l'alanine 463 par une valine entre le domaine PAS putatif et le domaine histidine kinase de la protéine RcsC (figure 13)

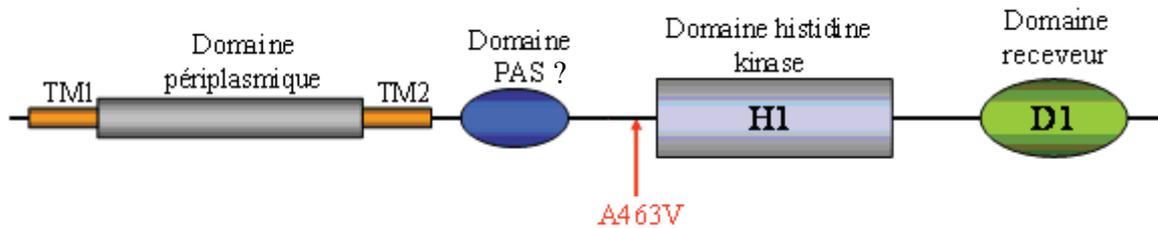


Figure 13 : Schéma représentant les domaines de la protéine RcsC et la localisation de la mutation rcsC2

-RcsD (Figure 12b) est également une protéine de la membrane interne possédant un large domaine périplasmique qui pourrait participer à la perception du signal. Chez *E. coli* il ne semble pas y avoir de domaine histidine kinase car l'histidine phosphorylable est absente, cependant chez *D. dadantii* cette histidine est présente. RcsD possède également un domaine Hpt (His-containing phosphotransfert) comprenant l'histidine phosphorylable H2.

-RcsB (Figure 12b) est le régulateur du système. Cette protéine cytoplasmique possède un domaine receveur contenant l'aspartate phosphorylable D2 et un domaine effecteur capable de se fixer à l'ADN.

Chez *E. coli*, il existe une protéine supplémentaire RcsA (Figure 12b). Celle-ci n'intervient pas dans le phosphorelais. Elle s'associe à RcsB pour la régulation de certains gènes. Cependant cette protéine est absente chez *D. dadantii*.

2. Signalisation du système RcsCD-RcsB

a. La cascade de phosphorylation

Le capteur formé de RcsC et RcsD perçoit un signal au niveau de sa partie périplasmique. Il en résulte une phosphorylation de l'histidine conservée (H1) du domaine histidine kinase de RcsC. Le phosphate est ensuite transféré sur l'aspartate (D1) du domaine receveur de RcsC. Le relais continue avec un transfert de ce phosphate sur l'histidine (H2) du domaine Hpt de RcsD. Enfin le phosphate aboutit sur l'aspartate (D2) du domaine receveur de RcsB. Le niveau de phosphorylation de RcsB module son activité. Grâce à son domaine de fixation à l'ADN, il active ou réprime la transcription des gènes cibles (Figure 14).

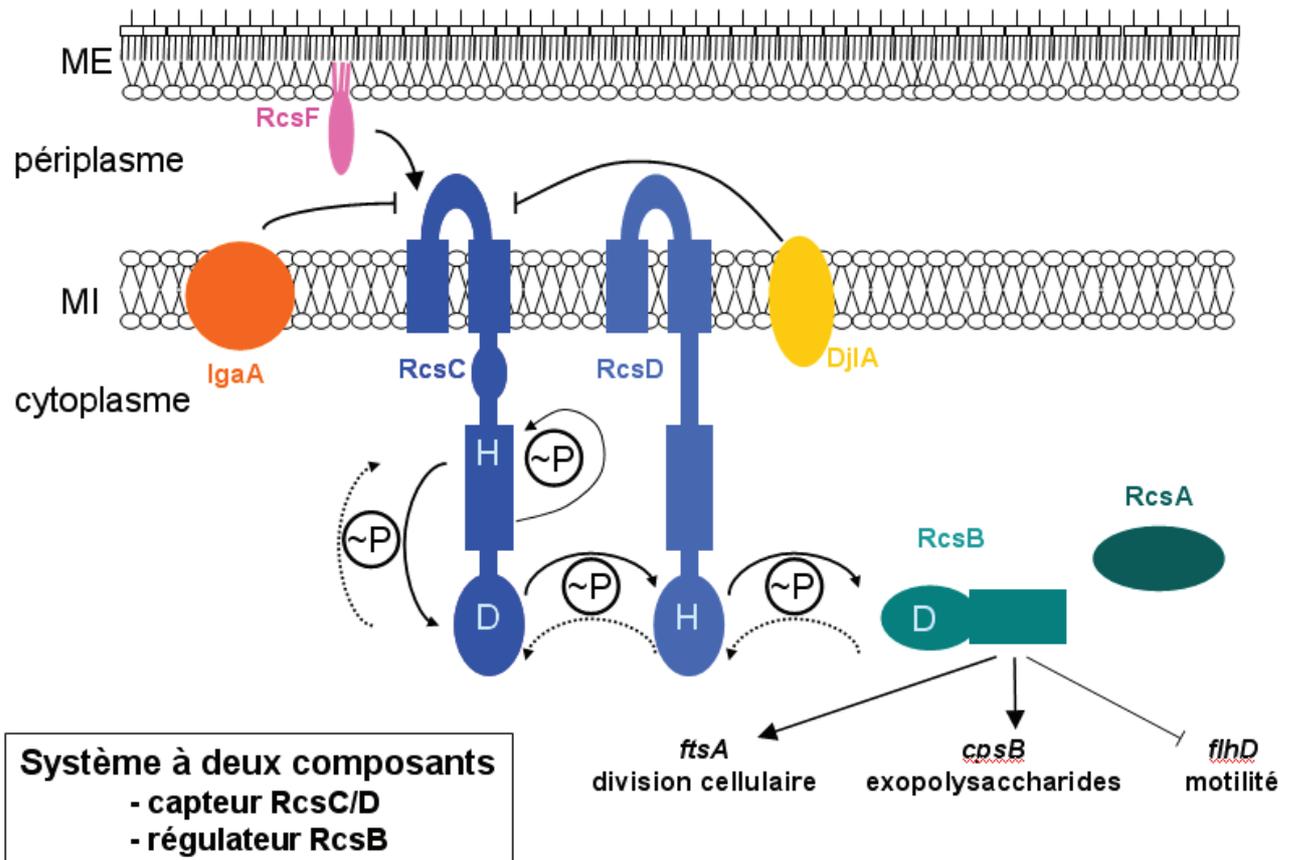


Figure 14 : Schéma représentant le système RcsCD-RcsB et les protéines associées.

b. Les cibles du système RcsCD-RcsB

Le système RcsCD-RcsB est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que :

-La synthèse des exopolysaccharides. Comme cité précédemment il a été découvert chez *E. coli* comme activateur des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides (Gottesman et coll. 1985). Chez *Erwinia amylovora*, le système RcsCD-RcsB est impliqué dans la régulation de la synthèse des amylovoranes (Zhao et coll. 2009).

-La division cellulaire. La fixation de RcsB au niveau du promoteur de l'opéron *ftsAZ* active sa transcription chez *E. coli* (Carballes et coll. 1999)

-La motilité. Chez *E. coli* l'activation du système RcsCD-RcsB réprime l'expression de l'opéron *flhDC*, opéron maître de la biosynthèse du flagelle (Francez-Charlot et coll. 2003).

-La virulence. Chez de nombreuses espèces bactériennes, le système RcsCD-RcsB influence la virulence. En effet l'activation de ce système diminue fortement la virulence de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium chez la souris (Mousslim et coll. 2004). Chez

Erwina amylovora l'inactivation du système RcsCD-RcsB conduit à une abolition de sa virulence (Zhao et coll. 2009).

-D'autres fonctions sont régulés par le système RcsCD-RcsB. Des études sur le régulon Rcs chez les *Yersinia* (Hinchliffe et coll. 2008) et chez *E. coli* (Ferrières et Clarke 2003) ont montré qu'un nombre important de gènes voient leur expression influencée par ce système. Parmi ces gènes, plus de la moitié codent des protéines localisées dans l'enveloppe ou impliquées dans sa modification.

c. Les protéines influençant l'activité du système RcsCD-RcsB

La complexité du phosphorelais RcsCD-RcsB est amplifiée par le fait que des protéines peuvent interagir avec lui pour l'activer ou le réprimer (Figure 14).

-RcsF est une lipoprotéine de la membrane externe orientée vers le périplasme qui semble interagir avec RcsC. Il a été montré que pour de nombreux signaux la protéine RcsF est nécessaire à l'activation du système RcsCD-RcsB (Majdalani et coll. 2005). De plus la surexpression de *rscF* induit l'expression de gènes *cps* par l'intermédiaire du système RcsCD-RcsB.

-IgaA est une protéine de la membrane interne dont la fonction semble être d'empêcher une trop forte activation du système RcsCD-RcsB. En effet chez *S. enterica* une mutation ponctuelle du gène *igaA* induit un phénotype pléiotrope dépendant du système RcsCD-RcsB. De plus il a été montré qu'une souche de *S. enterica* peut porter une mutation nulle du gène *igaA* si le système RcsCD-RcsB est absent (mutation nulle de *rscC*, *rscD* ou *rscB*, Cano et coll. 2002) ou si l'expression de *rscC* ou *rscD* est faible (Mariscotti et Garcia-del Portillo 2008). Il semble qu'IgaA favorise la forme non phosphorylée de RcsB dans le ratio RcsB-P/RcsB (Mariscotti et Garcia-del Portillo 2009).

-DjlA est une protéine chaperon de la membrane interne possédant un domaine transmembranaire et une large partie cytoplasmique. La surexpression de cette protéine provoque l'activation du système RcsCD-RcsB. Ceci nécessite également la présence des protéines DnaK et GrpE (Toutain et coll. 2003). Cependant la délétion du gène *djlA* entraîne une augmentation du niveau basal d'expression de *cpsB* et dans des conditions où le système RcsCD-RcsB est activé cette délétion amplifie l'expression de *cpsB*. De plus une faible surexpression de *djlA* diminue l'expression de *cpsB* (Shiba et coll. 2006). Dans les conditions physiologiques, DjlA semble donc plutôt être un régulateur négatif du système RcsCD-RcsB.

3. Induction du système RcsCD-RcsB

a. Conditions de croissance

Certaines conditions de croissance peuvent induire une réponse via l'activation du système RcsCD-RcsB :

- la dessiccation (Ophir et Gutnick 1994)
- un choc osmotique (Sledjeski et Gottesman 1996)
- une température faible (Hagiwara et coll. 2003)
- la présence de Zn^{2+} ou de Fe^{3+} (Hagiwara et coll. 2003 Mouslim et coll. 2003)
- le passage d'un milieu liquide à un milieu solide (Majdalani et Gottesman 2006)

b. Perturbations au niveau de l'enveloppe

De nombreuses études ont montré que des modifications des composants de l'enveloppe induisent le système RcsCD-RcsB :

- la surexpression de LolA (protéine périplasmique impliquée dans la translocation des lipoprotéines dans la membrane externe) (Chen et coll. 2001)
- la surexpression de OmpG (porine à large pore de la membrane externe) (Chen et coll. 2001)
- des mutations au niveau de l'opéron *tol* participant à l'intégrité de l'enveloppe (Mouslim et Groisman 2003).
- des mutations au niveau de l'opéron *rfa* impliqué dans la synthèse du LPS (Parker et coll. 1992)
- des mutations au niveau de l'opéron *opgGH* impliqué dans la synthèse des OPG (Ebel et coll. 1997)

IV. La perception par les systèmes à deux composants

Il existe des capteurs percevant les variations au niveau de leurs domaines transmembranaires ou au niveau de domaines cytoplasmiques. Cependant la majorité des capteurs perçoivent les signaux au niveau de leur domaine périplasmique. (Mascher et coll. 2006). Certains capteurs possèdent un domaine PAS périplasmique pour lequel des ligands ont été identifiés. Par exemple le capteur CitA possède un domaine PAS périplasmique permettant la fixation du citrate qui déclenche l'activation du système (Reinelt et coll. 2003). Le capteur PhoQ présente un domaine PAS périplasmique modifié permettant l'interaction

avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ou avec les peptides antimicrobiens (Cho et coll. 2006). Le capteur QseC d'*E. coli* est capable de fixer l'autoinducteur de type 3 et intervient dans la perception du quorum (Parker et Sperandio 2009). D'autres domaines conservés pouvant intervenir dans l'interaction avec les signaux ont été identifiés parmi les capteurs des systèmes à deux composants. Cependant la nature des molécules pouvant se fixer à ces domaines n'est pas encore déterminée.

De nombreuses études décrivent donc des stimuli déclenchant l'activation de système à deux composants mais la nature exacte du signal perçu au niveau du capteur est rarement déterminée.

Objectifs de travail

Objectifs de travail

Au sein de notre laboratoire nous étudions les OPG avec pour modèle d'étude *D. dadantii*. Dans notre recherche pour déterminer le rôle de ces OPG, les dernières observations nous ont conduits à mettre en relation les OPG et le système phosphorelais RcsCD-RcsB. Ainsi les OPG participeraient à la perception de l'environnement par la bactérie. Le but de cette étude est de préciser la relation entre les OPG et le système RcsCD-RcsB.

Tout d'abord nous avons achevé l'étude de l'impact de la mutation *rscC2* et de différents mutants du système RcsCD-RcsB.

Cette étude a montré que le niveau d'expression de la fusion *ftsA-uidA* augmentait en absence d'OPG sous l'action du système RcsCD-RcsB. Cette fusion reflète donc l'activation du système RcsCD-RcsB par les OPG. Nous avons mesuré l'activité β -glucuronidase de cette fusion en fonction de la concentration d'OPG synthétisés. Ceci nécessitait la construction d'une souche dans laquelle la quantité d'OPG peut être contrôlée.

L'absence d'OPG touche de nombreuses fonctions cellulaires. L'étude de l'expression des gènes *ftsA* et *flhD* en absence d'OPG a montré l'activation du système RcsCD-RcsB. Nous avons donc cherché de nouveaux gènes cible des OPG et déterminé l'implication éventuelle du système RcsCD-RcsB dans cette régulation par les OPG.

J'ai également initié la mutagenèse de gènes codant des régulateurs d'autres systèmes à deux composants. Le but étant à terme d'étudier l'implication de ces différents systèmes dans la régulation de gènes cible des OPG.

Résultats :

Partie A. Analyse des relations entre le système phosphorelais RcsCD-RcsB et les OPG

A. Analyse des relations entre le système phosphorelais RcsCD-RcsB et les OPG

(En collaboration avec A.F. Prouvost et E. Madec)

Le travail fondateur de Franck Bouchart avait permis l'isolement, la caractérisation et l'analyse du mutant suppresseur *rscC2 opgG*, mettant ainsi en lumière les relations entre OPG et le système Rcs chez *D. dadantii*. Les phénotypes observés chez la souche révertante *opgG rscC2* semblaient indiquer une baisse d'activation du système RcsCD-RcsB. Afin de confirmer ces résultats, nous avons construit par génétique inverse trois mutations nulles du système RcsCD-RcsB. En effet, si la conséquence de la mutation *rscC2* est la baisse d'activation de ce phosphorelais, alors des mutations nulles inactivant ce même système devraient conduire à des phénotypes similaires. Les mutations *rscC*, *rscB* ainsi qu'une délétion totale du locus *rscCBD* ont été construites *in vitro* par insertion d'une cassette portant un gène de résistance à un antibiotique. Ces mutations ont été introduites dans le génome de *D. dadantii* par recombinaison homologue puis transduites dans les contextes sauvage et *opgG* par transduction généralisée (voir matériel et méthodes D. Clonages moléculaires).

I. Impact des mutations sur la mucosité de *D. dadantii*

La surproduction d'exopolysaccharides par *D. dadantii* est visible par un phénotype muqueux des colonies sur boîte de milieu gélosé. Les colonies de la souche sauvage de *D. dadantii* EC3937 présentent un phénotype non muqueux sur boîte (Tableau 1). Les colonies d'une souche de *D. dadantii* ne produisant pas d'OPG présentent un phénotype muqueux (Page et coll. 2001). Les colonies des souches portant les doubles mutations *opgG rscC2*, *opgG rscC*, *opgG rscB* ou *opgG ΔrscCDB* restaurent toutes le phénotype non muqueux sur boîte. Le système RcsCD-RcsB est connu pour être un activateur des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides chez de nombreuses Entérobactéries (Ferrières et coll. 2007), il n'est donc pas surprenant que les colonies des souches portant les simples mutations *rscC2*, *rscC*, *rscB* ou *ΔrscCDB* présentent le même phénotype non muqueux sur boîte que la souche sauvage. La suppression du phénotype muqueux des souches *opgG* par des mutations du système RcsCD-RcsB suggère donc que l'absence d'OPG conduit à l'activation du système RcsCD-RcsB.

II. Impact des mutations sur la motilité de *D. dadantii*

La motilité est observée par la mesure du diamètre de halo de nage des souches de *D. dadantii* sur un milieu faiblement gélosé. Le mutant *opgG* présente une motilité réduite par rapport à la souche sauvage (Page et coll. 2001). La motilité des souches portant les doubles mutations *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB* est restaurée par rapport à la souche *opgG* (Tableau 1). On peut toute fois noter que les halos de nage des souches *opgG rcsB* et *opgG ΔrcsCDB* sont de taille intermédiaire entre ceux de la souche sauvage et de la souche *opgG*, pour ces deux souches la restauration de la motilité est donc partielle. La motilité des souches portant les simples mutations *rcsC2*, *rcsC*, *rcsB* ou *ΔrcsCDB* est semblable à celle de la souche sauvage. Chez *Salmonella enterica* l'activation du système RcsCD-RcsB conduit à une diminution de la motilité (Wang et coll. 2007), la restauration de la motilité des souches *opgG* par des mutations du système RcsCD-RcsB suggère donc que l'absence d'OPG conduit à l'activation du système RcsCD-RcsB.

III. Impact des mutations sur la production et la sécrétion d'exoenzymes

1. Les protéases

Le test protéase s'effectue sur un milieu gélosé contenant du lait. L'apparition d'un halo de dégradation autour du dépôt bactérien rend compte de la dégradation des protéines du lait par les protéases sécrétées. La souche sauvage de *D. dadantii* présente un halo de dégradation (Tableau 1). La souche *opgG* ne présente pas de halo de dégradation (Page et coll. 2001). Les souches portant les doubles mutations *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB* restaurent toutes le phénotype protéase. Les souches portant les simples mutations *rcsC2*, *rcsC*, *rcsB* ou *ΔrcsCDB* présentent le même phénotype protéase que la souche sauvage. Les mutations au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB ne modifient donc pas la capacité de *D. dadantii* à dégrader les protéines du lait. De plus ces mutations *rcs* permettent de restaurer l'activité protéase à une souche *opgG*.

2. Les cellulases

Le test cellulase s'effectue sur un milieu gélosé contenant de la carboxyméthylcellulose qui va être dégradée par les souches sécrétant des cellulases. Après révélation la mesure du diamètre de halo de dégradation rend compte de l'activité cellulase de la souche. La souche sauvage de *D. dadantii* présente un halo de dégradation (Tableau 1). L'activité cellulase de la

souche *opgG* est réduite par rapport à l'activité de la souche sauvage (Page et coll. 2001). Les souches portant les doubles mutations *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB* restaurent toutes l'activité cellulase. Les souches portant les simples mutations *rcsC2*, *rcsC*, *rcsB* ou *ΔrcsCDB* présentent le même niveau d'activité cellulase que la souche sauvage. Les mutations au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB ne modifient donc pas la capacité de *D. dadantii* à dégrader la cellulose. De plus ces mutations *rcs* permettent de restaurer l'activité cellulase à une souche *opgG*.

3. Les pectinases

Le test pectinase s'effectue sur un milieu gélosé contenant du polygalacturonate qui va être dégradé par les souches sécrétant des pectinases. Après révélation la mesure du diamètre de halo de dégradation rend compte de l'activité pectinase de la souche. La souche sauvage de *D. dadantii* présente un halo de dégradation (Tableau 1). La souche *opgG* présente un halo de dégradation de taille réduite par rapport à la souche sauvage (Page et coll. 2001). Les souches portant les doubles mutations *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB* restaurent toutes l'activité pectinase. Les souches portant les simples mutations *rcsC2*, *rcsC*, *rcsB* ou *ΔrcsCDB* présentent le même niveau d'activité pectinase que la souche sauvage. Les mutations au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB ne modifient donc pas la capacité de *D. dadantii* à dégrader le polygalacturonate. De plus ces mutations *rcs* permettent de restaurer l'activité cellulase à une souche *opgG*.

Tableau 1 : Phénotypes des différentes souches de *D. dadantii* mutées au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB et du gène *opgG* par rapport à la souche sauvage. Motilité : les données représentent les diamètres de nages observées en cm (+/-0,2cm). Activité pectinase : les données représentent les diamètres des halos de dégradation du substrat observées en cm (+/-0,2cm). Activité cellulase : les données représentent les diamètres des halos de dégradation du substrat observées en cm (+/-0,1cm). Activité protéase : +, présence d'un halo de dégradation ; -, pas de halo de dégradation. Mucosité : +, colonie muqueuse ; -, colonie non muqueuse.

Génotype	Motilité	Activité pectinase	Activité cellulase	Activité protéase	Mucosité
Sauvage (EC3937)	2.6	2.5	1.6	+	-
<i>opgG</i> (NFB3500)	1.1	1.6	1	-	+
<i>rscC2</i> (NFB3611)	2.6	2,7	1.8	+	-
<i>opgG rscC2</i> (NFB3591)	2.4	2.4	1.8	+	-
<i>rscC</i> (NFB3682)	2.9	2.3	1.4	+	-
<i>opgG rscC</i> (NFB3683)	2.8	2.3	1.8	+	-
Δ <i>rscCBD</i> (NFB3753)	2.8	2.5	1.7	+	-
Δ <i>rscCBD opgG</i> (NFB3754)	1.7	2.3	1.8	+	-
<i>rscB</i> (NFB7199)	2.7	2.7	1.7	+	-
<i>rscB opgG</i> (NFB7210)	1.6	2.3	1.5	+	-
<i>rscB rscC2</i> (NFB7200)	2.9	2.9	1.8	+	-
<i>rscB rscC2 opgG</i> (NFB7211)	2.1	2.2	1.6	+	-

IV. Impact des mutations sur la virulence de *D. dadantii*.

1. Virulence sur tubercule de pomme de terre

Le mutant *opgG* de *D. dadantii* est non virulent, il ne produit pas de macération au niveau du site d'infection (Page et coll. 2001). Les souches portant les doubles mutations *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB* restaurent toutes la virulence sur tubercule de pomme de terre (Figure 15). La virulence de ces doubles mutants est équivalente à la virulence d'une souche sauvage. La masse de tissu macéré par les souches de *D. dadantii* possédant une délétion du gène *rcsC*, *rcsB* ou du locus *rcsCBD* est comparable à la masse de tissu macéré par la souche sauvage. Dans un contexte sauvage, aucunes des mutations nulles créées au niveau des gènes codant les protéines du système Rcs n'affectent donc la virulence de *D. dadantii* sur tubercule de pomme de terre. En revanche, l'étude de la mutation *rcsC2* dans un contexte sauvage a montré que la souche portant cette mutation présentait une augmentation de la virulence sur tubercule de pomme de terre. En effet on observe que la masse de tissu macéré par la souche *rcsC2* est près de deux fois plus importante que la macération provoquée par la souche sauvage (Figure 15). La virulence du double mutant *rcsC2 rcsB* est environ deux fois plus faible que la virulence du mutant *rcsC2* et comparable à celle du mutant *rcsB*. Dans un contexte *rcsC2*, la mutation *rcsB* supprime donc l'augmentation de la virulence sur tubercule de pomme de terre. L'augmentation de la virulence de *D. dadantii* sur tubercule de pomme de terre due à la mutation *rcsC2* est donc bien dépendante de la présence de la protéine RcsB.

L'inactivation du système RcsCD-RcsB permet donc de restaurer la virulence sur tubercule de pomme de terre à une souche ne produisant pas d'OPG (*opgG*).

2. Virulence sur feuille d'endive

Le mutant *opgG* de *D. dadantii* est non virulent, il ne produit pas de macération au niveau du site d'infection (Page et coll. 2001). Les tests de virulence sur feuilles d'endives n'ont pas révélé de différences de virulence pour les simples mutants du système RcsCD-RcsB excepté pour le mutant *rcsC2* qui arbore une virulence légèrement plus importante que la souche sauvage. De plus contrairement aux tests effectués sur tubercule de pomme de terre, aucune restauration de la virulence sur feuille d'endive n'a été observée chez les doubles mutants *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB* ou *opgG ΔrcsCDB*. Ceci indique que les mutations dans le système RcsCD-RcsB ne suffisent pas à restaurer la totalité des phénotypes observés chez le mutant *opgG*

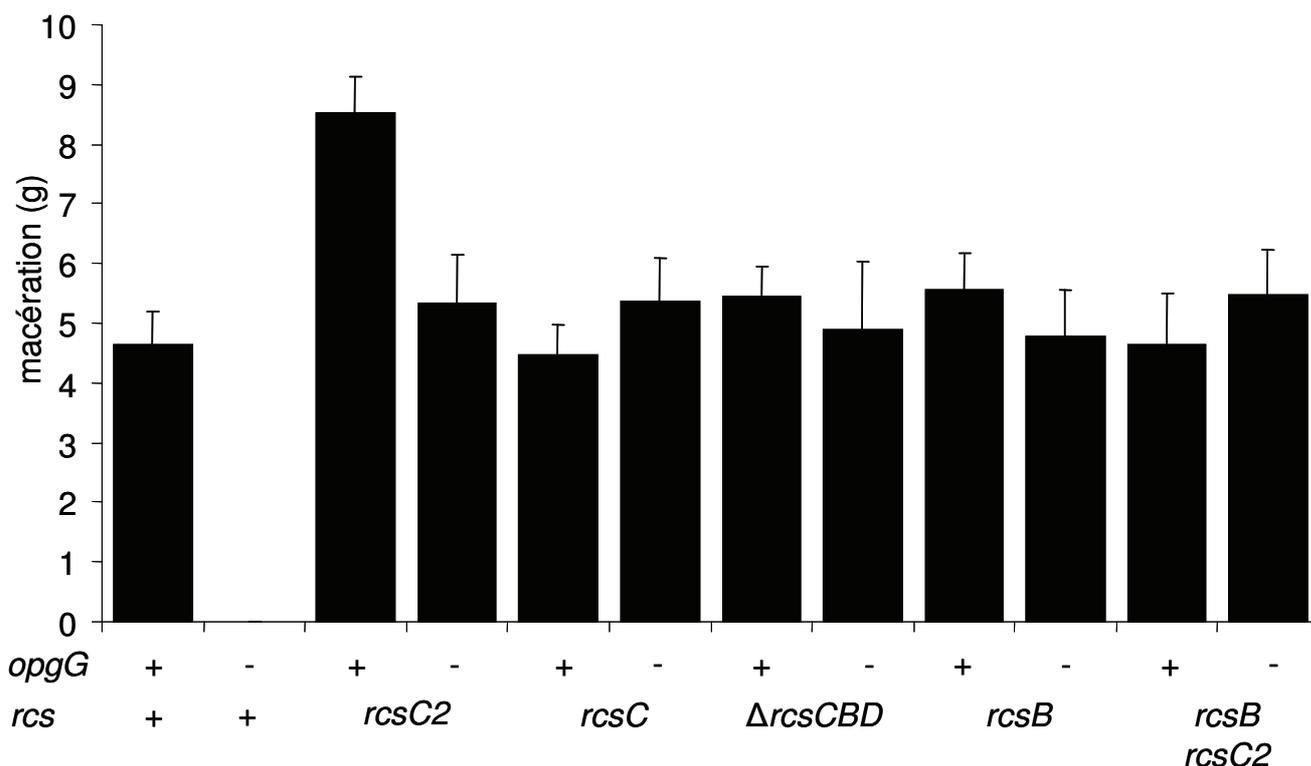


Figure 15 : Masse de tissus macérés suite à l'infection de tubercule de pomme de terre par différentes souches de *D. dadantii* mutées au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB et du gène *opgG* par rapport à la souche sauvage. Les bactéries (10^7) sont inoculées dans des trous effectués au niveau du tubercule de pomme de terre. Après 72H d'incubation à 30°C, le tissu macéré est récupéré et pesé. Les données sont exprimées en gramme.

V. Impact des mutations sur l'activité de deux gènes régulés par le système Rcs

L'étude des phénotypes des différentes souches construites suggère que l'absence d'OPG conduit à l'activation du système RcsCD-RcsB. Nous avons donc vérifié au niveau moléculaire si les OPG modifiaient l'expression de gènes appartenant au régulon Rcs en étudiant l'activité transcriptionnelle de deux unités de transcription répondant à l'activation du système RcsCD-RcsB. L'une est connue pour être réprimée par l'activation du système RcsCD-RcsB, l'opéron *flhDC* (Francez-Charlot et coll. 2003) et l'autre est connue pour être activée par l'activation de ce système, l'opéron *ftsAZ* (Carballes et coll. 1999).

Nous avons étudié l'activité de la fusion *ftsA-uidA* dans les différents contextes. L'absence d'OPG provoque une forte augmentation de l'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* par rapport à la souche sauvage (environ un facteur 13). L'opéron *ftsAZ* est donc fortement activé en absence d'OPG (Figure 18B). L'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* des souches portant les simples mutations *rscC*, *rscB* ou Δ *rscCDB* est très faible. Les différentes mutations nulles au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB provoquent donc une diminution de l'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* confirmant le rôle activateur du système RcsCD-RcsB sur l'opéron *ftsAZ* chez *D. dadantii*. La mutation *rscC2* entraîne également une diminution de l'activité β -glucuronidase de la fusion par rapport au contexte sauvage. Dans un contexte *opgG*, les différentes mutations nulles des gènes du système RcsCD-RcsB mènent à une diminution d'un facteur 13 à 14 de l'activité β -glucuronidase de la fusion par rapport à la souche *opgG*. Cette activité est comparable à un niveau sauvage pour le double mutant *rscC opgG* et elle est inférieure au niveau sauvage pour les doubles mutants *rscB opgG* et Δ *rscCDB opgG*. L'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* du double mutant *rscC2 opgG* est également très fortement diminuée par rapport à l'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* du mutant *opgG*. Celle-ci est inférieure à l'activité de la souche sauvage. L'inactivation du système RcsCD-RcsB ainsi que la mutation *rscC2* permettent donc de supprimer l'activation transcriptionnelle de l'opéron *ftsAZ* dans une souche *opgG*.

Tous ces résultats indiquent donc que l'absence d'OPG induit l'expression de l'opéron *ftsAZ* par l'intermédiaire de l'activation du système RcsCD-RcsB. De plus l'activité de la fusion dans les contextes *rscC2* et *opgG rsc2* indique que la mutation *rscC2* diminue l'activité du système RcsCD-RcsB. Ainsi toutes les mutations du système RcsCD-RcsB conduisent à la restauration de l'expression de l'opéron *ftsAZ* dans un contexte *opgG*.

VI. La mutation *rscC2* est co-dominante

La mutation *rscC2* a pour conséquence de baisser le niveau d'activation du système RcsCD-RcsB. Les deux hypothèses les plus simples sont que la mutation *rscC2* provoque une augmentation de l'activité phosphatase de la protéine RcsC ou entraîne une diminution de l'activité kinase de la protéine RcsC. Ces deux hypothèses peuvent être distinguées génétiquement par l'analyse phénotypique d'une souche mérodipléide portant l'allèle sauvage *rscC* et l'allèle muté *rscC2*. Dans le premier cas, la mutation *rscC2* sera dominante ou partiellement dominante par rapport à l'allèle sauvage. Dans le deuxième cas, la mutation

rscC2 sera récessive par rapport à l'allèle sauvage. Afin de distinguer ces deux hypothèses, une copie sauvage du locus *rscCBD* a été insérée dans la souche *rscC2 opgG* en utilisant un mini-transposon.

Ce mérodipléide présente une motilité proche de la souche *opgG rscC2*. Il ne présente pas de phénotype muqueux. Au niveau de la virulence, lorsque l'on inocule les tubercules de pomme de terre avec 10^7 bactéries, on observe une pourriture dans la moitié des cas (15 inoculations ont engendrées une pourriture molle contre 15 inoculations qui n'ont pas engendrées de pourriture). Lorsque l'on inocule les tubercules avec 10^8 bactéries, on observe une pourriture dans tous les cas (10 inoculations sur 10).

La complémentation de la mutation *rscC2* par le locus *rscCBD* dans la souche *opgG* n'engendre donc pas un retour au phénotype du mutant *opgG* (non motile, muqueux et perte totale de virulence avec une inoculation de 10^7 et 10^8 bactéries). De plus dans ce contexte la fusion *ftsA-uidA* arbore une activité β -glucuronidase proche du niveau d'activité dans la souche *opgG rscC2*. Cette activité intermédiaire entre la souche *opgG* et la souche sauvage confirme la co-dominance de l'allèle *rscC2* sur l'allèle sauvage (Figure 18B).

Tous ces résultats indiquent que la mutation *rscC2* est co-dominante avec l'allèle sauvage. La mutation *rscC2* semble avoir pour effet une augmentation de l'activité phosphatase de la protéine RcsC qui engendre une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine RcsB et donc une diminution de l'activité du système RcsCD-RcsB.

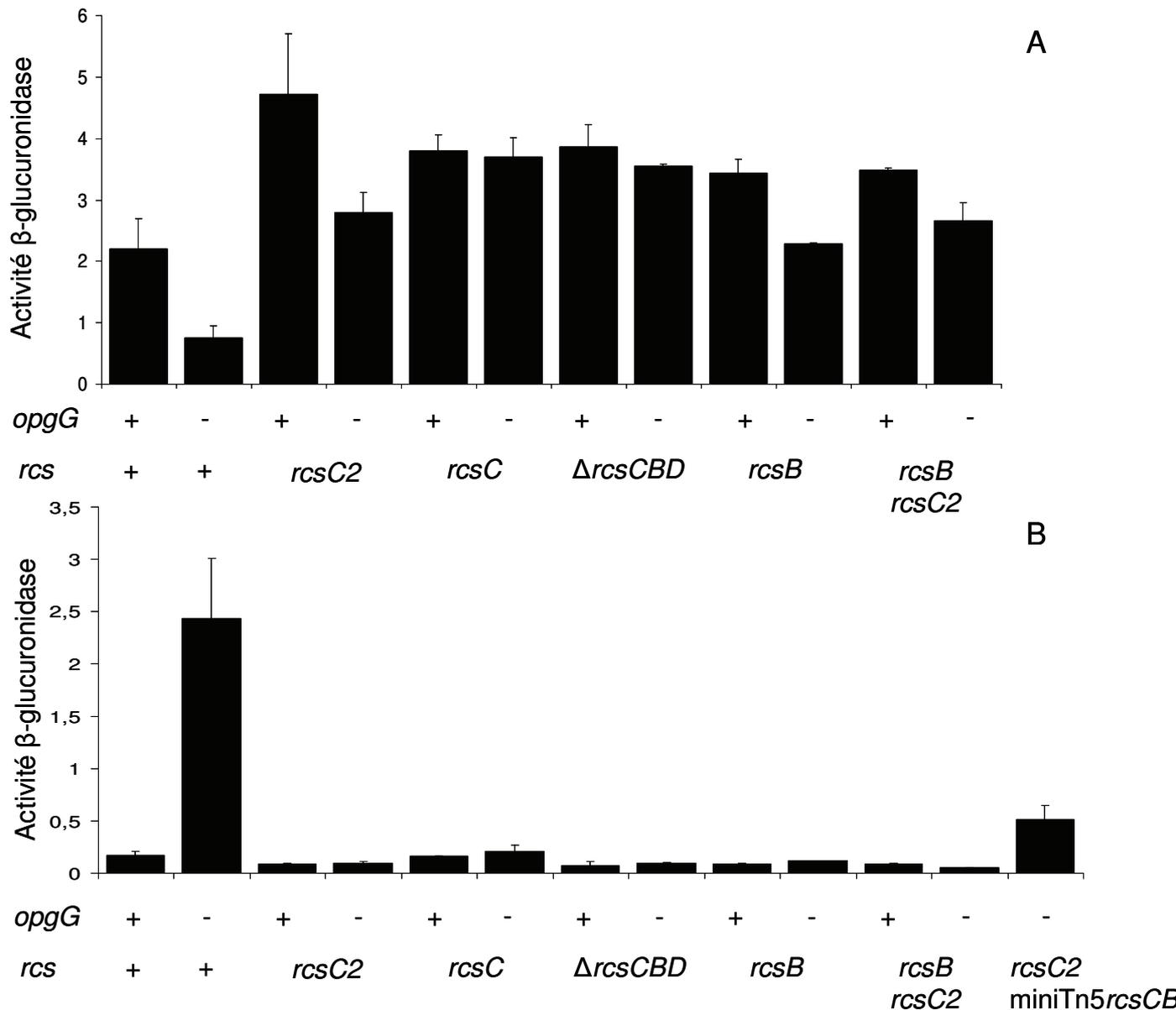


Figure 18 : Expression des fusions transcriptionnelles *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* dans différents contextes génétiques présentant des mutations au niveau des gènes du système RcsCD-RcsB et du gène *opgG* par rapport à la souche sauvage. Les souches de *D. dadantii* ont été cultivées en LB sans NaCl à 30°C, arrêtées en phase exponentielle de croissance (D.O. =0,7) puis cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. Les résultats sont exprimés en ΔDO_{410nm}/min/mg de protéines.

VII. Conclusion

L'absence de synthèse d'OPG chez *D. dadantii* conduit à un phénotype pléiotrope incluant une augmentation de la synthèse des exopolysaccharides, une perte de motilité, une diminution de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes et une perte totale de la virulence

sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. Les souches portant les mutations nulles des gènes *rscB*, *rscC* ou la mutation $\Delta rscCDB$ présentent, pour ceux que nous avons analysés, les mêmes phénotypes qu'une souche sauvage. On observe les mêmes phénotypes chez le mutant *rscC2* excepté une augmentation de la virulence sur tubercule de pomme de terre et sur feuille d'endive. Dans un contexte *opgG*, l'inactivation des gènes du système RcsCD-RcsB restaure les phénotypes à un niveau équivalent à la souche sauvage ou pour certaines combinaisons à un niveau intermédiaire entre la souche sauvage et la souche *opgG*. Seule la virulence sur feuille d'endive n'est pas restaurée. Chez *E. coli*, une mutation au niveau du gène *opgH* conduit à une surproduction d'exopolysaccharides menant à un phénotype muqueux. Ce phénotype est supprimé par l'introduction d'une mutation additionnelle dans les gènes *rscC*, *rscB* ou *rscA* (Ebel et coll. 1997). Chez *S. Enterica*, une suractivation du système RcsCD-RcsB conduit à une forte atténuation de la virulence (Dominguez-Bernal et coll. 2004, García-Calderon et coll. 2005, Mouslim et coll. 2004). De plus, plusieurs phénotypes présentés par un mutant ne produisant pas d'OPG, tels que la diminution de la motilité ou l'augmentation de synthèse des exopolysaccharides, pourraient être le résultat de l'activation du système RcsCD-RcsB (Majdalani et Gottesman, 2005).

L'étude du niveau d'activité des fusions *flhD-uidA* et *ftsA-uidA* montre qu'elles sont respectivement réprimées et induites en absence d'OPG. Ces gènes sont bien sous le contrôle du système RcsCD-RcsB chez *D. dadantii*. Les différentes mutations au niveau des gènes de ce système dans un contexte *opgG* permettent la suppression de la répression du gène *flhD* et de l'activation du gène *ftsA*. L'étude de la mutation *rscC2* montre qu'elle diminue le niveau d'activation du système RcsCD-RcsB et qu'elle est co-dominante par rapport à l'allèle sauvage. Ainsi il semble que cette mutation provoque une augmentation de l'activité phosphatase de la protéine RcsC menant à une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine RcsB. Chez *E. coli*, trois mutations dominantes ont été isolées au niveau du capteur BarA du système BarA-UvrY (Tomenius et coll. 2005). Ces mutations se situent entre le domaine transmembranaire et le domaine histidine kinase, donc dans la région correspondant à la région où se situe le changement en acide aminé induit par la mutation *rscC2*. Comme pour *rscC2*, ces mutations entraînent une augmentation de l'activité phosphatase de la protéine BarA.

Tous ces résultats indiquent qu'en absence d'OPG le système RcsCD-RcsB est activé. De ce fait, l'inactivation ou la baisse du niveau d'activation du système RcsCD-RcsB permet de restaurer la plupart des phénotypes testés. L'augmentation de l'osmolarité est un signal qui active le système RcsCD-RcsB (Sledjeski et Gottesman 1996, Francez-Charlot et coll. 2005).

Or dans ces conditions la quantité d'OPG est diminuée. On peut supposer que les OPG seraient un signal perçu par le système RcsCD-RcsB. La quantité d'OPG pourrait donc moduler l'activité du système RcsCD-RcsB. Ceci est développé dans le chapitre suivant (cf B. Influence de la quantité d'OPG synthétisés sur l'activité du système RcsCD RcsB).

On peut noter qu'aucune restauration de la virulence sur feuille d'endive n'a été observée. De plus on observe que pour quelques phénotypes et dans certains contextes l'influence des OPG est encore présente, bien que réduite. On l'observe au niveau transcriptionnelle, l'activité de la fusion *flhD-uidA* est légèrement inférieure en absence d'OPG dans les contextes *rscB* et *rscC2 rscB*, mais également au niveau de la motilité et de l'activité globale des pectinases qui sont légèrement perturbées par l'absence d'OPG respectivement dans les contextes *ΔrscCDB*, *rscB*, *rscC2 rscB* et *rscB*, *rscC2 rscB*. Chez *E. coli*, les OPG seraient perçus par le système à deux composants EnvZ-OmpR (Fiedler et Rotering 1998). En effet, ces auteurs ont isolé une mutation suppressive du phénotype *opgH* dans le locus *envZ-ompR* en utilisant le crible de motilité. Il a été montré depuis que la protéine OmpR phosphorylée se fixe au promoteur de *flhDC* et entraîne une répression de cet opéron (Girgis et coll. 2007, Shin et Park 1995). Chez *E. coli*, l'activité du système à deux composants CpxAR est altérée chez un mutant *opgG* (Betton J.-M. communication personnelle). Chez *Serratia sp.*, une mutation au niveau du gène *pigX* permet de restaurer la virulence sur tubercule de pomme de terre dans un contexte *opgG* (Fineran et coll. 2007). Le gène *pigX* code une protéine contenant un domaine GGDEF/EAL impliquée dans la modulation du niveau intracellulaire du messager secondaire c-di-GMP. Ce messager secondaire contrôle de nombreux processus cellulaires associés à la transition entre les modes de vies sessiles et motiles chez les bactéries. Ainsi une faible concentration en c-di-GMP est associée à la motilité. A l'inverse, l'augmentation de la concentration en c-di-GMP promeut l'attachement et induit la formation de biofilm (Jenal et Malone 2006). Récemment au laboratoire, nous avons montré qu'un mutant *pecS* codant le répresseur majeur de la virulence chez *D. dadantii*, restaure la virulence d'un mutant *opgG* (Bontemps-Gallo 2010). L'étude du protéome soluble d'une souche de *D. dadantii* ne produisant pas d'OPG a montré un changement profond qui ne se restreint pas au régulon RcsCD-RcsB (Bouchart et coll. 2007). Enfin contrairement aux OPG le système RcsCD-RcsB n'est présent que chez les entérobactéries. Tout ceci indique que les OPG interagissent avec plusieurs systèmes de régulation incluant certains systèmes à deux composants.

Résultats :

**Partie B. Influence de la quantité d'OPG synthétisés
sur l'activité du système RcsCD RcsB**

B. Influence de la quantité d'OPG synthétisés sur l'activité du système RcsCD-RcsB

I. Construction d'un système de synthèse contrôlée d'OPG

Dans la première partie des résultats nous avons vu que l'absence d'OPG active le système RcsCD-RcsB. Les OPG pourraient donc être un signal perçu par le système RcsCD-RcsB. Dans ce cas il est envisageable que la quantité d'OPG module l'activité du système RcsCD-RcsB. Il est possible de modifier la quantité d'OPG en faisant varier l'osmolarité du milieu. Cependant le changement de l'osmolarité du milieu modifie de nombreuses fonctions cellulaires indépendamment de la quantité d'OPG. Ainsi pour s'affranchir de l'osmolarité, l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* a été placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose, le promoteur P_{BAD} (Guzman et coll. 1995). Contrairement à d'autres systèmes, ce promoteur conduit à des niveaux d'expressions qui ne sont pas trop élevés. Il permet ainsi de rester dans des conditions proches des conditions physiologiques. De plus, en modulant la quantité d'arabinose présente dans le milieu il est possible d'obtenir des niveaux d'expression intermédiaires et cette modulation s'observe sur une large gamme de concentration en arabinose. Dans ces conditions, la quantité d'arabinose présente dans le milieu devrait déterminer le niveau d'expression de l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* et par la même la quantité d'OPG synthétisés.

1. Efficacité de la construction chez *E. coli*

Tous les clonages ont été effectués chez *E. coli*. Or l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* complète les mutations de l'opéron *opgGH* d' *E. coli* (Page et coll., 2001). Il est donc possible, lors de ces étapes de clonages, de contrôler l'efficacité de la construction. Pour ce faire, une souche d'*E. coli* mutée au niveau de l'opéron *opgGH* a été transformée par le plasmide pNFW212, contenant l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* sous le promoteur P_{BAD} . La souche obtenue possède un phénotype muqueux sur un milieu gélosé ne contenant pas d'arabinose. La même souche, en présence d'arabinose, n'est pas muqueuse. Cette souche présente donc un phénotype Opg^- en absence d'arabinose (production d'exopolysaccharides) et un phénotype Opg^+ lorsque l'arabinose est présent dans le milieu. La construction est donc fonctionnelle.

2. Le miniTn5 Sp/Sm *araC* P_{BAD}*opgGH*

Le système pUTminiTn5 (De Lorenzo et coll., 1994) a été utilisé afin de transférer la construction chez *D. dadantii*. La construction comprenant le gène *araC* codant le régulateur transcriptionnel et l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* sous le contrôle du promoteur P_{BAD} a été insérée au niveau d'un mini-transposon (Figure 19) porté par un plasmide pUT (pNFW233).

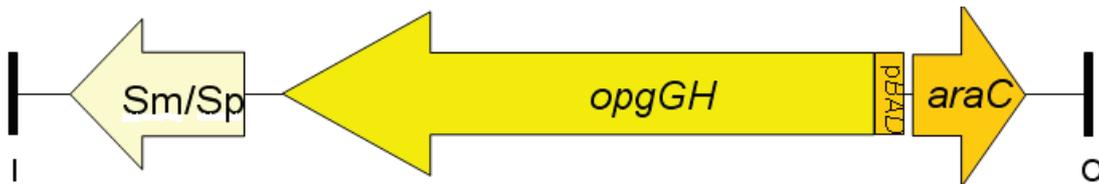


Figure 19 : miniTn5 Sp/Sm *araC*-P_{BAD}*opgGH*

Le transfert du plasmide pNFW233 d'*E. coli* vers *D. dadantii* a été effectué par conjugaison. L'insertion du miniTn5 Sp/Sm dans le chromosome bactérien confère à la souche la résistance à la spectinomycine. La sensibilité à l'ampicilline témoigne de la perte du plasmide pUT. L'insertion a ensuite été transférée dans la souche NFB3723 (*opgG*::cml) par transduction généralisée par le phage ΦEC2 (Resibois et coll., 1984). La souche obtenue est NFB3835. L'insertion du miniTn5 Sp/Sm *araC*-P_{BAD}*opgGH* a été localisée par PCR inverse. Celle-ci se situe entre les gènes ABF-0014775 et ABF-0016288 (<https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>). Cette insertion dans une région intergénique ne modifie pas le comportement de *D. dadantii* dans les conditions testées au laboratoire (croissance, motilité, virulence...).

II. Phénotypes de la souche NFB3835

1. La motilité

Les tests en présence ou en absence d'arabinose sur milieu M63 glycérol faiblement gélosé montrent que l'arabinose ne modifie pas de manière significative la motilité des souches EC3937 (sauvages) et NFB3723 (*Opg*⁻) (Tableau 2). En absence d'arabinose le diamètre du halo de nage de la souche NFB3835 est semblable à celui de NFB3723. En présence d'arabinose, le diamètre du halo de nage de NFB3835 est trois fois plus élevé. Celui-ci se rapproche du diamètre de halo de nage de la souche sauvage EC3937.

Concernant la motilité, la souche NFB3835 présente donc un phénotype proche du phénotype sauvage en présence d'arabinose et un phénotype Opg^- en absence d'arabinose.

Tableau 2 : Diamètre en cm des halos de nages des souches EC3937 (sauvages), NFB3723 (Opg^-) et NFB3835 ($P_{BAD}opgGH$) en présence ou en absence d'arabinose. Les cultures en phase stationnaire sont centrifugées et ressuspendues afin d'obtenir une D.O. égale à 2. 2 μ l sont alors déposés sur un milieu M63 faiblement gélosé supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) avec ou sans arabinose (2 g.L⁻¹). Après 24H d'incubation à 30°C la taille des halos de nages est mesurée.

	EC3937	NFB3723	NFB3835
Glycérol	2,8	0,9	0,8
Glycérol + arabinose	2,9	1,1	2,4

2. Activité des exoenzymes

a. Les protéases

Le tableau 3 présente les résultats des tests protéase en milieu M63 glycérol contenant du lait. La souche sauvage EC3937 présente un halo translucide autour de ses colonies en présence et en absence d'arabinose dans le milieu. La souche Opg^- NFB3723 ne présente aucun halo de dégradation autour de ses colonies que ce soit en présence ou en absence d'arabinose. En présence d'arabinose on observe un halo de dégradation autour des colonies de NFB3835. Aucun halo n'est observé autour des colonies de cette souche cultivée en absence d'arabinose.

Au niveau de la sécrétion des protéases, la souche NFB3835 présente donc un phénotype Opg^+ en présence d'arabinose et un phénotype Opg^- en absence d'arabinose.

Tableau 3 : Observation des halos de dégradation des protéines du lait en présence ou en absence d'arabinose pour les souches EC3937 (sauvages), NFB3723 (Opg^-) et NFB3835 ($P_{BAD}opgGH$). Les cultures en phase stationnaire sont centrifugées et ressuspendues afin d'obtenir une D.O. égale à 2. 2 μ l sont alors déposés sur un milieu M63 contenant du lait (1 g.L⁻¹) supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) avec ou sans arabinose (2 g.L⁻¹). L'incubation s'effectue pendant 24H 30°C. + indique la présence d'un halo de dégradation. - indique l'absence de halo de dégradation.

	EC3937	NFB3723	NFB3835
Glycérol	+	-	-
Glycérol + arabinose	+	-	+

b. Les cellulases

Le tableau 4 présente les diamètres des halos observés après révélation au rouge congo précédé d'une croissance sur milieu M63 contenant de la carboxyméthylcellulose (CMC). L'ajout d'arabinose dans le milieu ne modifie pas la taille des halos de dégradation des souches sauvage EC3937 et *opgG* NFB3723. En présence d'arabinose, la taille du halo de dégradation du CMC de la souche NFB3835 est semblable à celui de la souche sauvage. En absence d'arabinose, on retrouve un halo de dégradation semblable à celui de la souche *opgG*.

En présence de l'inducteur, la souche NFB3835 produit donc des cellulases à un niveau équivalent à une souche sauvage. En absence de l'inducteur on observe une diminution de la production de cellulases semblable à celle d'une souche *Opg⁻*

Tableau 4 : Diamètre en cm des halos de dégradation du CMC en présence ou en absence d'arabinose pour les souches EC3937 (sauvages), NFB3723 (*Opg⁻*) et NFB3835 (*P_{BAD}opgGH*). Les cultures en phase stationnaire sont centrifugées et resuspendues afin d'obtenir une D.O. égale à 2. 2µl sont alors déposés sur un milieu minimum M63 contenant de la carboxyméthylcellulose (2 g.L⁻¹), du glycérol (2 g.L⁻¹) et du MgSO₄ (7 mM) avec ou sans arabinose (2 g.L⁻¹). L'incubation s'effectue pendant 24H 30°C.

	EC3937	NFB3723	NFB3835
Glycérol	1,2	0,9	0,8
Glycérol + arabinose	1,3	0,9	1,2

c. Les pectinases

Le tableau 5 présente la taille des halos observés après révélation à l'acétate de cuivre précédé d'une croissance sur milieu M63 contenant du polygalacturonate (PGA). On observe que l'ajout d'arabinose dans le milieu ne modifie pas de manière significative la taille des halos de dégradation des souches sauvage EC3937 et *opgG* NFB3723. En présence d'arabinose, la taille du halo de dégradation du PGA de la souche NFB3835 est semblable à celui de la souche sauvage. En absence d'arabinose, on retrouve un halo de dégradation semblable à celui de la souche *Opg⁻*.

En présence de l'inducteur, la souche NFB3835 produit donc des pectinases à un niveau équivalent à une souche sauvage. En absence de l'inducteur, on observe une diminution de la production de pectinases semblable à celle d'une souche *Opg⁻*

Tableau 5 : Diamètre en cm des halos de dégradation du PGA en présence ou en absence d'arabinose pour les souches EC3937 (sauvages), NFB3723 (*Opg*⁻) et NFB3835 (*P_{BAD}opgGH*). Les cultures en phase stationnaire sont centrifugées et ressuspendues afin d'obtenir une D.O. égale à 2. 2µl sont alors déposés sur un milieu M63 contenant du polygalacturonate PGA (4 g.L⁻¹), du glycérol (2 g.L⁻¹) avec ou sans arabinose (2 g.L⁻¹). L'incubation s'effectue pendant 24H 30°C.

	EC3937	NFB3723	NFB3835
Glycérol	1,8	1	0,8
Glycérol + arabinose	1,8	1,2	1,8

3. Virulence sur tubercule de pomme de terre

Les souches de *D. dadantii* ont été cultivées en milieu M63 glycérol liquide. 10⁷ bactéries ont été inoculées dans les tubercules de pomme de terre. Dans ces conditions, la souche NFB3835 est non virulente. Si on ajoute de l'arabinose dans le trou d'infection au moment de l'inoculation, la souche NFB3835 est virulente sur tubercule de pomme de terre (Figure 20). Dans ces mêmes conditions, la virulence de la souche sauvage de *D. dadantii* est inchangée et la souche *opgG* NFB3723 est non virulente.

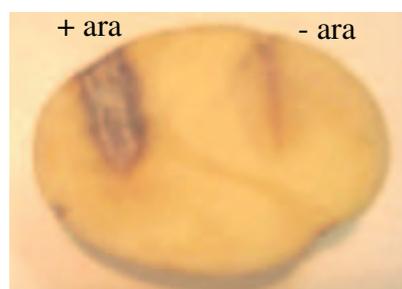


Figure 20: Infection de tubercule de pomme de terre par la souche NFB3835 (*P_{BAD}opgGH*). Les bactéries ont été cultivées en milieu 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) pendant une nuit. La culture en phase stationnaire est centrifugée et resuspendues afin d'obtenir une D.O. égale à 2. L'inoculum est de 10⁷ bactéries (5µl). Dans le premier site d'infection 5µl d'arabinose à 2 g.L⁻¹ ont été ajoutés

4. La mucosité

La souche NFB3723 (*opgG*) présente un phénotype muqueux sur milieu M63 glycérol et sur milieu M63 glycérol et arabinose (Figure 21). La souche sauvage EC3937 n'est pas muqueuse sur ces milieux. La présence d'arabinose dans le milieu de culture ne modifie donc pas le comportement des souches sauvages EC3937 et NFB3723 (*opgG*). Les colonies de la

souche NFB3835 présentent un aspect muqueux sur milieu M63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹). L'ajout d'arabinose jusqu'à une concentration de 0,03 g.L⁻¹ ne modifie pas ce phénotype. À partir de 0,1 g.L⁻¹ d'arabinose, les colonies de la souche NFB3835 ne sont plus muqueuses.

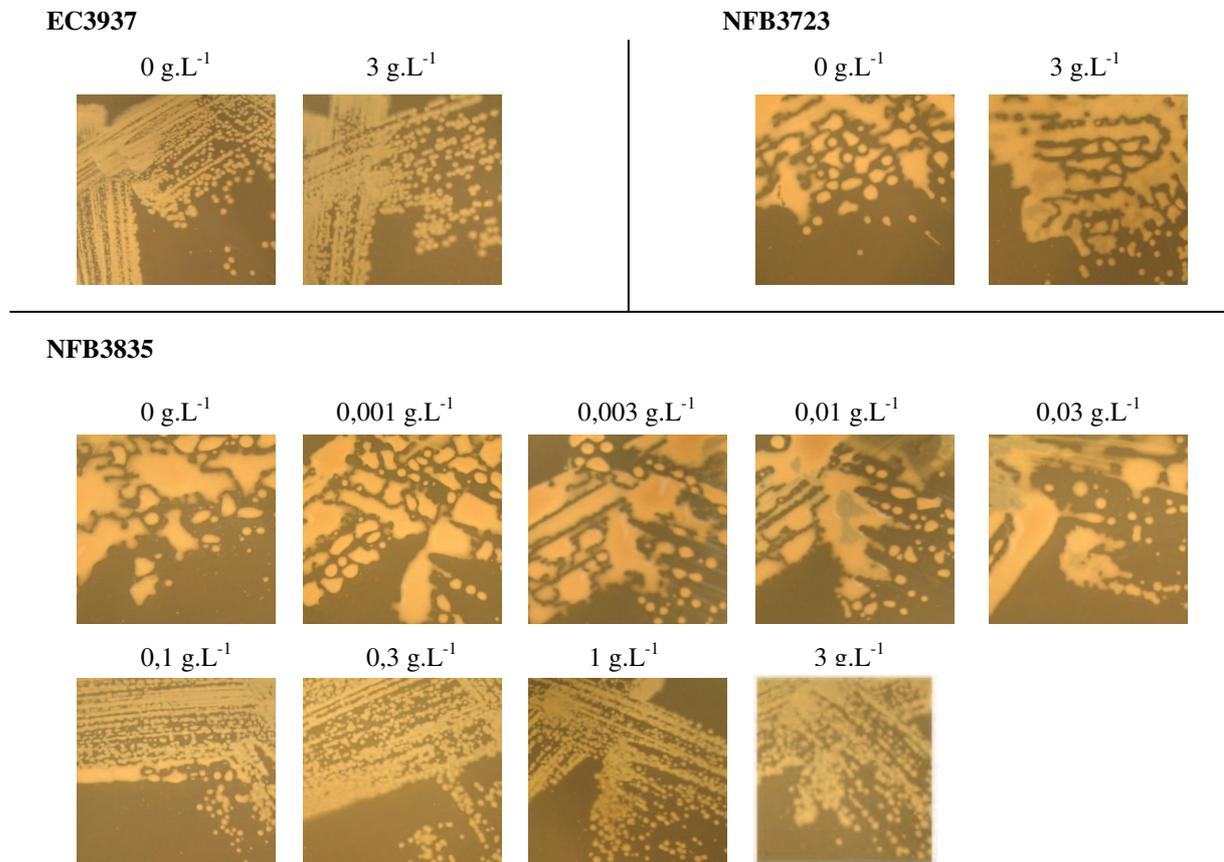


Figure 21: Phénotypes des colonies des souches EC3937 (sauvages), NFB3723 (*opg*⁻) en présence ou en absence d'arabinose et NFB3835 (*P_{BAD}opgGH*) en présence de différentes concentrations ou en absence d'arabinose. Les souches ont été cultivées sur milieu 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) et de différentes concentrations d'arabinose. Les photos ont été prises après 60H d'incubation à 24°C.

5. Bilan

En absence d'arabinose, la souche NFB3835 est non motile, muqueuse, l'activité globale des exoenzymes (protéases cellulases pectinases) est faible et elle est non virulente sur tubercule de pomme de terre. En présence d'arabinose, on observe une augmentation de la motilité, une augmentation de l'activité globale des exoenzymes, de plus NFB3835 est non muqueuse et virulente sur tubercule de pomme de terre. La souche NFB3835 présente donc

les phénotypes d'une souche sauvage en présence d'arabinose et les phénotypes d'une souche Opg^- en absence d'arabinose.

III. Evaluation du niveau de transcription de l'opéron *opgGH* sous le contrôle du promoteur P_{BAD}

1. La fusion transcriptionnelle $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$

Nous avons construit une fusion $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$ afin d'étudier le niveau de transcription de l'opéron *opgGH* à partir du promoteur P_{BAD} . Cette construction portée par le miniTn5 Sp/Sm a été insérée dans le génome de *D. dadantii*. Trois insertions indépendantes du miniTn5 $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$ dans la souche sauvage ont été étudiées. L'étude des activités β -glucuronidase en fonction de la quantité d'arabinose n'a pas mis en évidence de différence significative dans le comportement des fusions dans ces trois souches. Pour la suite, l'insertion dans le chromosome de NFB3926 a été utilisée pour l'étude de la réponse à l'arabinose de la fusion $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$. L'expression de la fusion $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$ a également été étudiée dans le contexte *opgG* (NFB3929). Le dosage de l'activité β -glucuronidase dans cette souche ne montre pas de différence significative avec le contexte sauvage.

2. Activité transcriptionnelle du promoteur P_{BAD} en fonction de la quantité d'arabinose

La courbe de réponse de la fusion $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$ en fonction de la quantité d'arabinose a été obtenue à partir de trois séries de dosages indépendantes effectuées sur la souche NFB3926 (Figure 22). Les données sont exprimées en pourcentage de l'activité maximale qui correspond à une concentration de 3 g.L⁻¹ d'arabinose. Le ratio entre les conditions induites et non induites est d'environ 70. L'activité β -glucuronidase de la fusion en présence de 0,001 g.L⁻¹ est très faible, elle est similaire à celle en présence de glucose (répresseur du système P_{BAD}). Cette fenêtre de concentration sera donc utilisée pour la suite des expériences. La courbe est en accord avec le modèle de réponse décrit par Guzman et coll. On observe une activité très faible jusqu'à 0,01 g.L⁻¹ d'arabinose. Des activités intermédiaires sont obtenues entre 0,01 g.L⁻¹ et 1 g.L⁻¹ alors qu'à partir de 1 g.L⁻¹ l'activité glucuronidase est à son maximum.

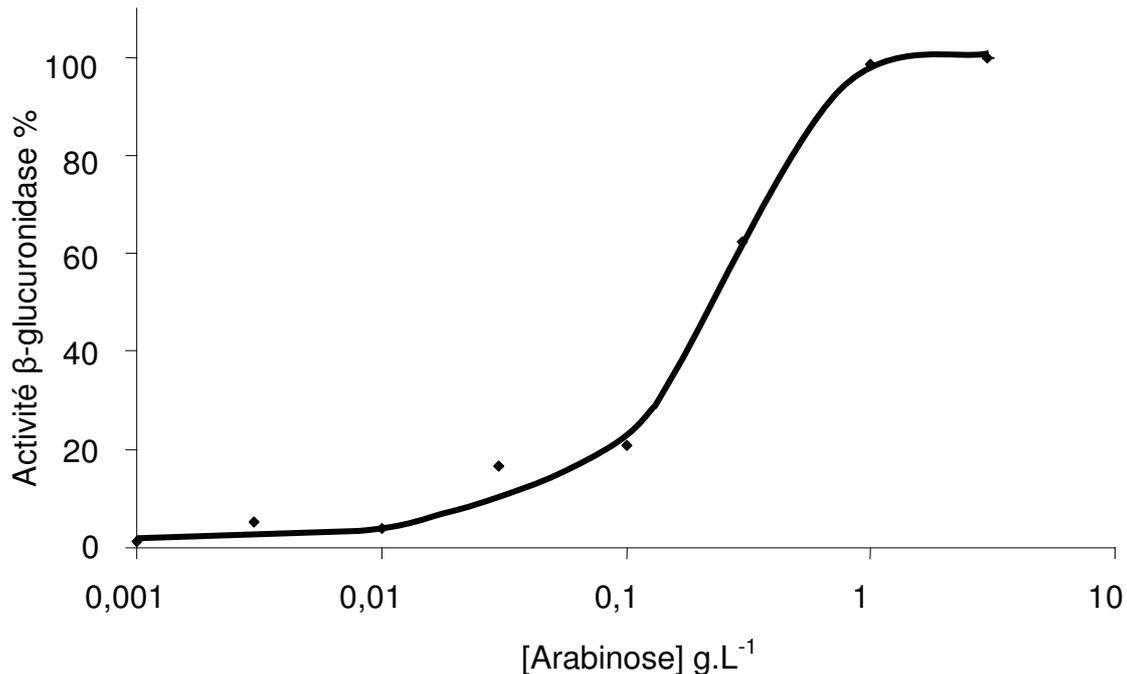


Figure 22 : Activité β-glucuronidase de la fusion $P_{BAD}opgG-uidA-Kan$ en fonction de la concentration en arabinose dans le milieu. La souche de *D. dadantii* NFB3926 a été cultivée en milieu minimum 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) en présence de différentes concentrations en arabinose à 30°C. Les cultures ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance (D.O. ≈0,6) puis passées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. Les résultats sont exprimés en pourcent.

IV. Dosage de la quantité d'OPG produite par la souche NFB3837 en fonction de la quantité d'arabinose

La souche NFB3837 résulte de la transduction de la fusion *ftsA-uidA* dans la souche NFB3835. Suite à la détermination de la fenêtre de concentration en arabinose permettant une expression intermédiaire à partir du promoteur P_{BAD} , nous avons dosé la quantité d'OPG produits par la souche NFB3837 portant l'opéron *opgGH* sous le contrôle du même promoteur dans cette même fenêtre de concentration (Figure 23). Les bactéries sont cultivées en milieu synthétique 63 glycérol en présence de différentes quantités d'arabinose (de 0,001 g.L⁻¹ à 3 g.L⁻¹). Les cultures sont arrêtées en phase exponentielle de croissance (DO≈0,6). L'extraction des OPG est effectuée sur 200 mL de culture comme décrit dans le matériel et méthodes. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité d'OPG synthétisés à une concentration en arabinose de 3 g.L⁻¹. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 séries de dosages indépendants. Pour les faibles concentration en arabinose (0,001 g.L⁻¹ et 0,003 g.L⁻¹) la synthèse d'OPG est quasiment nulle. La synthèse d'OPG

augmente de manière exponentielle par rapport à la quantité d'inducteur pour des concentrations en arabinose allant de 0,01 g.L⁻¹ à 0,1 g.L⁻¹. Au delà la synthèse d'OPG arrive à un plateau, l'augmentation de la quantité d'arabinose n'augmente que très faiblement la synthèse d'OPG. On peut noter qu'un faible taux de transcription permet une augmentation rapide de la synthèse d'OPG. En effet, l'activité de la fusion P_{BAD}*opgG-uidA-Kan* est faible pour les concentrations en arabinose allant de 0,01 g.L⁻¹ à 0,1 g.L⁻¹. De plus le système de synthèse des OPG sature à partir d'une concentration de 0,3 g.L⁻¹ d'arabinose. A partir de cette valeur la synthèse des OPG tend vers son maximum alors que l'augmentation de la transcription rapportée par la fusion P_{BAD}*opgG-uidA-Kan* est encore possible. En effet l'activité β-glucuronidase de la fusion P_{BAD}*opgG-uidA-Kan* en présence de 0,3 g.L⁻¹ d'arabinose représente environ 60% de son activité maximale, alors que la synthèse d'OPG est déjà à plus de 90% (Figure 22 et 23). La souche NFB3861 est une souche de *D. dadantii* portant l'allèle sauvage de l'opéron *opgGH* et l'insertion ectopique du miniTn5 Sp/Sm *araC-P_{BAD}opgGH*. En absence d'arabinose, la quantité d'OPG synthétisés par NFB3861 est semblable à la quantité maximale d'OPG synthétisés par la souche NFB3837. L'ajout d'arabinose à 3 g.L⁻¹ ne permet pas d'augmenter la quantité d'OPG synthétisés par NFB3861. Ceci plaide en faveur de l'existence d'un rétrocontrôle par les OPG sur la synthèse des OPG par le complexe OpgGH.

La synthèse d'OPG par la souche NFB3837 est donc dépendante de la quantité d'arabinose présent dans le milieu. La fourchette de concentration en arabinose utilisée permet de faire varier la quantité d'OPG produit par NFB3837. La quantité d'OPG est indétectable aux plus basses concentrations d'arabinose mais atteint une concentration voisine de celle observés dans une souche sauvage à partir de 1 g.L⁻¹ d'arabinose en passant par des niveaux intermédiaires. Dans ces conditions, la quantité d'OPG synthétisés est donc indépendante de l'osmolarité et l'augmentation de la transcription de l'opéron *opgGH* permet d'augmenter la quantité d'OPG progressivement jusqu'au niveau observé dans une souche sauvage.

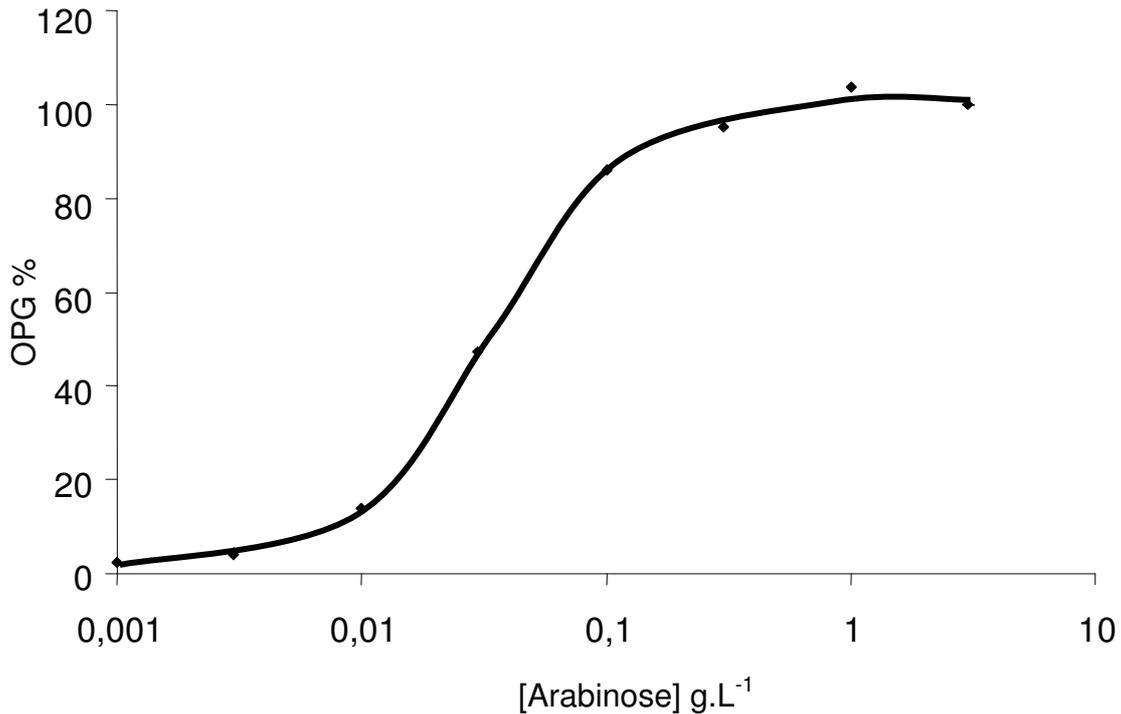


Figure 23 : Quantité d'OPG synthétisés par la souche NFB3837 en fonction de la concentration en arabinose dans le milieu. La souche de *D. dadantii* NFB3837 (miniTn5 Sp/Sm *araC-P_{BAD}opgGH*) a été cultivée en milieu minimum 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) en présence de différentes concentrations en arabinose à 30°C. Les OPG ont été extraits à partir de 200 mL de culture en phase exponentielle de croissance (D.O. ≈0,6). Les résultats sont exprimés en pourcent.

V. Effet de la variation de la quantité d'OPG sur l'activité du système RcsCD-RcsB

Dans la première partie des résultats, nous avons vu grâce aux études phénotypiques et à l'étude de l'expression des opérons *flhDC* et *ftsAZ* que l'absence d'OPG activait le système RcsCD-RcsB. Des deux fusions rendant compte de l'activité du système RcsCD-RcsB, la fusion *ftsA-uidA* est celle dont la réponse à l'absence d'OPG est la plus forte. Le facteur d'induction est de 13 pour la fusion *ftsA-uidA* contre un facteur de répression de 2 pour la fusion *flhD-uidA* (Figure 18). La fusion *ftsA-uidA* a donc été choisie pour étudier l'effet de la variation de la quantité d'OPG sur l'activité du système RcsCD-RcsB. Cette fusion a été transduite dans la souche NFB3835 donnant la souche NFB3837.

Les dosages des activités β -glucuronidase ont été effectués en parallèle de l'étude de la quantité d'OPG. Pour rappel, les bactéries sont cultivées en milieu synthétique 63 glycérol en présence de différentes quantités d'arabinose (0,001 g.L⁻¹ à 3 g.L⁻¹). Les cultures sont arrêtées

en phase exponentielle de croissance ($DO \approx 0,6$). Les extraits sont préparés à partir de 50mL de culture comme décrit dans le matériel et méthodes. La courbe représente la moyenne de 4 séries de dosages indépendants (Figure 24). Les données sont exprimées en pourcentage de l'activité maximale. Celle-ci fut obtenue pour la concentration la plus faible en arabinose ($0,001 \text{ g.L}^{-1}$). A cette concentration en arabinose, la quantité d'OPG produits par la souche NFB3837 est quasi nulle. Plus on augmente la concentration en arabinose plus l'expression de la fusion *ftsA-uidA* diminue. On observe que l'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* diminue de manière exponentielle pour des concentrations en arabinose allant de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ à $0,3 \text{ g.L}^{-1}$. Au dessus d'une concentration en arabinose de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, l'expression de la fusion *ftsA-uidA* tend vers son minimum (environ 20%). Ceci est en accord avec ce qui avait été observé dans la première partie des résultats c'est à dire une induction de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* en absence d'OPG. De plus cette figure montre que chez la souche NFB3837 le niveau d'expression de la fusion *ftsA-uidA* est dépendant de la quantité d'arabinose et donc de la quantité d'OPG synthétisée.

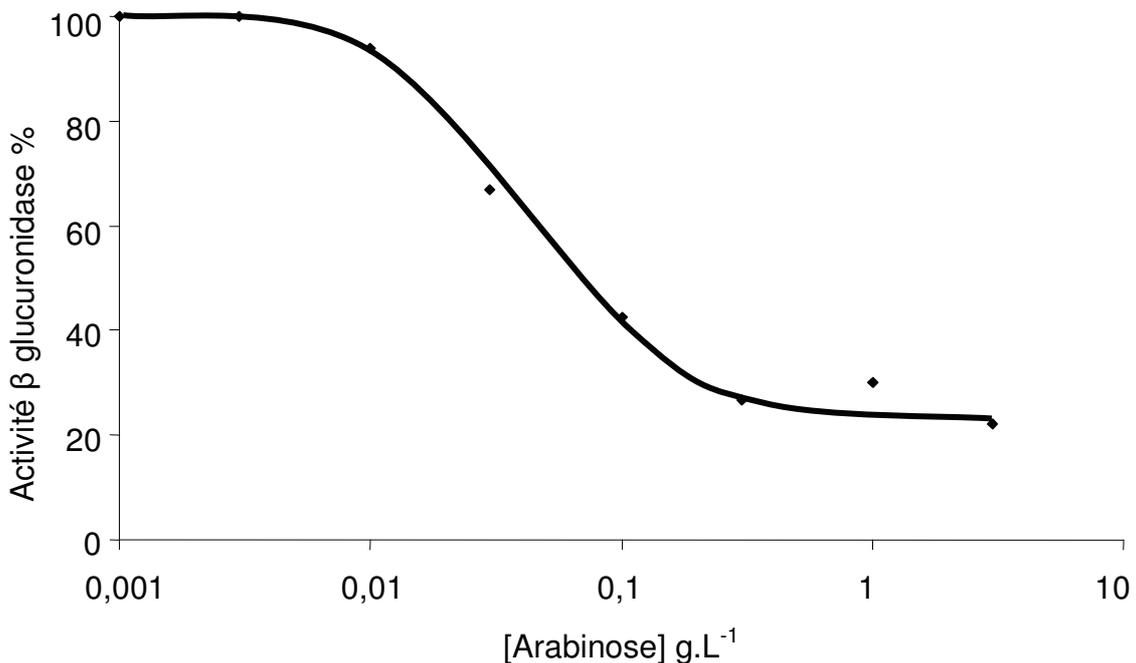


Figure 24 : Activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* de la souche NFB3837 dont la synthèse d'OPG est induite par l'arabinose en fonction de la concentration d'arabinose. La souche de *D. dadantii* NFB3837 (miniTn5 Sp/Sm *araC-P_{BAD}OpG_H*) a été cultivée en milieu minimum 63 supplémenté de glycérol (2 g.L^{-1}) en présence de différentes concentrations en arabinose à 30°C . Les cultures ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance ($D.O. \approx 0,6$) puis cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. Les résultats sont exprimés en pourcent.

Nous avons testé l'influence directe de l'arabinose sur l'expression de la fusion *ftsA-uidA*. La souche NFB3809, possédant la fusion *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage, a été cultivée en milieu synthétique 63 glycérol en présence d'arabinose en faible quantité (0,002 g.L⁻¹) ou en grande quantité (2 g.L⁻¹). La figure 25 montre qu'il n'y a pas de différence significative dans l'activité β -glucuronidase de cette fusion entre ces deux conditions. L'arabinose ne modifie donc pas l'expression de la fusion *ftsA-uidA*. Pour rappel l'activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* dans un contexte où la synthèse des OPG est induite par l'arabinose a été reportée sur la figure. Les différences observées au niveau de l'expression de la fusion *ftsA-uidA* dans la souche NFB3837 cultivée en présence de différentes concentrations d'arabinose sont donc bien dues à des niveaux de synthèses des OPG différents et non à une influence de l'arabinose.

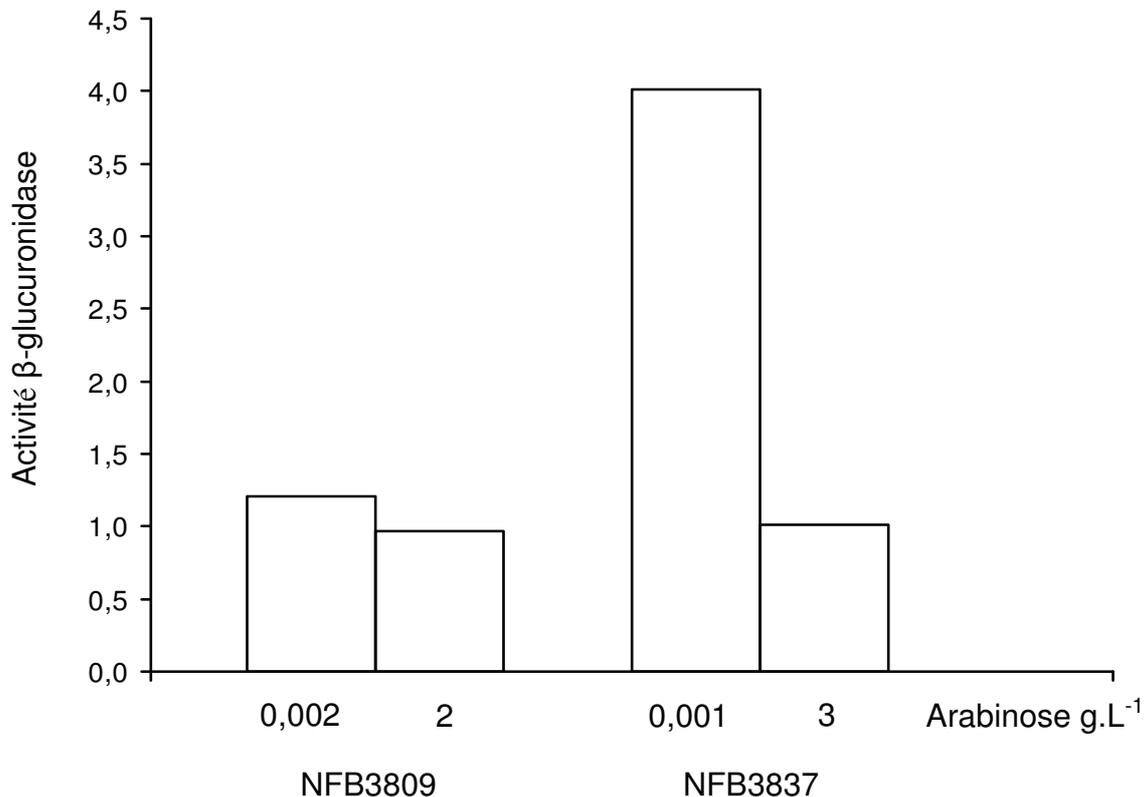


Figure 25 : Activité β -glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* dans un contexte sauvage (NFB3809) et dans un contexte où la synthèse des OPG est induite par l'arabinose (NFB3837) en présence de différentes quantités d'arabinose. Les souches de *D. dadantii* ont été cultivées en milieu minimum 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) en présence de différentes concentrations en arabinose à 30°C. Les cultures ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance (D.O. $\approx 0,6$) puis cassées à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. Les résultats sont exprimés en $\Delta DO_{410nm}/min/mg$ de protéines.

Ces résultats permettent donc de mettre en relation la quantité d'OPG synthétisés à l'activation du système du RcsCD-RcsB par le biais du niveau d'expression de la fusion *ftsA-uidA*. La figure 26 montre la relation entre la quantité d'OPG et l'expression de la fusion *ftsA-uidA*. On observe que lorsque la production d'OPG est supérieure à 10%, l'expression de cette fusion est proportionnée à la quantité d'OPG. L'expression de cette fusion est le reflet de l'activation du système RcsCD-RcsB. On peut donc dire qu'entre 10% et 100% d'OPG le système RcsCD-RcsB perçoit finement la quantité d'OPG. En dessous de ces 10% l'expression de la fusion est au maximum. On peut donc en déduire que soit le système RcsCD-RcsB est pleinement activé en dessous de 10% de synthèse d'OPG (dans ce cas le fait de diminuer la synthèse ne modifie plus l'activation du système RcsCD-RcsB), soit le promoteur *ftsAp1* est exprimé à son maximum et le fait d'activer encore plus le système RcsCD-RcsB ne permet plus d'augmenter l'expression de la fusion *ftsA-uidA*.

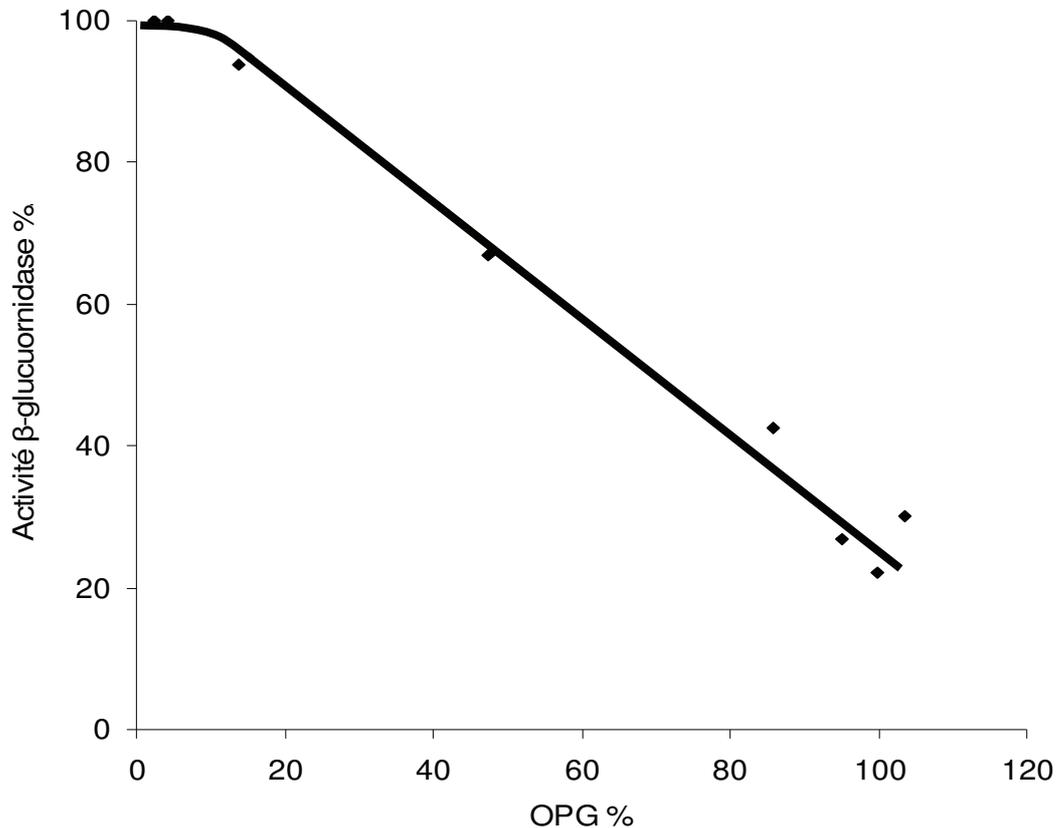


Figure 26 : Activité β-glucuronidase de la fusion *ftsA-uidA* en fonction de la quantité d'OPG synthétisée. La souche de *D. dadantii* NFB3837 (miniTn5 Sp/Sm *araC-P_{BAD}opgGH*) a été cultivée en milieu minimum 63 supplémenté de glycérol (2 g.L⁻¹) en présence de différentes concentrations en arabinose à 30°C. Les cultures (300 mL) ont été arrêtées en phase exponentielle de croissance (D.O. ≈0,6). 50 mL ont été cassés à la presse de French. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPu. 200 mL ont été utilisés pour extraire les OPG. Les résultats sont exprimés en pourcent.

Résultats :

Partie C. Recherche de gènes cibles des OPG

C. Recherche de gènes cibles des OPG

(En collaboration avec A.F. Prouvost et E. Madec)

Nous avons montré que l'absence d'OPG modifie l'expression de gènes cibles du système RcsCD-RcsB (*flhDC* et *ftsAZ*). De plus l'ensemble des données suggère que le système RcsCD-RcsB n'est pas le seul système interagissant avec les OPG. Dans ce cas, l'absence d'OPG pourrait modifier l'expression de gènes indépendamment du système RcsCD-RcsB. La suite de mon travail a donc consisté en la recherche d'autres gènes dont l'expression est modifiée en absence d'OPG. Pour cela j'ai utilisé le miniTn5-GGm (Figure 27 ; numéro d'accèsion Genbank : AF080391) contenant le gène rapporteur *uidA* sans promoteur et le gène *aacCI* conférant la résistance à la gentamycine (Reeve et coll. 1999). Le plasmide pCRS5548 est un pUT (Amp^R) portant ce miniTn5-GGm et permet donc par conjugaison de transférer le miniTn5-GGm chez *D. dadantii* afin de créer des fusions transcriptionnelles de manière aléatoire.

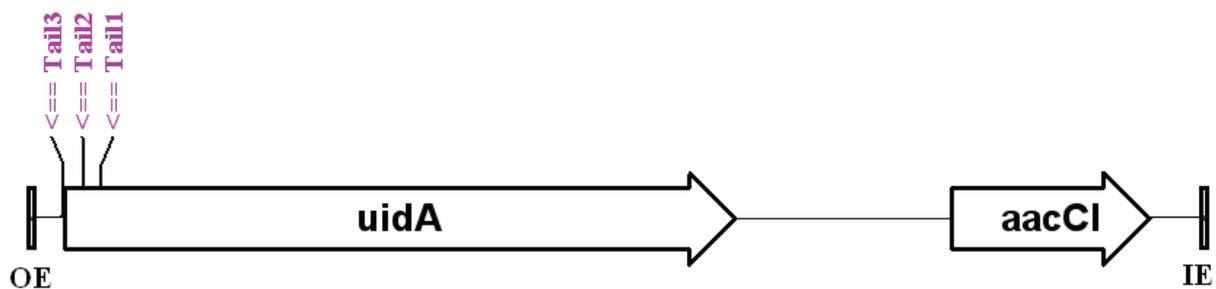


Figure 27 : Le miniTn5-GGm. OE, outside end et IE, inside end sont les séquences nécessaires à la transposition. Ce miniTn5 porte le gène *uidA* sans promoteur codant la β -glucuronidase et le gène *aacCI* conférant la résistance à la gentamycine. Les sites d'hybridations des trois amorces (Tail1, 2, 3) spécifiques du miniTn5-GGm utilisées pour la TAIL PCR sont également indiqués.

I. La démarche expérimentale

1. Construction du système de création de fusions transcriptionnelles aléatoires.

L'utilisation du plasmide pUT pour le transfert des miniTn5 d'*E. coli* à *D. dadantii*, n'est pas efficace à 100%. En effet après conjugaison, environ 40% des clones de *D. dadantii* obtenus sont résistants à la fois à la gentamycine et à l'ampicilline. Ces clones n'ont donc pas perdu le plasmide pUT. La modification du protocole de conjugaison m'a permis de diminuer

cette proportion de clones résistants à l'ampicilline. Dans le protocole originel, la conjugaison s'effectue en déposant la même quantité de chaque partenaire en contact sur la boîte de conjugaison. En diminuant la proportion de souche donatrice (*E. coli*) à 1 donatrice pour 10 réceptrices, je suis parvenu à augmenter de manière notable l'efficacité du système en réduisant à 20% la proportion de transconjugants résistants à l'ampicilline. Cette amélioration du rendement, bien qu'appréciable, n'était cependant pas suffisante étant donné que cette technique exige d'analyser un très grand nombre de clones. Pour obtenir une efficacité proche de 100%, j'ai décidé de modifier le plasmide porteur du miniTn5-GGm. J'ai cloné le gène *sacB* (issu du plasmide pDS132, Philippe et coll 2004), dans le pUT portant le miniTn5-GGm. Le gène *sacB* code une levane-saccharase dont l'expression chez de nombreuses bactéries à Gram négatif comme *D. dadantii* rend la présence de saccharose dans le milieu toxique pour la bactérie. Ainsi l'ajout du saccharose dans le milieu de sélection permet de contre-sélectionner les transconjugants ayant maintenu le plasmide pUT. Grâce à cette optimisation près de 100% des clones résistants à la gentamycine issus de la conjugaison sont sensibles à l'ampicilline et donc ne contiennent que le miniTn5-GGm inséré dans leur chromosome.

2. Optimisation de la localisation des insertions

Au sein du laboratoire la localisation des insertions aléatoires de transposon s'effectue en routine par PCR inverse. Cette technique nécessitant l'extraction et la manipulation de l'ADN génomique, je l'ai écartée au profit d'une technique plus rapide, qui convient tout particulièrement à la localisation de nombreuses insertions du même élément : la TAIL PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, Liu et Whittier 1995). En effet, la première réaction de PCR s'effectuant directement à partir d'une colonie, cette technique nous permet de nous affranchir des étapes d'extraction et de manipulation de l'ADN, particulièrement consommatrice de temps lorsqu'il s'agit d'un nombre élevé de souches à cribler. Après avoir amplifié les séquences flanquantes à l'aide des 3 réactions de PCR consécutives, celles-ci sont clonées dans un plasmide et envoyées en séquençage. Cette technique se base sur l'utilisation d'amorces spécifiques de l'élément inséré (ici le miniTn5) possédant un TM élevé et d'une amorce dégénérée possédant un TM faible. En jouant sur les températures d'hybridation il est alors possible d'amplifier les séquences adjacentes au miniTn5. Les amorces spécifiques du miniTn5 permettent ensuite d'effectuer des PCR gigogne pour augmenter la spécificité du produit amplifié. J'ai testé trois amorces dégénérées :

-AD1 NTCGASTWTSWGTT
 -AD2 NGTCGASWGANAWGAA
 -AD3 WGTGNAGWANCANAGA

L'amorce dégénérée donnant le moins d'amplifications aspécifiques dans nos conditions, et donc la plus satisfaisante, est AD2. Les trois amorces spécifiques du miniTn5-GGm sont décrites dans la matériel et méthode et la position de leur hybridation est notée sur la figure 27.

3. Crible de la mutagenèse au mini Tn5-GGm

Afin d'identifier des gènes dont l'expression varie en fonction de la présence d'OPG, nous avons effectué une mutagenèse sur la souche NFB3835 à l'aide du miniTn5-GGm. Cette technique permet de créer des fusions transcriptionnelles de manière aléatoire. Le gène *uidA* présent sur le miniTn5-GGm code la β -glucuronidase. Le substrat chromogène de cette enzyme est le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronic acid (X-Gluc). Le clivage de ce dernier sous l'action de la β -glucuronidase produit un précipité bleu et insoluble qui confère une coloration bleue. L'intensité de la coloration bleue de chaque colonie rend compte du niveau d'expression du gène rapporteur *uidA*. Pour rappel, la souche NFB3835 synthétise des OPG en présence d'arabinose et n'en synthétise pas en son absence. Suite à la mutagenèse au miniTn5-GGm, nous avons donc recherché les clones dont l'intensité de la coloration bleue sur un milieu contenant du X-gluc variait en présence ou non d'arabinose (Figure 28).



Figure 28 : Exemple de différence d'activité β -glucuronidase sur boîte. La souche NFB3837 a été repiquée sur boîte de milieu 63 + glycérol (2 g.L^{-1}) + arabinose (2 g.L^{-1}) + X-gluc (A) et sur boîte de milieu 63 + glycérol (2 g.L^{-1}) + X-gluc (B). Les photos ont été prises après 24H d'incubation à 30°C .

Quatre conjugaisons indépendantes ont été effectuées, permettant de générer au total 1300 clones. Le phénotype β -glucuronidase de ces 1300 clones a été analysé sur boîte. Parmi ces 1300 clones, 53 présentent une activité β -glucuronidase différente en présence d'OPG (milieu contenant de l'arabinose) et en absence d'OPG (milieu ne contenant pas d'arabinose). Cependant, les différences d'activité observées sur boîte peuvent être le résultat de l'ajout de

l'arabinose dans le milieu ou d'une différence de croissance, et être donc indépendante de la présence ou non d'OPG. Afin de vérifier que ces 53 fusions aléatoires créées lors de la mutagenèse répondent bien aux OPG, ces insertions ont été transduites dans la souche sauvage EC3937 et dans la souche *opgG* NF3723. L'activité β -glucuronidase des différentes fusions a ensuite été dosée dans ces deux contextes génétiques. Ici, ne seront présentées que les insertions présentant des différences d'activité β -glucuronidase significatives entre les deux contextes génétiques. De plus et faute de temps, l'activité β -glucuronidase a également été dosée dans un contexte *opgG* Δ *rscCDB* et dans un contexte Δ *rscCDB* pour certaines insertions seulement afin de déterminer si le phosphorelais RcsCD-RcsB est impliqué dans ces différentes régulations.

II. Fusions transcriptionnelles sensibles à la présence d'OPG

1. Insertion II84 : ABF-0046981 *gnd*

L'activité β -glucuronidase de la fusion II84 est en moyenne 3,9 fois plus importante en absence d'OPG par rapport à l'activité de la fusion dans un contexte sauvage (Figure 29). Cette activité revient à un niveau sauvage dans le contexte *opgG* Δ *rscCDB*. L'activité β -glucuronidase de la fusion II84 dans le contexte Δ *rscCDB* est semblable à l'activité observée dans le contexte sauvage et dans le contexte *opgG* Δ *rscCDB*. L'expression du gène dans lequel est inséré le miniTn5-GGm est donc activée en réponse à l'absence d'OPG. De plus cette activation nécessite la présence du système RcsCD-RcsB. Il apparaît donc que l'activation de la fusion II84 due à l'absence d'OPG résulte de l'activation du système RcsCD-RcsB.

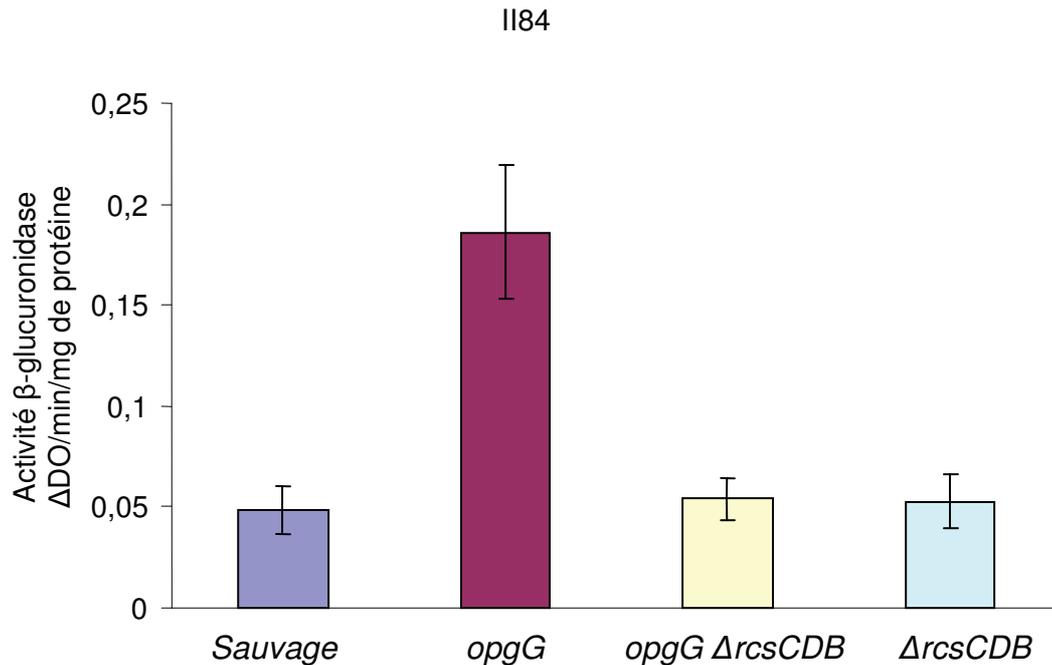


Figure 29 : Activité β-glucuronidase de la fusion II84 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG ΔrcsCDB* et $\Delta rc sCDB$. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

Cette insertion se situe environ 100 nucléotides après la fin de la phase codante du gène *gnd*. Chez *E. coli* le terminateur se situe à environ 150 nucléotides de la fin de la phase codante. Le miniTn5-GGm semble donc être inséré avant le terminateur de transcription du gène *gnd* et crée une fusion transcriptionnelle avec ce gène (Figure 30). Ce gène code la 6-phosphogluconate déshydrogénase impliquée dans la voie des pentoses phosphate. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Lors de l'étude du protéome soluble de *D. dadantii*, la protéine Gnd avait été identifiée comme étant surexprimée chez le mutant *opgG* (Bouchart et coll. 2007). Les résultats obtenus confirment donc l'observation effectuée lors de cette étude.

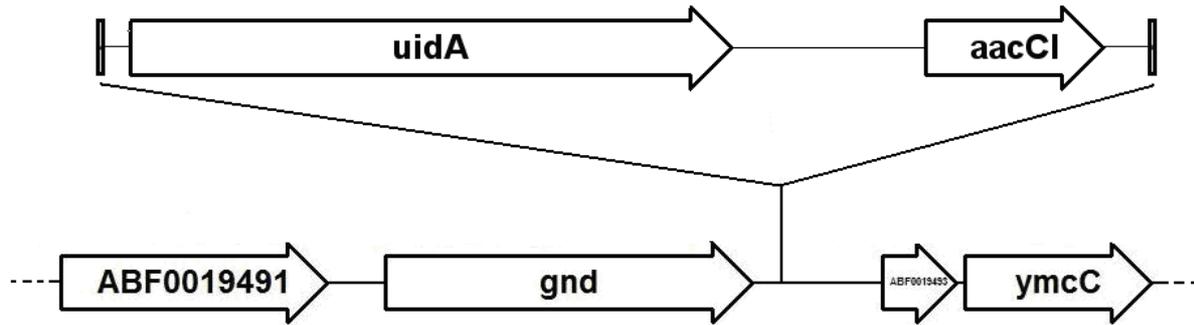


Figure 30 : Localisation de l'insertion II84 du miniTn5-GGm.

2. Insertion V84 : ABF-0014778 GTP cyclohydrolase de type II

L'activité β -glucuronidase de la fusion V84 est en moyenne 3,7 fois plus importante en absence d'OPG par rapport à l'activité de la fusion dans un contexte sauvage (Figure 31). Le double mutant *opgG* Δ *rcsCDB* présente une activité β -glucuronidase comparable à la souche sauvage et à la souche Δ *rcsCDB*. L'expression du gène dans lequel est inséré le miniTn5-GGm est donc activée en réponse à l'absence d'OPG. De plus, cette activation nécessite la présence du système RcsCD-RcsB. L'activation de la fusion V84 due à l'absence d'OPG résulte donc de l'activation du système RcsCD-RcsB.

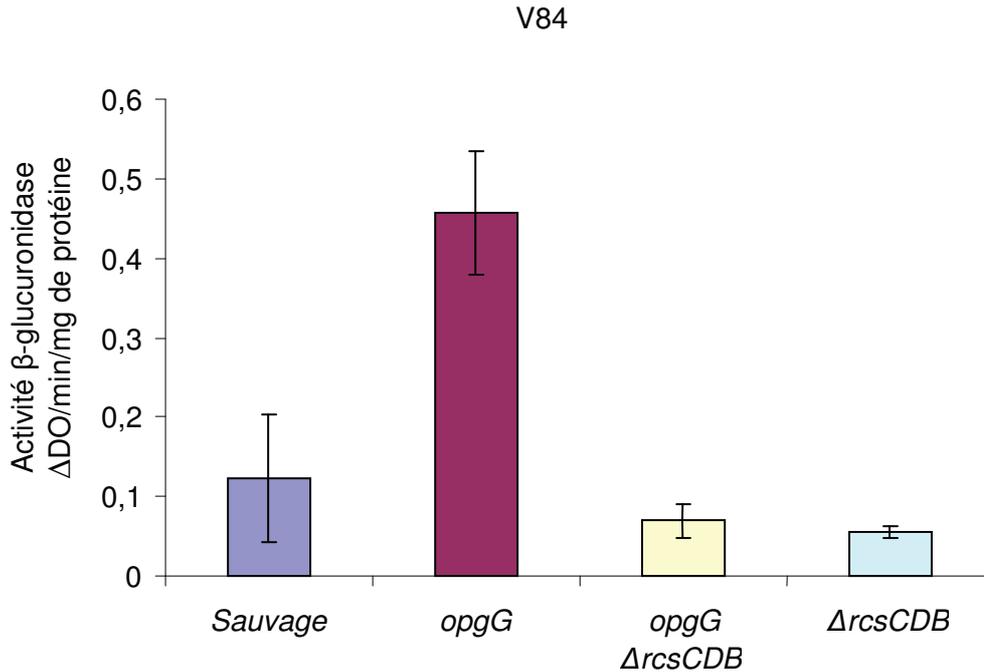


Figure 31 : Activité β-glucuronidase de la fusion V84 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ*rcsCDB* et Δ*rcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNP. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

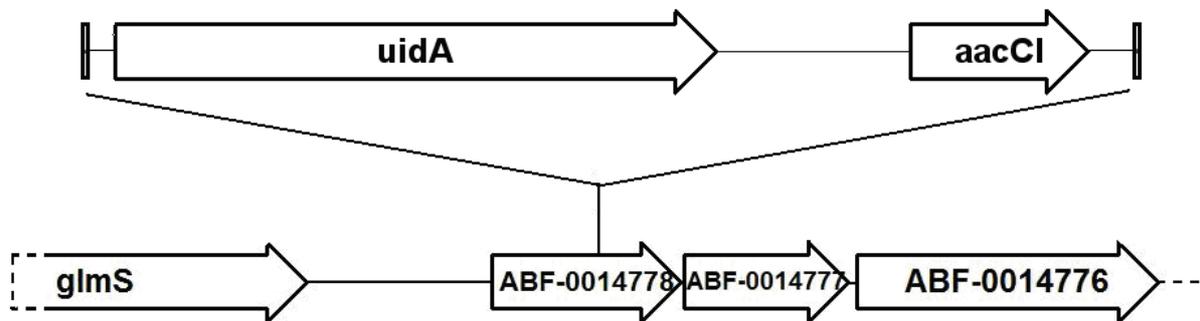


Figure 32 : Localisation de l'insertion V84 du miniTn5-GGm

L'insertion V84 du miniTn5-GGm se situe au niveau d'un gène inconnu ABF-0014778 (Figure 32). L'analyse de la séquence par bioinformatique montre que cette ORF pourrait coder une protéine de la famille des GTP cyclohydrolases de type II. Ces enzymes catalysent la conversion du GTP en 2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate (APy) + pyrophosphate + formate. Ce produit (APy) est un intermédiaire utilisé pour la synthèse de la riboflavine. Chez *E. coli*, le gène *ribA* code la GTP cyclohydrolase de type II (Richter et coll. 1993). Un mutant *ribA* est auxotrophe pour la riboflavine. Cependant le clone V84 est capable de pousser sur un milieu minimum. En effet le gène *ribA* est également

présent dans le génome de *D. dadantii*. Les protéines RibA de *D. dadantii* et d'*E. coli* présentent 90% d'identités. L'alignement de la séquence protéique de RibA de *D. dadantii* et de la séquence protéique putative de l'ORF ABF-0014778 montre une identité de 45%. Il semblerait donc que l'ORF ABF-0014778 provienne d'une duplication du gène *ribA*. Chez *Streptomyces coelicolor*, trois paralogues de *ribA* ont été étudiés (Spoonamore et coll. 2006). Ils montrent que ces trois enzymes utilisent bien le GTP comme substrat mais que le produit final peut être différent. Ainsi, en se basant sur l'analogie avec le système Tox de *Burkholderia glumae* (synthèse de la toxoflavine), ils suggèrent que l'ORF SCO2687 pourrait participer à la synthèse d'une toxine par *S. coelicolor*. Or, des trois homologues étudiés chez cet organisme, l'ORF SCO2687 est la plus proche de l'ORF ABF-0014778 de *D. dadantii*. De plus, l'ORF ABF-0014778 se situe au sein d'un opéron de 4 gènes, les trois autres gènes étant inconnus. Cet opéron se situe au niveau d'un locus de plusieurs opérons également inconnus. Parmi les gènes putatifs de ce locus on retrouve des homologues du système Tox de *B. glumae* ainsi que des gènes pouvant coder un transporteur et des régulateurs. La protéine codée par l'ORF ABF-0014778 pourrait donc être impliquée dans la synthèse d'une toxine.

3. Insertion IV53 : ABF-0016070 *untM*

En absence d'OPG, l'activité β -glucuronidase de la fusion IV53 est augmentée en moyenne d'un facteur 2,2 (Figure 33). L'absence du système RcsCD-RcsB diminue l'activité β -glucuronidase de la fusion IV53 dans les contextes sauvage (Facteur 5) et *opgG* (Facteur 2). Dans le contexte *ΔrcsCDB*, l'absence d'OPG augmente l'activité β -glucuronidase de la fusion IV53 d'un facteur 6. L'expression du gène dans lequel est inséré le miniTn5-GGm est donc activée en réponse à l'absence d'OPG. De plus, ce gène est activé par le système RcsCD-RcsB. Un autre partenaire intervient probablement dans la régulation de ce gène puisque l'absence d'OPG active l'expression de la fusion en absence du système RcsCD-RcsB. Ce partenaire pourrait être un autre système à deux composants activateur de la fusion IV53 qui comme le système RcsCD-RcsB est activé en absence d'OPG. On observe que le facteur d'induction dû à l'absence d'OPG est d'ailleurs plus important dans le contexte *ΔrcsCDB* que dans le contexte sauvage. Or en absence d'OPG, le système RcsCD-RcsB est activé. Sachant que le système RcsCD-RcsB active la fusion, le facteur d'induction de l'expression de la fusion en absence d'OPG devrait être moins important en absence du système RcsCD-RcsB. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

L'expression de la fusion IV53 a atteint son maximum dans le contexte *opgG*. De ce fait, le facteur d'induction observé entre les contextes sauvage et *opgG* ne représente pas la somme des effets de l'activation des 2 partenaires mais simplement la différence entre l'expression maximale de la fusion et le niveau d'expression dans le contexte sauvage.

Une autre hypothèse est que ce soit la forme non phosphorylée de RcsB qui active l'expression de la fusion. Ainsi, en absence d'OPG, la proportion de RcsB non phosphorylé est diminuée ce qui entraîne une diminution de l'expression de la fusion. Cet effet serait compensé par un autre partenaire qui active l'expression de la fusion. Il en résulte une augmentation de l'expression de la fusion. En absence de la protéine RcsB, l'absence d'OPG provoque donc une augmentation de l'expression de la fusion plus importante que dans un contexte sauvage. Et dans le contexte *opgG*, l'absence de RcsB diminue l'expression de la fusion. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de tester l'expression de cette fusion dans le contexte *rscC2* ou dans un contexte *rscB* non phosphorylable.

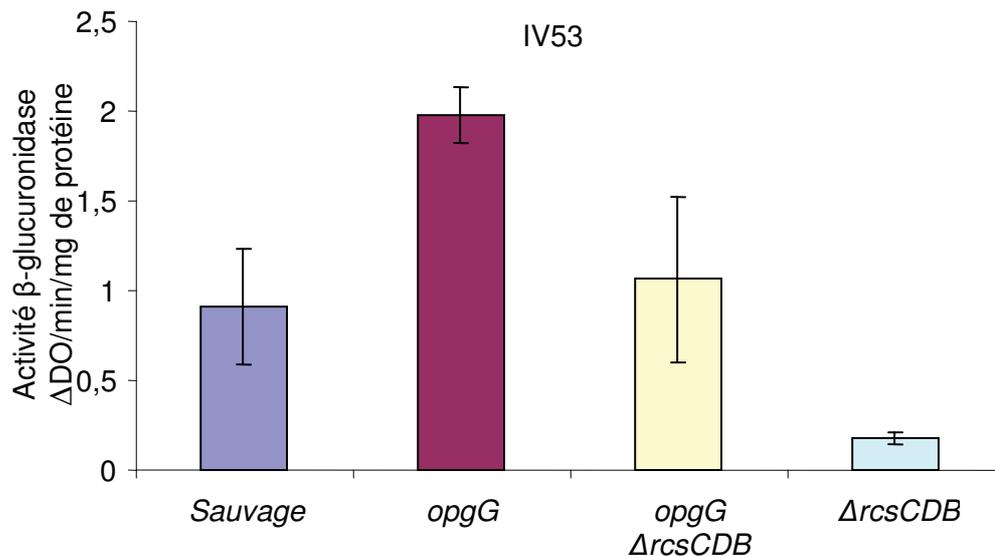


Figure 33 : Activité β-glucuronidase de la fusion IV53 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ*RcsCDB* et Δ*RcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

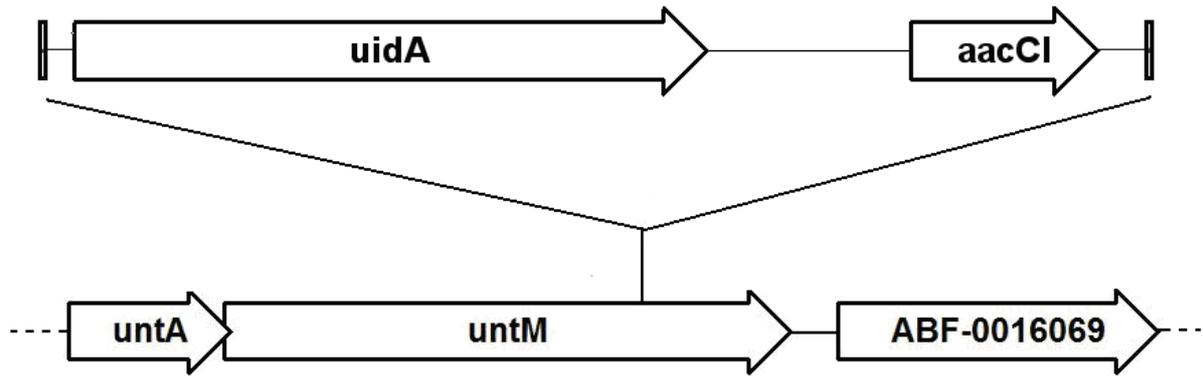


Figure 34 : Localisation de l'insertion IV53 du miniTn5-GGm.

L'insertion IV53 du miniTn5-GGm se situe au niveau du gène *untM* codant un élément d'un transporteur de type ABC qui pourrait être une pompe à efflux participant à la résistance aux peptides antimicrobiens (Figure 34). Il est localisé au niveau d'un îlot de pathogénie comprenant notamment les gènes codant les protéines de la biosynthèse de l'indigoïdine (Reverchon et coll. 2002) et les gènes *pecS* et *pecM* dont les produits sont impliqués dans la régulation de facteurs de virulence tels que les pectates lyases (Praillet et coll. 1997, Nasser et coll.2005). Il a été montré que le gène *untM* est induit en réponse à l'expression du régulateur HrpY, bien que UntM ne participe pas au système de sécrétion de type III Hrp (Yap et coll. 2008). Ce système (HrpX-HrpY) semble donc être un bon candidat pour être le second partenaire intervenant dans la régulation du gène *untM* par les OPG.

4. Insertion I20 et insertion 60 : ABF-0020341 *sttC* et ABF-0020342 *sttD*

L'activité β -glucuronidase de ces deux fusions transcriptionnelles est augmentée en absence d'OPG. Le facteur d'induction est semblable pour ces deux insertions c'est à dire 1,8 pour I20 et 1,7 pour 60. La relation entre cette activation et le système RcsCD-RcsB n'a pas été testée pour l'insertion I20. En ce qui concerne l'insertion 60, on observe que l'activité β -glucuronidase du double mutant *opgG* Δ *rscCDB* est comparable à celle dans un contexte *rscCDB* et dans un contexte sauvage (Figure 35 et 36).L'expression des deux gènes dans lesquels sont insérés les miniTn5-GGm est donc activée en réponse à l'absence d'OPG. De plus l'activation de la fusion 60 due à l'absence d'OPG résulte de l'activation du système RcsCD-RcsB.

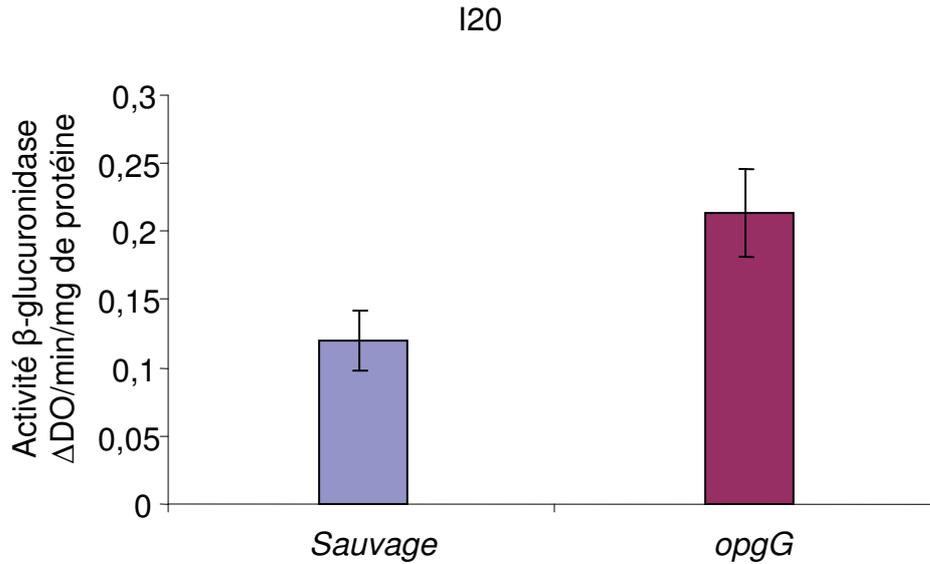


Figure 35 : Activité β-glucuronidase de la fusion I20 dans un contexte sauvage, et *opgG*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

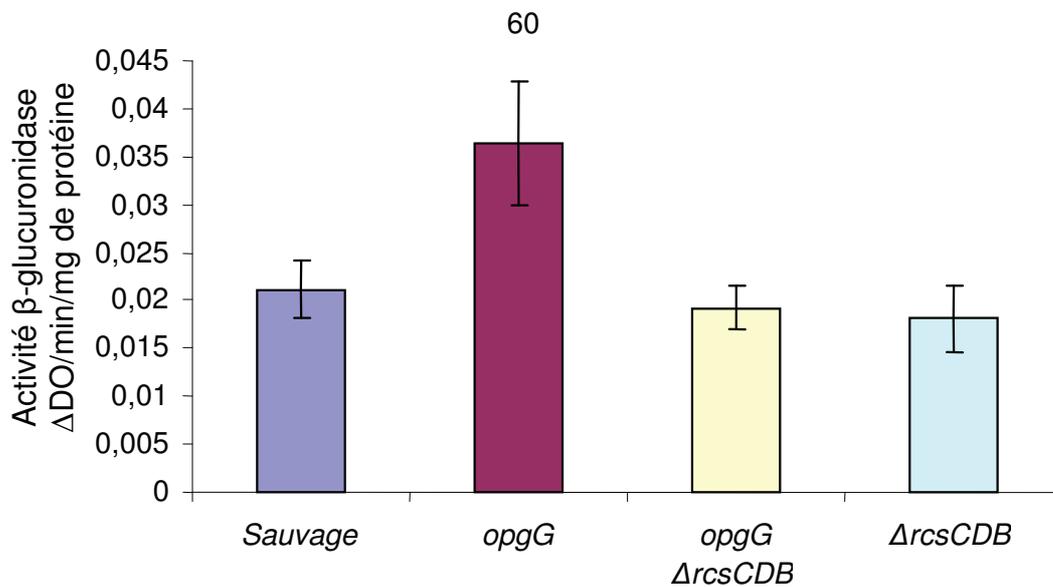


Figure 36 : Activité β-glucuronidase de la fusion 60 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ*RcsCDB* et Δ*RcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

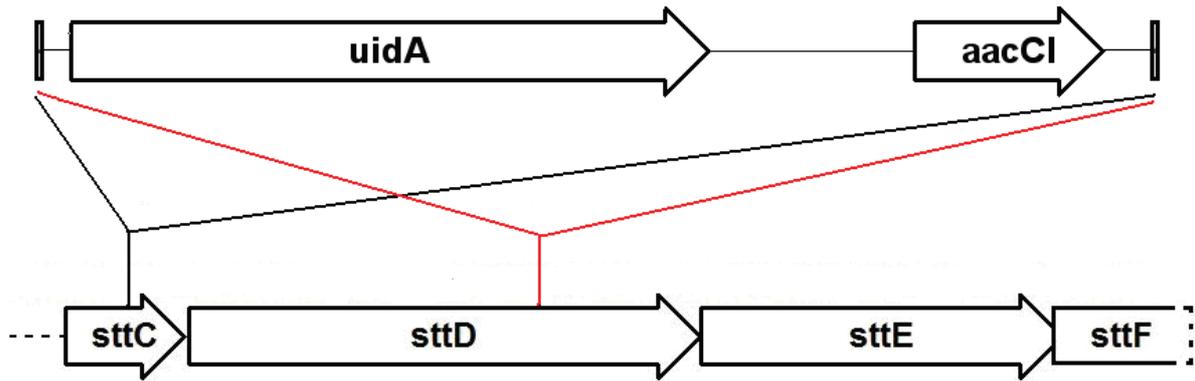


Figure 37 : Localisation des insertions I20 (en noir) et 60 (en rouge) du miniTn5-GGm.

Les insertions I20 et 60 se situent respectivement au sein des ORF ABF-0020341, *sttC*, et ABF-0020342, *sttD* (Figure 37). Ces deux gènes appartiennent au même opéron décrit récemment par Ferrandez et Condemine (2008). Ceci explique le même niveau d'activation des deux insertions en absence des OPG. L'opéron *stt* (Second Type Two) code un deuxième système de sécrétion de type II. Celui-ci est responsable de la localisation de la protéine PnlH (une pectine lyase dont le rôle reste encore à déterminer) du côté externe de la membrane externe. La protéine SttD est une sécrétine qui forme le pore du système de sécrétion au sein de la membrane externe. SttC est une protéine périplasmique qui participe à la stabilisation du complexe protéique.

5. Insertion 56 : à localiser

En absence d'OPG, l'activité β -glucuronidase de la fusion 56 est augmentée en moyenne d'un facteur 3,9 (Figure 38). Il reste à déterminer si le système RcsCD-RcsB intervient dans l'activation de l'expression de cette fusion due à l'absence d'OPG. De même, il reste à localiser cette insertion.

56

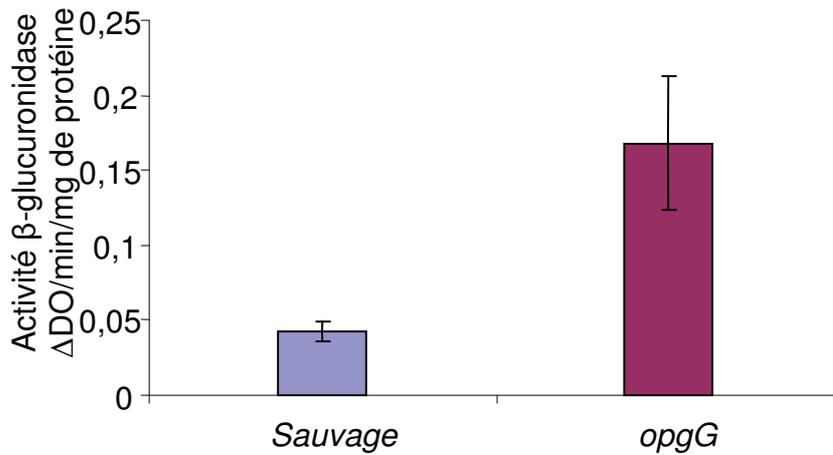


Figure 38 : Activité β-glucuronidase de la fusion 56 dans un contexte sauvage et *opgG*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

6. Insertion 77 : à localiser.

En absence d'OPG, l'activité β-glucuronidase de la fusion 77 est environ 2 fois plus élevée (Figure 39). Cette augmentation est abolie en absence du système RcsCD-RcsB, l'activité β-glucuronidase de la fusion 77 du double mutant *opgG ΔRcsCDB* est comparable à celle dans un contexte *ΔrcsCDB* et dans un contexte sauvage. L'expression de la fusion 77 augmente donc en réponse à l'absence d'OPG. De plus, cette augmentation d'expression est due à l'activation du système RcsCD-RcsB. Cette fusion reste à localiser.

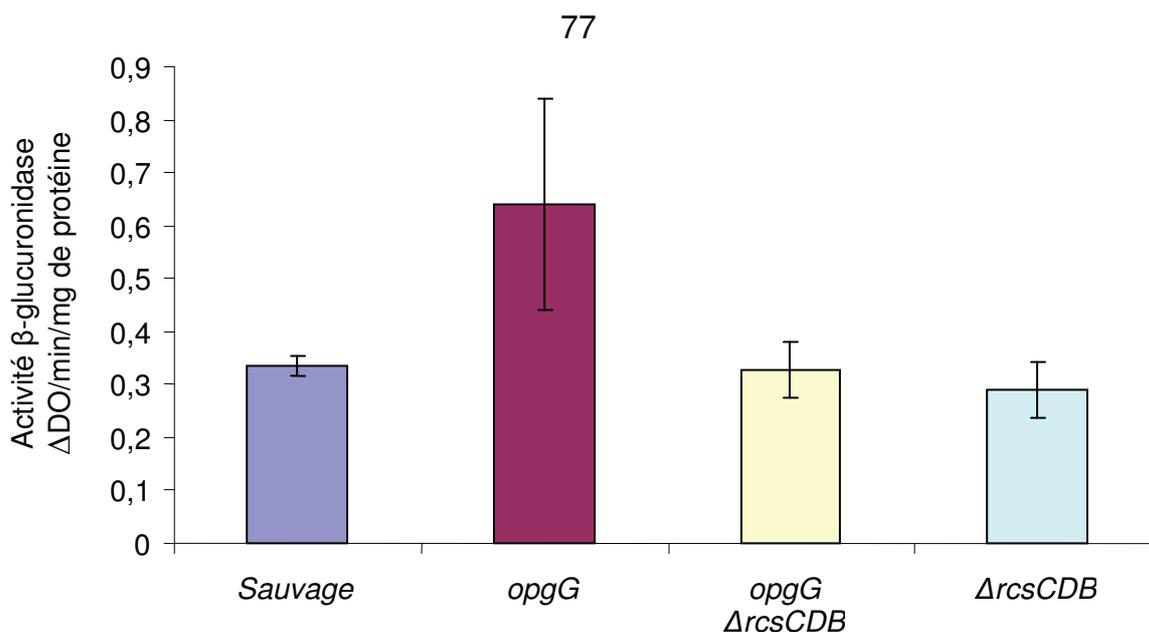


Figure 39 : Activité β-glucuronidase de la fusion 77 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ*RcsCDB* et Δ*RcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β-glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéine.

7. Insertion V28 : ABF-0015071

L'activité β-glucuronidase de la fusion V28 est environ 5 fois plus faible en absence d'OPG (Figure 40). Dans le contexte Δ*RcsCDB*, l'absence d'OPG réprime également l'expression de la fusion mais de manière moins importante (facteur 2,8). On observe une augmentation de l'expression de la fusion d'un facteur 1,5 entre le contexte sauvage et le contexte Δ*RcsCDB*, et d'un facteur 2,8 entre le contexte *opgG* et le contexte *opgG* Δ*RcsCDB*. L'expression du gène dans lequel est inséré le miniTn5-GGm est donc réprimée en absence d'OPG. Une partie de cette répression est due à l'activation du système RcsCD-RcsB. Cela indique donc qu'un autre partenaire sensible à la présence d'OPG intervient dans la régulation de ce gène.

Le miniTn5-GGm est inséré au sein de l'ORF ABF-0015071 (Figure 41). Ce gène est inconnu. L'analyse bioinformatique de la séquence protéique montre la présence de deux domaines putatifs : Un domaine ribokinase (InterPro IPR011877) et un domaine HTH DeoR-like (InterPro IPR011877). Il semble donc que la protéine codée par ce gène pourrait intervenir dans le métabolisme.

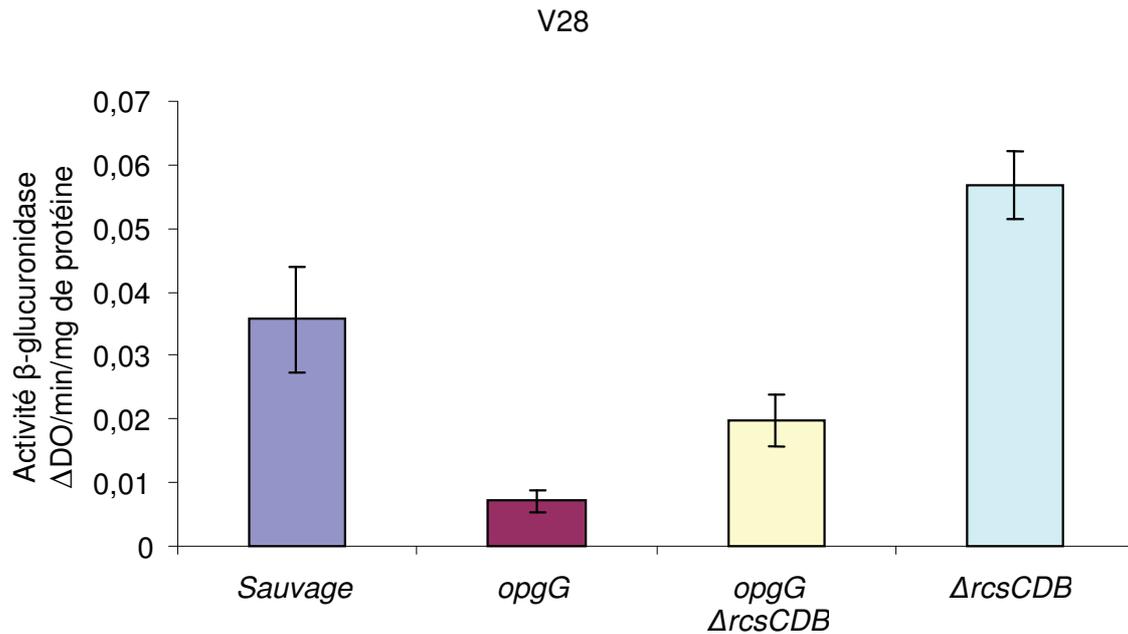


Figure 40 : Activité β -glucuronidase de la fusion V28 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ *RcsCDB* et Δ *RcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNP. L'activité est exprimée en Δ DO/min/mg de protéine.

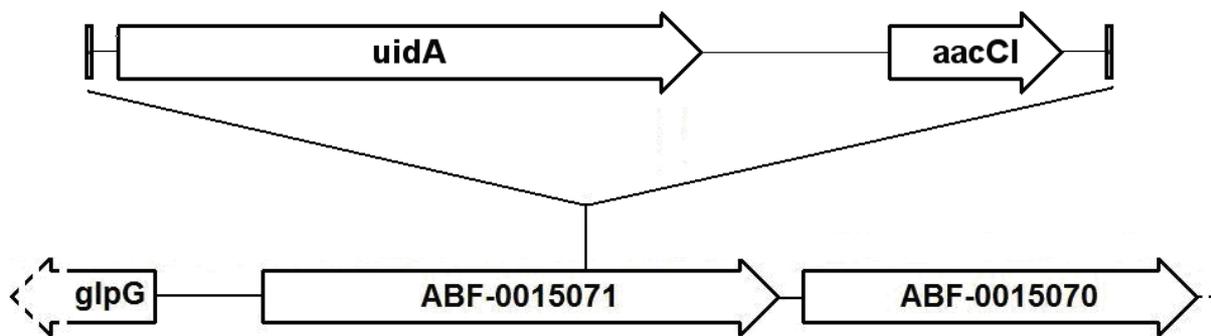


Figure 41 : Localisation de l'insertion V28 du miniTn5-GGm.

8. Insertion 62 : en amont de ABF-0046577 *yniA*

L'activité β -glucuronidase de la fusion 62 est en moyenne 1,7 fois plus faible en absence d'OPG (Figure 42). L'activité β -glucuronidase de cette fusion au sein du double mutant *opgG* Δ *RcsCDB* est encore plus faible. En effet, elle diminue d'un facteur 2,2 par rapport à la souche *opgG* et d'un facteur 3,8 par rapport à la souche sauvage. L'activité β -glucuronidase de ce double mutant est semblable à celle du simple mutant Δ *RcsCDB*. Cette fusion répond

donc négativement à l'absence d'OPG. De plus, en absence du système RcsCD-RcsB, l'expression de la fusion est très faible, que ce soit en présence ou absence d'OPG. Ceci indique que le système RcsCD-RcsB joue un rôle activateur sur la fusion. En absence d'OPG, le système RcsCD-RcsB est activé. La baisse d'expression de la fusion 62 en absence d'OPG s'expliquerait par le fait que ce soit la forme non phosphorylée de RcsB qui active la fusion. En absence d'OPG, il y a moins de RcsB non phosphorylé ce qui entraîne une chute du niveau d'expression de la fusion. En absence de la protéine RcsB, il n'y a pas d'activation de la fusion, le niveau d'expression est donc très faible et dans ce contexte l'absence d'OPG n'influence pas l'expression de la fusion. L'étude de l'activité β -glucuronidase de la fusion dans un contexte *rscC2* ou dans un contexte *rscB* non phosphorylable pourrait confirmer cette hypothèse.

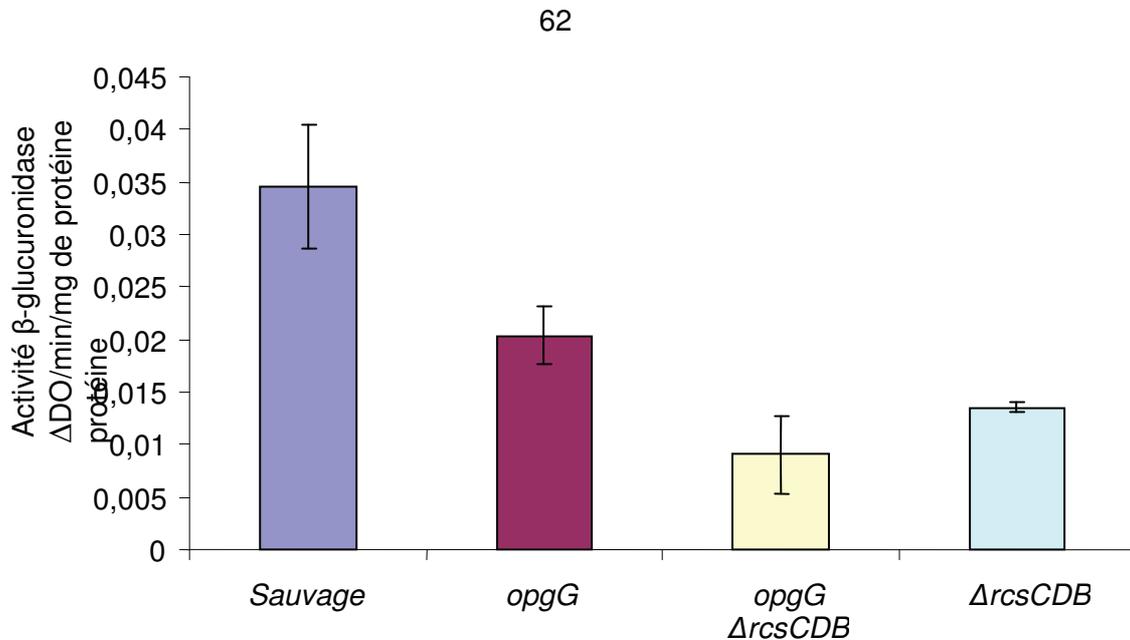


Figure 42 : Activité β -glucuronidase de la fusion 62 dans un contexte sauvage, *opgG*, *opgG* Δ *RcsCDB* et Δ *RcsCDB*. Les dosages ont été effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en milieu LB en phase stationnaire. Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucuronidase est le PNPU. L'activité est exprimée en Δ DO/min/mg de protéine.

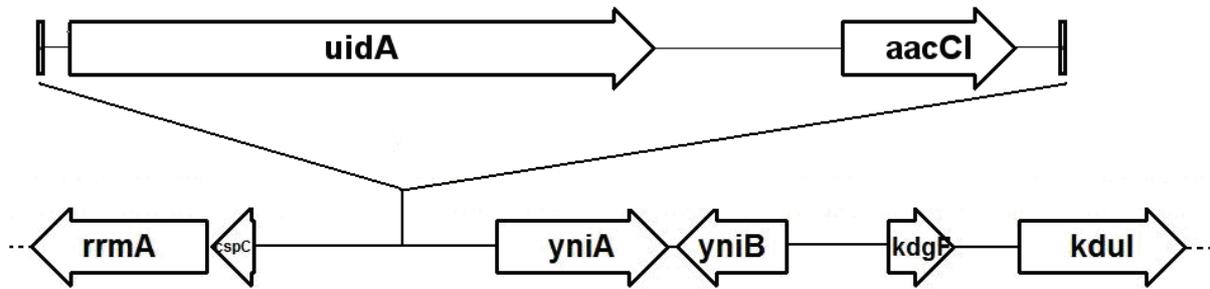


Figure 43 : Localisation de l'insertion 62 du miniTn5-GGm

Le miniTn5-GGm est inséré dans une région située entre les gènes *cspC* et *yniA* (Figure 43). Cette région ne semble pas conservée. Il est possible que le miniTn5-GGm soit inséré en aval d'un promoteur permettant la transcription de *yniA*. L'activité β -glucuronidase de la fusion 62 rendrait donc compte du niveau d'expression de *yniA*. YniA serait une fructosamine kinase. La fonction de cette protéine est encore floue. Elle serait impliquée soit dans la réparation de protéines, soit dans la détoxification de composés nocifs pour la bactérie (Gemayel et coll. 2007).

III. Bilan

La construction d'une souche de *D. dadantii* dans laquelle la synthèse des OPG est contrôlée nous a permis de trouver des gènes dont l'expression est influencée par l'absence d'OPG. En effet, la souche NFB3835 ne produit des OPG qu'en présence d'arabinose. En tout, 1300 fusions transcriptionnelles aléatoires ont été créées par mutagenèse sur cette souche en utilisant le miniTn5-GGm. 53 clones présentent une activité β -glucuronidase différente en présence d'OPG (boîte contenant l'arabinose) et en absence d'OPG (boîte ne contenant pas d'arabinose). Ces 53 fusions ont été transduites dans les contextes sauvage et *opgG*. Au final, 9 fusions répondants spécifiquement à l'absence d'OPG ont été isolées (Tableau 6). La majorité de ces fusions (7) sont activées en absence d'OPG. La même observation avait été effectuée lors de l'étude du protéome soluble d'une souche *opgG* de *D. dadantii*. En effet, 44 protéines avaient été identifiées comme étant surexprimées dans la souche *opgG*. Et seulement 8 protéines étaient sous exprimées (Bouchart et coll. 2007). Parmi les 7 fusions localisées, une seule concerne un gène déjà identifié (*gnd*) comme étant influencé par l'absence d'OPG lors de l'étude protéomique. Ce travail complète donc l'étude effectuée par Bouchart et coll. On observe que l'absence d'OPG touche différentes fonctions cellulaires.

L'absence d'OPG entraîne l'activation du système RcsCD-RcsB. Cette activation conduit à une augmentation de la proportion de RcsB phosphorylé ce qui modifie l'expression de

gènes cibles. Sur les 9 fusions étudiées, 7 ont été testées dans un contexte $\Delta RcsCDB$. On observe que 5 fusions ne sont plus sensibles à l'absence d'OPG dans le contexte $\Delta RcsCDB$. Dans ce cas, le changement d'expression de ces fusions en absence d'OPG résulte donc de l'activation du système RcsCD-RcsB. L'analyse par bioinformatique des différentes séquences a permis de détecter une boîte *rscB* putative en amont du promoteur putatif de l'ORF ABF-0014778 (fusion V84). Les autres séquences ne semblent pas présenter de motif proche du consensus décrit par Davalos-Garcia et coll. Deux fusions (IV53 et V28) continuent à répondre à l'absence d'OPG dans le contexte $\Delta RcsCDB$. Le changement d'expression de ces fusions en absence d'OPG résulte donc vraisemblablement de l'activation d'un autre partenaire que le système RcsCD-RcsB. Cependant, pour ces deux fusions, on observe que le système RcsCD-RcsB est également impliqué dans leur régulation. De plus, on peut noter que les fusions IV53 et 62 semblent être sous le contrôle de la forme non phosphorylée de RcsB. De la même manière, chez *Salmonella* l'expression du gène *spvA* est activée par la forme non phosphorylé de RcsB (Mariscotti et Garcia-del Portillo, 2009).

Cette étude confirme l'influence des OPG sur l'activité du système RcsCD-RcsB. En effet, pour chaque fusion testée, une partie voire la totalité du changement du niveau d'expression dû à l'absence d'OPG est imputable à l'activation du système RcsCD-RcsB. Cependant il apparaît qu'au moins un partenaire autre que le système RcsCD-RcsB réagisse à l'absence d'OPG. L'identification de ce(s) partenaire(s) permettrait de mieux comprendre le rôle des OPG. En effet, contrairement aux OPG, le système RcsCD-RcsB n'est présent que chez les entérobactéries. De plus, chez *E. coli* il a été proposé que les OPG pourraient être perçus par le système à deux composants EnvZ-OmpR (Fiedler et Rotering 1998). Le gène *untM* fait partie des gènes dont l'expression est modifiée par l'absence d'OPG par l'intermédiaire d'un autre partenaire que le système RcsCD-RcsB. Ce partenaire pourrait être un régulateur d'un système à deux composants. En effet, il a été montré que ce gène est activé par le régulateur HrpY (Yap et coll. 2008). De plus ce gène est situé dans un îlot de pathogénie qui contient deux gènes codant un système à deux composants non décrit qui pourrait intervenir dans la régulation de *untM*. Il serait intéressant de construire des mutants de ce système à deux composants et du système HrpX-HrpY. Nous pourrions doser l'expression de la fusion *untM::uidA* dans ces deux contextes en présence et en absence d'OPG. Ainsi nous pourrions déterminer l'implication de l'un ou l'autre des systèmes dans la modification du niveau d'expression du gène *untM* en absence d'OPG.

Tous ces résultats valident la démarche utilisée pour identifier des gènes cibles des OPG. L'étude d'un plus grand nombre de clones issus de la mutagenèse aléatoire au miniTn5-GGm

permettra probablement d'identifier d'autres gènes cibles des OPG. Il serait également intéressant d'effectuer la même démarche dans un contexte *ΔrcsCDB*. Ceci permettra d'identifier des gènes répondant à l'absence d'OPG indépendamment du système RcsCD-RcsB dans le but d'identifier de nouveaux partenaires aux OPG.

Tableau 6 : Récapitulatif des observations sur les fusions miniTn5-GGm isolées.

Numéro de fusion	Localisation	Réponse à l'absence d'OPG (facteur)	Réponse méditée par	Fonction
II84	ABF-0046981 <i>gnd</i>	Activée (3,9)	RcsCD-RcsB	Métabolisme
V84	ABF-0014778	Activée (3,7)	RcsCD-RcsB	Synthèse de toxine ?
IV53	ABF-0016070 <i>untM</i>	Activée (2,2)	RcsCD-RcsB + HrpX-HrpY ?	Transport
I20	ABF-0020341 <i>sttC</i>	Activée (1,8)	ND	Transport
60	ABF-0020342 <i>sttD</i>	Activée (1,7)	RcsCD-RcsB	Transport
56	ND	Activée (3,9)	ND	ND
77	ND	Activée (1,9)	RcsCD-RcsB	ND
V28	ABF-0015071	Réprimée (5)	RcsCD-RcsB + ?	Métabolisme
62	ABF-0046577 <i>yniA</i>	Réprimée (1,7)	RcsCD-RcsB	Réparation de protéines ou détoxification

Résultats :

Partie D. Inactivation de gènes codant des régulateurs de systèmes à deux composants

D. Inactivation de gènes codant des régulateurs de systèmes à deux composants.

Afin de pouvoir tester l'éventuelle relation entre les OPG et un système à deux composants autre que le système RcsCD-RcsB, nous avons initié la construction de souches de *D. dadantii* mutées au niveau de gènes codant des régulateurs de systèmes à deux composants. Nous avons choisi de muter les gènes codant les régulateurs afin de minimiser les réactions croisées. Bien souvent, le capteur d'un système à deux composants possède une activité phosphatase. Or la présence de cette activité phosphatase permet de limiter les réactions croisées. En effet, de nombreux régulateurs peuvent être phosphorylé par l'acétyl phosphate et sans activité phosphatase, les interprétations de phénotypes associés à une mutation d'un gène codant un capteur peuvent être erronées. De même, il a été montré que l'absence d'un capteur permet la phosphorylation de son régulateur par un capteur qui, dans des conditions physiologiques, ne lui est pas associé (Bijlsma et Groisman. 2003).

Le gène *uvrY* code le régulateur du système à deux composants BarA-UvrY. Des orthologues de ce système sont retrouvés chez *Salmonella enterica* (BarA-SirA), *Erwinia carotovora* (ExpS-ExpA), *Vibrio cholerea* (BarA-VarA), ou encore chez les *Pseudomonas* (GacS-GacA) (Heeb et Haas. 2001). De nombreuses études ont montré l'importance de ce système dans la virulence, aussi bien chez des pathogènes animaux que végétaux. Ainsi, une souche d'*E. coli* uropathogène muté au niveau de *uvrY* présente une faible capacité à croître au niveau du tractus urinaire de macaque (Tomenius et coll. 2006). Un mutant *gacA* de *Pseudomonas aeruginosa* voit sa virulence atténuée chez *Arabidopsis thaliana* et chez la souris (Rahme et coll. 1995). Chez *E. carotovora* subsp. *carotovora*, on observe également une forte diminution de la production d'exoenzymes (cellulases, pectinases, protéases) (Cui et coll. 2001). J'ai donc muté le gène *uvrY* de *D. dadantii* (ABF-0020512) par délétion et insertion de cassette (résistance à la kanamycine). Durant l'étude de ce mutant, deux articles portant sur l'effet de mutation nulle de *gacA* chez *D. dadantii* ont été publiés (Lebeau et coll. 2008, Yang et coll. 2008). Ceux-ci ont confirmé les résultats préliminaires obtenus. Dans un contexte sauvage l'absence de GacA provoque une diminution de la sécrétion des exoenzymes (cellulase, protéase, pectinase). De plus, on observe une diminution de la virulence. Le système BarA-UvrY est donc également un facteur de virulence important chez *D. dadantii*.

Deux autres gènes codant des régulateurs ont été mutés de la même manière (délétion et insertion de cassette conférant la résistance à la kanamycine). Les régulateurs putatifs codés par ces gènes (ABF-0046568 et ABF-0015810) n'ont à ce jour pas encore été caractérisés. L'étude préliminaire de ces clones n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative au niveau de la pathogénèse de *D. dadantii*.

Ce travail ne constitue qu'un début dans l'étude des systèmes à deux composants de *D. dadantii*. Chez cette bactérie, il existe 32 systèmes à deux composants (J.-P. Bohin communication personnelle). La construction de mutants de chacun des régulateurs présents chez *D. dadantii* permettra d'étudier leur implication dans la virulence et de déterminer si ceux-ci sont impliqués dans les phénotypes observés chez le mutant *opgG*.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

D. dadantii est une bactérie phytopathogène responsable de la formation de la pourriture molle chez de nombreuses plantes hôtes. La virulence de *D. dadantii* est associée à la synthèse et la sécrétion d'une batterie d'exoenzymes qui vont dégrader la paroi pecto-cellulosique et donc déstabiliser le tissu végétal. D'autres facteurs de virulences sont nécessaires à l'installation de la maladie. Parmi ceux-ci, on retrouve les OPG. De nombreuses études ont montré l'importance des OPG dans le processus infectieux de différentes bactéries (Bhagwat et coll. 2009, Bohin et Lacroix 2007, Fineran et coll. 2007, Loubens et coll. 1993, Mahajan-Miklos et coll. 1999). Les OPG sont des oligosaccharides présents dans le périplasme de la plupart des bactéries à Gram négatif. La quantité d'OPG présent dans le périplasme dépend de l'osmolarité du milieu. Plus l'osmolarité du milieu est faible plus la quantité d'OPG synthétisée est forte. Chez *D. dadantii*, la synthèse des OPG est assurée par le produit de deux gènes *opgGH* organisés en opéron. L'inactivation de l'un de ces deux gènes abolie la production d'OPG ce qui conduit à un phénotype pléiotrope. En effet, les mutants *opgG* de *D. dadantii* présentent une diminution de la motilité, une diminution de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes (cellulases, protéases et pectinases), une diminution de la résistance aux sels biliaires et une augmentation de la production d'exopolysaccharides se traduisant par un aspect muqueux des colonies. De plus, ces mutants sont complètement non-virulents sur tubercule de pomme de terre et feuille d'endive. On observe également que la coinoculation d'une souche sauvage et d'un mutant *opgG* ne lui permet pas de restaurer sa capacité à croître *in planta* (Page et coll. 2001). L'étude du protéome soluble d'une souche *opgG* a montré un profond changement dans la physiologie de la souche notamment l'induction d'une réponse au stress (Bouchart et coll. 2007). Il apparaît donc que la souche *opgG* est affectée au niveau de la perception de son environnement. Chez *E. coli*, il a été proposé que l'absence d'OPG pourrait être perçue par des systèmes à deux composants tel que EnvZ-OmpR et RcsCD-RcsB (Fiedler et Roterling 1988, Ebel et coll. 1997). De plus, plusieurs phénotypes d'une souche *opgG* pourraient être le résultat de l'activation constitutive du système à deux composants RcsCD-RcsB. La recherche de mutations suppressives du phénotype *Opg⁻* nous l'a confirmé. Ainsi, l'inactivation du système RcsCD-RcsB ou la baisse du niveau d'activation du système RcsCD-RcsB permettent de restaurer la plupart des phénotypes d'une souche *opgG*. Seule la virulence sur feuille d'endive n'est pas restaurée. Le tubercule de pomme de terre est un hôte plus permissif que la feuille d'endive qui présente

une plus grande résistance à l'infection par *D. dadantii*. Ainsi des mutants *tatC* de *D. dadantii* présente une diminution de la virulence uniquement sur feuille d'endive (Rodríguez-Sanz et coll. 2010). De même, la diminution de la virulence de mutants *hrp*, *sap* ou *pel* de *D. dadantii* est plus marquée sur feuille d'endive que sur tubercule de pomme de terre (López-Solanilla et coll. 2001). Les OPG sont donc un facteur de virulence très important puisque le mutant *opgG* est non virulent à la fois sur feuille d'endive et sur tubercule de pomme de terre. Le fait que les différentes mutations au niveau du système RcsCD-RcsB puissent restaurer à une souche *opgG* la capacité à infecter les tubercules de pomme de terre et non les feuilles d'endive indique que le bouleversement entraîné par l'absence d'OPG ne se limite pas au régulon RcsCD-RcsB.

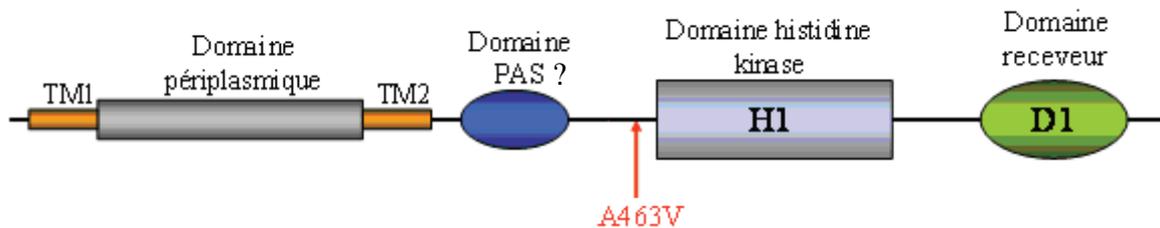


Figure 44: Schéma représentant les domaines de la protéine RcsC et la localisation de la mutation *rscC2*

Les études de complémentation nous ont montré que la mutation *rscC2* isolée diminue l'activité du système RcsCD-RcsB en augmentant l'activité phosphatase de la protéine RcsC. Cette mutation a pour conséquence le changement en valine de l'alanine 463 qui se situe entre le second segment transmembranaire et le domaine histidine kinase (Figure 44). Ce domaine charnière est essentiel pour la transmission du signal perçu au niveau de la boucle périplasmique de RcsC jusqu'au domaine histidine kinase cytoplasmique. Au niveau de ce domaine charnière, de nombreux capteurs de systèmes à deux composants tel que Tar, EnvZ ou BarA présentent un domaine particulier le domaine HAMP (Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis proteins, Phosphatases). Ce domaine s'organise en un faisceau de 4 hélices (2 hélices pour chaque monomère) qui peuvent adopter deux géométries différentes. Ces deux géométries sont isoénergétiques. Le passage d'une géométrie à l'autre nécessite donc peu d'énergie. Celui-ci s'effectue par une rotation de 26° des hélices (Figure 45). Le domaine HAMP permet donc de transmettre l'information par une modification de sa conformation (rotation des hélices) qui a pour conséquence la modification de l'activité du capteur. Les capteurs sont, par conséquent, dans une conformation favorisant soit la phosphorylation soit la déphosphorylation (Inouye, 2006 et Hulko 2006).

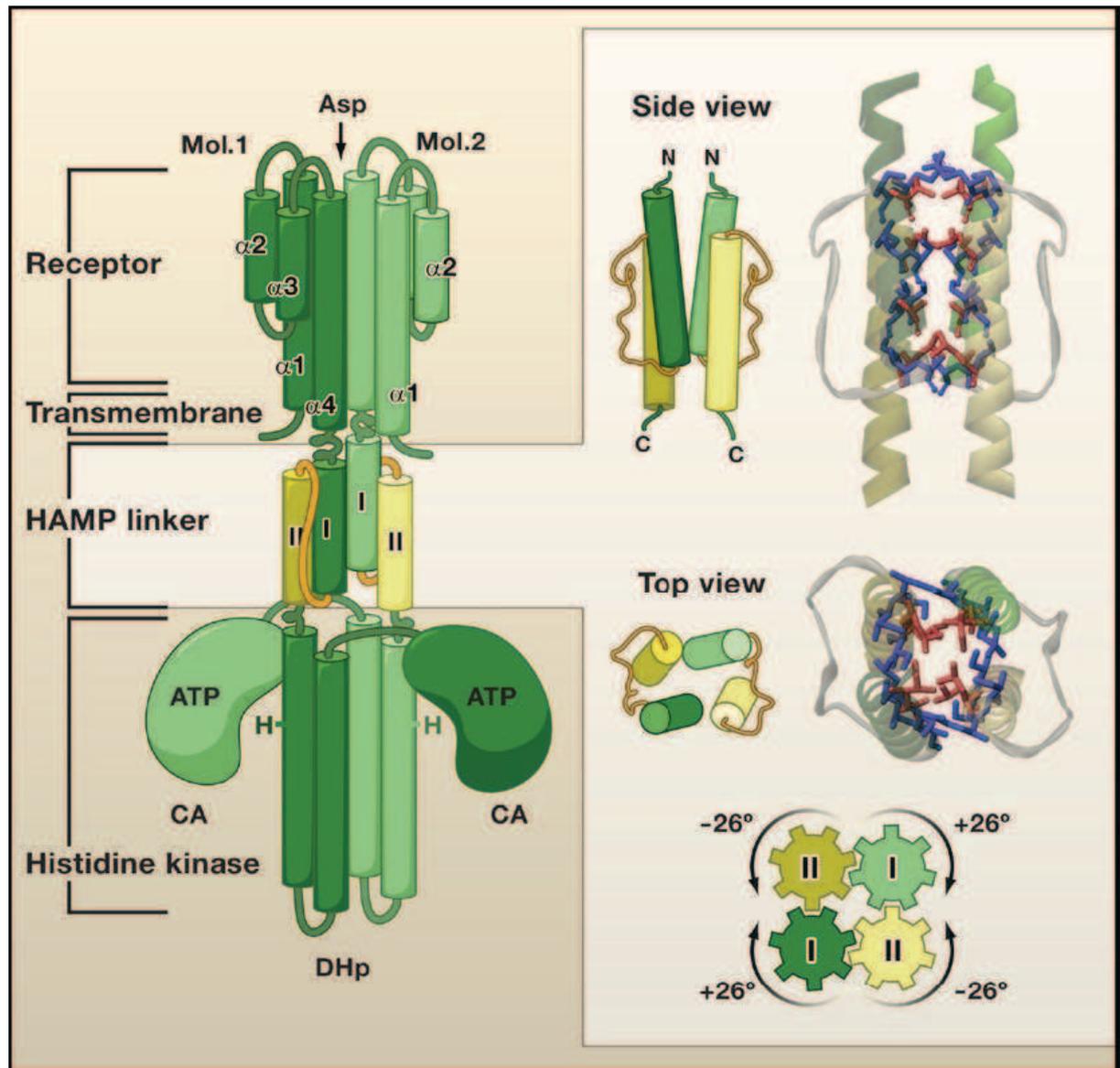


Figure 45 : Structure d'un domaine HAMP (d'après Inouye et coll. 2006)

Ce mode d'action ne semble pas restreint aux protéines contenant un domaine HAMP. Ainsi, on retrouve un mode similaire de transmission du signal par l'intermédiaire de faisceau d'hélices au niveau du capteur DesK (Albanesi et coll. 2009). DesK est un capteur thermosensible chez *B. subtilis* possédant également une structure en faisceau de 4 hélices. Cependant ce n'est pas un domaine HAMP. La température est captée par DesK au niveau de ses 5 segments transmembranaires. L'information est ensuite transmise au niveau cytoplasmique par un changement de géométrie du faisceau de 4 hélices qui va modifier l'activité histidine kinase et phosphatase du capteur. De même, en 2006, Anantharaman et

coll. décrivent les « signaling helices » (S-hélices) présentes dans de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation. Ces S-hélices présentent une structure en faisceau de 2 hélices (une pour chaque monomère). Au niveau du N-terminal de ces S-hélices, on retrouve un domaine capteur du signal (Domaine PAS, GAF...) ou participant à la signalisation (Domaine HAMP...) et en C-terminal un domaine catalytique (par exemple un domaine histidine kinase). Ces hélices participeraient à la transmission de l'information entre les deux domaines adjacents. De plus, Anantharaman et coll. suggèrent que ces hélices fonctionnent comme des commutateurs et ainsi modifient l'activité du domaine présent en aval. Récemment, Möglich et coll. se sont intéressés aux S-hélices présentes dans des capteurs entre un domaine PAS et un domaine histidine kinase. Ces domaines nommés $J\alpha$ présentent une structure en faisceau d'hélices et semblent agir de manière similaire aux domaines HAMP dans la transmission du signal, c'est à dire en transmettant l'information par l'intermédiaire d'une rotation des hélices (Möglich et coll. 2009). Les domaines $J\alpha$ effectuent ainsi la liaison entre des domaines PAS et des domaines histidines kinase. Une séquence consensus de 3 acides aminés (DIT) est présente au niveau C-terminal des domaines PAS (Figure 46).

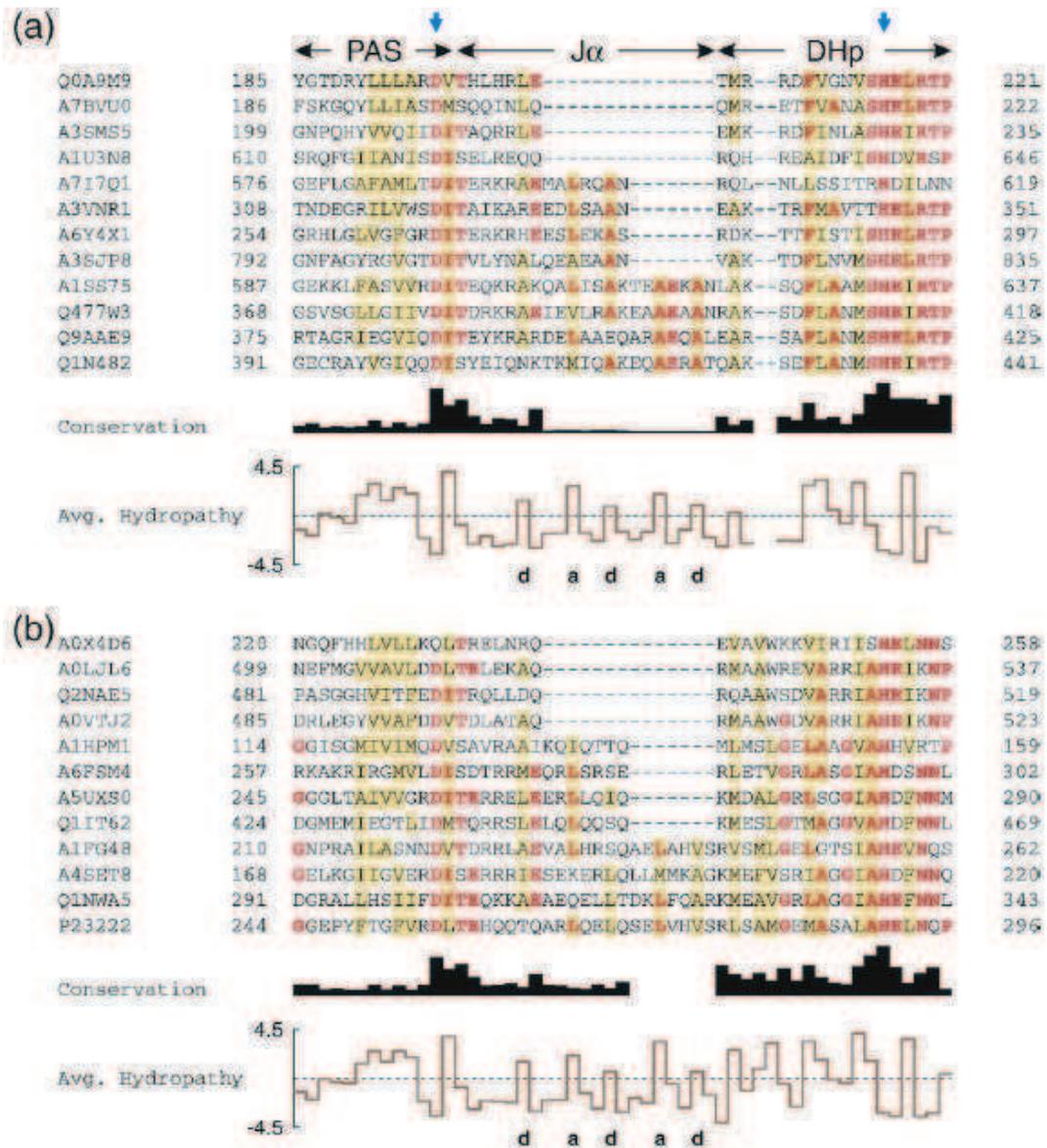


Figure 46 : Alignement multiple de séquences d'histidine kinase contenant un domaine PAS (d'après Möglich et coll. 2009). Les flèches bleue indiquent la position de la séquence consensus DIT de la fin des domaines PAS et l'H phosphorylable des domaines histidine kinase. Les positions d'acides aminés hydrophobes caractéristiques des faisceaux d'hélices sont indiquées par les lettres a et d. Q0A9M9 *Alkalilimnicola ehrlichei* sensor protein ; A7BVU0 *Beggiatoa* sp. PS PhoR ; A3SMS5 *Roseovarius nubinhibens* ISM sensor protein ; A1U3N8 *Marinobacter aquaeolei* sensor protein ; A7I7Q1 *Methanoregula boonei* sensor protein ; A3VNR1 *Parvularcula bermudensis* sensor protein ; A6Y4X1 *Vibrio cholerae* FexB ; A3SJP8 *Methylibium petroleiphilum* putative uncharacterized protein ; A1SS75 *Psychromonas ingrahamii* sensor protein ; Q477W3 *Dechloromonas aromatica* sensor protein ; Q9AAE9 *Caulobacter crescentus* sensor protein ; Q1N482 *Bermanella marisrubri* sensor protein ; A0X4D6 *Shewanella pealeana* sensor protein ; A0LJL6 *Syntrophobacter fumaroxidans* sensor protein ; Q2NAE5 *Erythrobacter litoralis* sensor protein ; ADVTJ2 *Dinoroseobacter shibae* sensor protein ; A1HPM1 *Thermosinus carboxydivorans* sensor protein ; A6FSM4 *Roseobacter* sp. sensor protein ; A5UXS0 *Roseiflexus* sp. sensor protein ; Q1II62 *Acidobacteria bacterium* putative uncharacterized protein ; A1FG48 *Pseudomonas putida* sensor protein ; A4SET8 *Prosthecochloris vibrioformis* sensor protein ; Q1NWA5 *delta proteobacterium* sensor protein ; P23222 *Bradyrhizobium japonicum* FixL.

Les domaines $J\alpha$ se caractérisent par le nombre de résidus d'acides aminés entre l'aspartate de la séquence consensus DIT de la fin du domaine PAS et l'histidine phosphorylable du domaine Histidine Kinase qui est de $7n$ ou $7n+2$ où n est égal à 3, 4, 5 ou 6 (D et H compris). La séquence de ces domaines est faiblement conservée mais présente une périodicité de 7 acides aminés dont 2 sont hydrophobes. La position de ces 2 acides aminés hydrophobes est caractéristique de ces structures en faisceau d'hélices. Chaque hélice d'une structure en faisceau d'hélice, se compose de plusieurs groupes de sept acides aminés appelés heptades. La séquence protéique d'un domaine $J\alpha$ est donc une succession d'heptades. Au sein d'une heptade, chaque acide aminé se voit attribuer une lettre, dans l'ordre a, b, c, d, e, f et g, qui correspond à sa position au niveau du faisceau d'hélices (Figure 47). Les positions « a » et « d » sont occupées par les acides aminés hydrophobes qui forment le noyau hydrophobe du faisceau d'hélices. Ces deux positions sont essentielles pour l'interaction entre les deux hélices (figure 47). Les acides aminés des positions « e » et « g » stabilisent l'interaction (Anantharaman et coll. 2006).

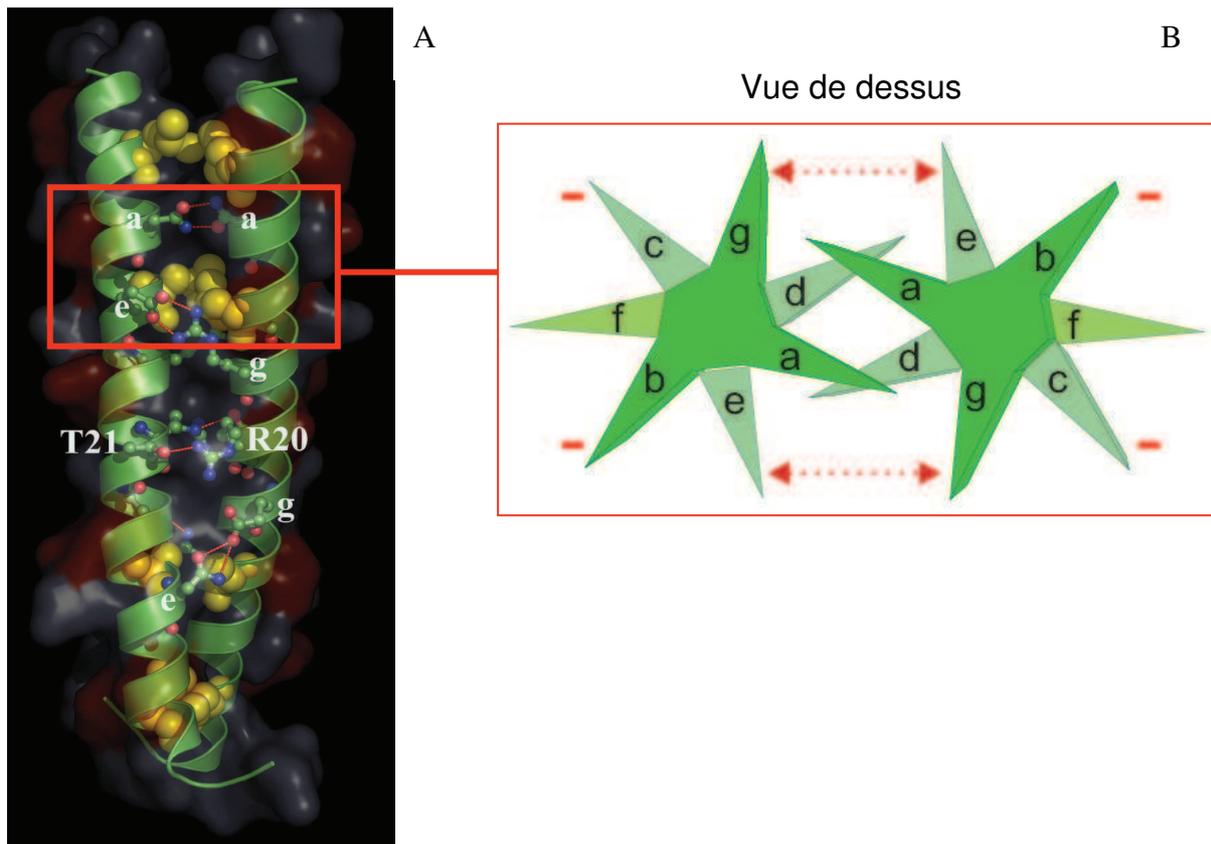


Figure 47 : Interaction entre deux domaines Ja. (A) Modèle de structure d'une S-hélice. (B) Schema représentant l'interaction entre heptades de deux hélices parallèles (d'après Anantharaman et coll. 2006). Les position « a » et « d » sont occupées par des acides aminés hydrophobes essentielles pour l'interaction entre heptades et formant le noyau hydrophobe du faisceau d'hélices. Les acides aminés des positions « e » et « g » stabilisent le faisceau d'hélices.

L'étude de la structure d'un domaine HAMP a montré que le changement d'une alanine en position « a » par d'autres acides aminés hydrophobes modifiait l'équilibre entre les deux géométries du domaine HAMP. En effet, l'augmentation de la taille de la chaîne latérale à cette position favorise l'une des deux géométries (Hulko et coll. 2006). Par exemple, le remplacement d'une alanine par une valine au niveau d'une position « a » du domaine HAMP étudié par Hulko et coll. a pour conséquence une diminution de l'activation du domaine effecteur adjacent. En effet, le remplacement du domaine HAMP du récepteur Tar par ce domaine HAMP modifié entraîne une diminution de la signalisation via ce récepteur. De même, au niveau de NarX (capteur répondant au nitrate) le changement d'une alanine d'une position « a » du domaine HAMP par une valine entraîne une diminution de la signalisation du capteur (Appleman et Stewart 2003).



Figure 48: Portion de la séquence protéique de la protéine RcsC de *D. dadantii* entre la fin du domaine PAS putatif et le début du domaine histidine kinase annotés par le programme SMART. L’histidine phosphorylable du domaine histidine kinase est surlignée en bleu. L’alanine mutée dans la protéine RcsC2 est surlignée en rouge.

Au niveau du domaine charnière de la protéine RcsC, on retrouve un domaine PAS putatif. La figure 48 représente la portion de la séquence protéique de la protéine RcsC entre la fin du domaine du PAS putatif et le début du domaine histidine kinase. Le positionnement des domaines a été effectué à l’aide du programme SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). On observe que la fin du domaine PAS putatif ne présente pas de séquence consensus DIT comme décrit par Möglich et coll. Cependant, l’analyse de cette portion de séquence de la protéine RcsC à l’aide du programme COILS (Lupas et coll. 1991) montre qu’une partie de cette séquence pourrait adopter une structure en faisceau d’hélice. Cette séquence a donc été analysée en effectuant un PSI-Blast qui a trouvé 215 séquences s’alignant sur cette portion de séquence de RcsC de *D. dadantii*. La figure 49 présente une partie de ces alignements. J’ai également ajouté à l’alignement les 4 séquences Q1N482, Q9AAE9, Q477W3 et A1SS75 issues de la figure 46. On observe que les acides aminés DVS en début de séquence correspondent à la séquence consensus DIT décrite par Möglich et coll. La fin du domaine PAS putatif de la protéine RcsC se situe donc au niveau de l’aspartate de la séquence DVS. On observe également que des séquences plus courtes de 7 résidus (l’exemple noté est la portion de séquence de la protéine gil206562088) ou plus longues de 14 (2x7) résidus (l’exemple noté est la portion de séquence de la protéine gil254523833) s’alignent avec la portion de séquence de la protéine RcsC de *D. dadantii*. De plus, le nombre d’acides aminés à partir du D de la séquence DVS à l’H phosphorylable est de 35 (7x5). Toutes ces spécificités sont caractéristiques d’un domaine Ja. La protéine RcsC présenterait donc un domaine Ja entre son domaine PAS et son domaine histidine kinase (Figure 50).

RcsC <i>D. dadantii</i>	DVS	ARVRMEESLQEMAN-----AAE	EQASQSKSMFLATVSH
gi 116695907	DCT	AQQALQEQLRSAQQ-----A	TEAMMRARSTFFAAMSH
gi 254523833	DVT	AQVELEDNLRRAREDSEAA	RQSAEAAANRAKSAFVATMSH
gi 188533372	DVS	ARVKMEQSLHEIAK-----E	AEQASESKSMFLATVSH
gi 197285590	DIS	ARVKMERSLQNMAT-----A	AEQANQAKSMFLATVSH
gi 152971177	DVS	ARVKMEESLQEMAQ-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 126009878	DVS	ARVKMEESLQEMAN-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 162418760	DVS	ARVKMEESLQEMAT-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 157371505	DVS	ARVKMEESLQEMAA-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 161613012	DVS	TRVKMEESLQEMAQ-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 168466036	DVS	TRVKMEESLQEMAQ-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 147525	DVS	SRVKMEESLQEMAQ-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 161950145	DVS	SRVKMEESLQEMAQ-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 123441725	DVS	SRVKMEESLQEMAA-----A	AEQASQSKSMFLATVSH
gi 161521751	DIT	ARKQMEQKLHEARV-----A	AESANKAKSTFLATMSH
gi 206562088	DIT	TRADAQRAL-----D	SANRAKSTFLATISH
Q1N482	DIS	YEIQNKTKMIQAKE-----Q	AERATQAKSEFLANMSH
Q9AAE9	DIT	EYKRARDELAAEQ-----R	AEQALEARS AFLANMSH
Q477w3	DIT	DRKRAEIEVLRAKE-----A	AEEANRAKSDFLANMSH
A1SS75	DIT	EQKRAKQALISAKT-----E	AEKANLAKSQFLAAMSH

Figure 49 : Alignement multiple de la séquence comprenant le domaine J α de RcsC de *Dickeya dadantii*. Les acides aminés surlignés en jaune correspondent à la séquence consensus DIT. L’histidine phosphorylable du domaine HK est surlignée en bleu. L’alanine mutée au niveau de la protéine RcsC2 est surlignée en rouge. gi126009878 RcsC [*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*], gi147525 capsule synthesis regulator component C [*Escherichia coli*], gi152971177 hybrid sensory kinase in two component regulatory system with RcsB and YojN [*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578], gi157371505 hybrid sensory kinase in two component regulatory system with RcsB and YojN [*Serratia proteamaculans* 568], gi161521751 integral membrane sensor hybrid histidine kinase [*Burkholderia multivorans* ATCC 17616], gi161613012 hybrid sensory kinase in twocomponent regulatory system with RcsB and YojN [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B str. SPB7], gi161950145 hybrid sensory kinase in two component regulatory system with RcsB and YojN [*Shigella dysenteriae* Sd197], gi162418760 hybrid sensory kinase in twocomponent regulatory system with RcsB and YojN [*Yersinia pestis* Angola], gi168466036 sensor kinase protein RcsC [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. SL317], gi188533372 hybrid sensory kinase in two component regulatory system with RcsB and YojN [*Erwinia tasmaniensis* Et1/99], gi197285590 two component system, [includes both sensor kinase and response regulator domains] (capsular synthesis regulator component C) [*Proteus mirabilis* HI4320], gi254523833 periplasmic sensor hybrid histidine kinase [*Stenotrophomonas* sp. SKA14] gi206562088 hybrid two-component system kinase-response regulator protein [*Burkholderia cenocepacia* J2315] A1SS75 *Psychromonas ingrahamii* sensor protein ; Q477W3 *Dechloromonas aromatica* sensor protein ; Q9AAE9 *Caulobacter crescentus* sensor protein ; Q1N482 *Bermanella marisrubri* sensor protein

Le positionnement des heptades du domaine J α a été effectué à l’aide du programme Marcoil (Delorenzi et Speed 2002) (Figure 50). L’alanine mutée dans la protéine RcsC2 se situe sur une position « a » du domaine J α (Figure 50) qui, pour rappel, est essentielle pour l’interaction entre les deux hélices de chaque monomère. Elle est remplacée par un autre acide aminé hydrophobe, la valine, dont la chaîne latérale est plus importante que l’alanine. Ceci

synthétisée est faible. Nous avons donc testé l'activation du système RcsCD-RcsB par le biais de l'activité de la fusion *ftsA-uidA* en fonction de la quantité d'OPG synthétisés. On observe que la quantité d'OPG synthétisés module l'activité du système RcsCD-RcsB. L'action des OPG sur le système RcsCD-RcsB pourrait être directe ou indirecte. En effet, les OPG sont présents dans le périplasme et pourraient donc être perçus au niveau du domaine périplasmique de RcsC. L'interaction éventuelle des OPG avec cette boucle périplasmique pourrait être étudiée *in vitro* grâce à la résonance plasmodique de surface. L'influence des OPG sur le système RcsCD-RcsB peut également être indirecte par l'intermédiaire des protéines interagissant avec le système RcsCD-RcsB comme par exemple IgaA qui est un atténuateur du système RcsCD-RcsB. En effet de manière similaire à un mutant *opgG*, des mutants *igaA* de *S. enterica* présentent une forte induction du système RcsCD-RcsB (Dominguez-Bernal et coll. 2004). Il a été suggéré récemment que la régulation de l'expression du gène *igaA* pourrait être une voie permettant la régulation de l'activation du système RcsCD-RcsB chez *S. enterica* (García-Calderón et coll. 2009). Il serait donc intéressant de comparer l'expression du gène *igaA* dans les contextes sauvage et *opgG* de *D. dadantii* afin de déterminer si l'augmentation de l'activité du système RcsCD-RcsB observée en absence d'OPG n'est pas due à une atténuation de la répression exercée par IgaA.

La recherche de gènes cibles des OPG complète l'étude du protéome soluble du mutant *opgG* de *D. dadantii* (Bouchart et coll. 2007). Ces deux études montrent le changement profond dans la physiologie de *D. dadantii* en absence d'OPG. On observe également, pour ceux qui ont été testés, que le système RcsCD-RcsB est impliqué dans la régulation des gènes mis en évidence. Cependant pour certains l'activation du système RcsCD-RcsB ne permet pas d'expliquer à elle seule la différence d'expression entre les contextes sauvage et *opgG*. Tous ces résultats semblent indiquer que les OPG interagissent avec plusieurs systèmes de régulation incluant certains systèmes à deux composants. Il sera donc important de continuer le travail initié concernant l'inactivation des gènes de régulateur de système à deux composants. Deux approches pourraient alors être envisagées. La première consisterait tout d'abord en la recherche de systèmes dont l'activité serait modifiée en absence d'OPG. Pour ce faire, on peut envisager de créer des fusions transcriptionnelles entre le gène rapporteur *uidA* et des gènes régulés par chaque système à deux composants. Parmi ces gènes, nous rechercherions ceux dont le niveau de transcription est modifié en absence d'OPG par rapport au contexte sauvage. Enfin, nous vérifierions que cette modification est bien due à l'activation du système en inactivant le système. Cette approche nécessite la connaissance du régulon de chaque système à deux composants. Elle ne s'applique donc pas à l'étude des 7 systèmes à

deux composants de *D. dadantii* complètement inconnus. C'est pourquoi une deuxième approche serait à envisager. Celle-ci consisterait en l'inactivation des gènes codant les régulateurs de systèmes à deux composants. Nous pourrions, alors, envisager une étude transcriptomique à grande échelle de chaque mutant, le comparer avec celui d'une souche *opgG* afin de dégager des relations et observer les différences avec les doubles mutants. Ce travail lourd nécessiterait la collaboration avec une équipe maîtrisant l'utilisation de puces à ADN afin de déterminer rapidement le transcriptome de chaque souche.

Enfin à plus long terme, la recherche d'inhibiteurs de synthèse des OPG pourrait ouvrir de nouvelles voies dans la lutte contre les agents pathogènes. En effet, de nombreuses recherches ont pour but de trouver de nouveaux agents antibactériens. Nous avons mis en évidence le lien étroit qui existe entre les OPG et le système à deux composants RcsCD-RcsB. Tous deux sont impliqués dans la virulence de nombreuses bactéries. De plus, il apparaît que l'influence des OPG ne se restreint pas au système RcsCD-RcsB. Les systèmes à deux composants sont déjà considérés comme des cibles potentielles d'agents antimicrobiens. Il nous paraît donc important de considérer également les OPG comme une nouvelle cible d'agents antimicrobiens.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

A. Souches et milieux

I. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

Les souches d'*E. coli* et de *D. dadantii* sont cultivées respectivement à 37°C et à 30°C, et sous agitation à 140 rpm et 125 rpm. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Une densité optique de 1 correspond à environ 10⁹ bactéries/mL.

Les milieux de culture utilisés sont :

- Le milieu LB (Luria Bertani) est un milieu riche. Ce milieu est également utilisé sans NaCl (LB-NaCl) afin d'avoir un milieu d'osmolarité réduite (Miller 1992)
- Le milieu 63 (Miller, 1992) est un milieu minimum complété par les métabolites nécessaires à la croissance des différentes souches : les acides aminés et bases azotées à 40 mg/mL, la thiamine à 2 mg/mL et la source de carbone à 2 g/L. Par contre, le polygalacturonate est ajouté à une concentration de 4 g/L.
- Ces milieux sont solidifiés par l'ajout d'agar à 15 g/L. La motilité des bactéries est testée sur boîte de milieu LB ou 63 complété d'une source de carbone gélosé à 4g/L.
- Le milieu bas phosphate se compose de Tris HCl (120 mM), NaCl (90 mM), KCl (40 mM), NH₄Cl (21 mM), CaCl₂ (0,1 mM), Na₂SO₄ (25 μM), KH₂PO₄ (0,5 mM), bactopectone (0,25%), pH 7,4. Ce milieu carencé en phosphate est utilisé pour favoriser la perte des plasmides introduits chez *D. dadantii* par électroporation, Il est complété par une source de carbone et l'antibiotique adéquats (Torriani, 1968).
 - Les souches sont conservés à -20°C et -80°C dans du glycérol 20%.
 - 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.
 - Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes (Tableau 7):

Tableau 7 : Concentration des antibiotiques utilisés

Antibiotique	<i>E. coli</i>	<i>D. Dadantii</i>
Ampicilline (Amp)	50 µg/mL	25 µg/mL
Chloramphénicol (Cml)	25 µg/mL	12,5 µg/mL
Kanamycine (Kan)	50 µg/mL	25 µg/mL
Spectinomycine (Sp)	100 µg/mL	50 µg/mL
Tétracycline (Tet)	25 µg/mL	12,5 µg/mL
Gentamycine (Gm)		2 µg/mL

II. Génotypes des souches utilisées

Les souches d'*E. coli* K12 et de *D. dadantii* utilisées sont décrites respectivement dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Souches d'*E. coli*.

Souche	Génotype	référence
JM83	$\Delta(lac-pro)$, <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ($\phi 80\Delta lacZ-M15$)	Vieira et Messing 1982
Top10	<i>F' mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) $\Phi 80lacZ\Delta-M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
S17- λ pir	<i>recA1</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> ^{M+} , <i>RP4:2-Tc::Mu-Kan::Tn7</i> , λ pir	De lorenzo et coll. 1994
SM10- λ pir	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lacY</i> , <i>recA::cat-aadA</i> (<i>CmlR</i>), <i>pho-510</i> , λ recA+	De lorenzo et coll. 1994
BW25141	Δ (<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ4787</i> Δ (<i>::rrnB-3</i>), Δ (<i>phoB-phoR</i>)580, λ -, <i>galU95</i> , <i>uidA3</i> (Δ): <i>pir</i> ⁺ , <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (Δ - <i>ins</i>): <i>FRT</i> , <i>rph-1</i> , <i>DE(rhaD-rhaB)</i> 568, <i>rrnB-3</i> , <i>hsdR514</i>	Datsenko et Wanner 2000

Tableau 9 : Souches de *D. dadantii*.

Souche	Génotype	référence
EC3937	Sauvage	Collection du laboratoire
NFB3500	EC3937, <i>opgG::uidA-Kan</i>	Page et coll.
NFB3591	NFB3500, <i>rscC2</i>	Cette étude

NFB3602	EC3937, <i>opgG</i> ::Cml, <i>ura</i>	Cette étude
NFB3609	NFB3602, <i>rcsC2</i>	Cette étude
NFB3611	EC3937, <i>rcsC2</i>	Cette étude
NFB3682	EC3937, <i>rcsC</i> ::Cml	Cette étude
NFB3683	NFB3500, <i>rcsC</i> ::Cml	Cette étude
NFB3723	EC3937, <i>opgG</i> ::Cml	Collection du laboratoire
NFB3753	EC3937, Δ (<i>rcsCBD</i>)::Cml	Cette étude
NFB3754	NFB3500, Δ (<i>rcsCBD</i>)::Cml	Cette étude
NFB3800	EC3937, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB3805	NFB3602, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB3806	NFB3609, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB3807	NFB3611, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB3808	NFB3753, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB3809	EC3937, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3810	NFB3602, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3811	NFB3609, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3812	NFB3611, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3813	NFB3753, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3833	EC3937, <i>uvrY</i> ::Kan	Cette étude
NFB3835	NFB3723, (miniTn5-Spe. <i>araC</i> , P_{BAD} <i>opgGH</i>)	Cette étude
NFB3837	NFB3835, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB3846	EC3937, ABF-0015810::Kan	Cette étude
NFB3847	EC3937, ABF-0046568::Kan	Cette étude
NFB3924	EC3937, (miniTn5Spe. <i>araC</i> , P_{BAD} <i>opgG</i> :: <i>uidA</i>)	Cette étude
NFB3925	EC3937, (miniTn5Spe. <i>araC</i> , P_{BAD} <i>opgG</i> :: <i>uidA</i>)	Cette étude
NFB3926	EC3937, (miniTn5Spe. <i>araC</i> , P_{BAD} <i>opgG</i> :: <i>uidA</i>)	Cette étude
NFB3927	NFB3723, (miniTn5Spe. <i>araC</i> , P_{BAD} <i>opgG</i> :: <i>uidA</i>)	Cette étude
NFB3946	EC3937, <i>opgG</i> ::FRT	Collection du laboratoire
NFB3948	NFB3810 (miniTn5Spe. <i>rcsC2BD</i>)	Cette étude

NFB3983	NFB3946, $\Delta(rcsCBD)::Cml$	Cette étude
NFB3991	NFB3500, (miniTn5Spe. <i>rscCBD</i>)	Cette étude
NFB7007	NFB3983, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB7079	NFB3753, <i>sttD</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7080	NFB3753, ABF-0015071-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7081	NFB3753, ABF-0014778-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7084	NFB3753, <i>untM</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7085	NFB3753, <i>gnd</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7091	NFB3753, ?-miniTn5-GGm (insertion 77)	Cette étude
NFB7094	NFB3753, <i>yniA</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7107	NFB3983, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7128	NFB3682, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7154	NFB3946, <i>rscC</i> ::Cml	Cette étude
NFB7191	NFB7154, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB7192	NFB7154, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7199	EC3937, <i>rscB</i> ::Cml	Cette étude
NFB7200	EC3937, <i>rscC2 rscB</i> ::Cml	Cette étude
NFB7202	NFB7199, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7203	NFB7200, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7205	NFB7199, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB7206	NFB7200, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB7208	NFB3946, <i>rscB</i> :Cml	Cette étude
NFB7209	NFB3946, <i>rscC2 rscB</i> ::Cml	Cette étude
NFB7210	NFB3500, <i>rscB</i> ::Cml	Cette étude
NFB7211	NFB3500, <i>rscC2 rscB</i> ::Cml	Cette étude
NFB7212	NFB7208, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7213	NFB7208, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude
NFB7214	NFB7209, (miniTn5Kan. <i>flhD-uidA</i>)	Cette étude
NFB7215	NFB7209, (miniTn5Kan. <i>ftsA-uidA</i>)	Cette étude

NFB7239	EC3937, <i>gnd</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7240	NFB3723, <i>gnd</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFFB7241	NFB3983, <i>gnd</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7242	EC3937, ABF-0014778-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7243	NFB3723, ABF-0014778-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7244	NFB3983, ABF-0014778-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7245	EC3937, <i>untM</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7246	NFB3723, <i>untM</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7247	NFB3983, <i>untM</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7248	EC3937, <i>sttC</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7249	NFB3723, <i>sttC</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7250	EC3937, ABF-0015071-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7251	NFB3723, ABF-0015071-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7252	NFB3983, ABF-0015071-miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7255	EC3937, <i>sttD</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7256	NFB3723, <i>sttD</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7257	NFB3983, <i>sttD</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7258	EC3937, ?-miniTn5-GGm (insertion 56)	Cette étude
NFB7259	NFB3723, ?-miniTn5-GGm (insertion 56)	Cette étude
NFB7260	EC3937, ?-miniTn5-GGm (insertion 77)	Cette étude
NFB7261	NFB3723, ?-miniTn5-GGm (insertion 77)	Cette étude
NFB7262	NFB3983, ?-miniTn5-GGm (insertion 77)	Cette étude
NFB7263	EC3937, <i>yniA</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7264	NFB3723, <i>yniA</i> -miniTn5-GGm	Cette étude
NFB7265	NFB3983, <i>yniA</i> -miniTn5-GGm	Cette étude

III. Plasmides utilisés

Tableau 10 : Plasmides.

Plasmide	Génotype	source ou référence
pBSK	Amp ^R	Stratagene
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron et coll. 1985
pUC18Not	Amp ^R	Yanisch-Perron et coll. 1985
pNFKan	Kan ^R	Collection du laboratoire
pUIDK11	Cml ^R , portant la cassette <i>uidA</i> -Kan	Bardonnet & Blanco 1992
pOK	<i>sacB</i> , <i>sacR</i> , <i>mobRK2</i> , <i>oriRK6</i> , Spe ^R	Huguet et coll. 1998
pCRS5548	pUT miniTn5-GGm	Reeve et coll. 1999
pCRS5548 <i>sacB</i>	pUT <i>sacB</i> miniTn5-GGm	Cette étude
pUTminiTn5-Tet	Amp ^R , Tet ^R	De Lorenzo et coll. 1990
pUTminiTn5-Spe	Amp ^R , Sp ^R	De Lorenzo et coll. 1990
pUTminiTn5-Kan	Amp ^R , Kan ^R	De Lorenzo et coll. 1990
pBAD18	Amp ^R , <i>araC</i> , promoteur <i>P_{BAD}</i>	Guzman et coll. 1995
pDS132	<i>oriRK6</i> , <i>mobRP4</i> , <i>cat</i> , <i>sacB</i>	Philippe et coll. 2004
pNFW32	pUC18, <i>opgGH</i>	Page et coll. 2001
pNFW137	pUC18, <i>rcsC</i>	Cette étude
pNFW149	pUC18, <i>rcsC</i> ::Cml	Cette étude
pNFW161	pOK, <i>rcsC</i> ::Cml	Cette étude
pNFW170	pUC18, Δ (<i>rcsCBD</i>)	Cette étude
pNFW173	pUC18, Δ (<i>rcsCB rcsD</i>)::Cml	Cette étude
pNFW208	pBAD18, fragment de PCR <i>opgGH</i> frontNheI- <i>opgGH</i> backchryKpnI	Cette étude
pNFW212	pBAD18, <i>opgGH</i>	Cette étude
pNFW219	pUC18Not, <i>araC P_{BAD}opgGH</i>	Cette étude
pNFW233	pUTminiTn5-Spe, <i>araC P_{BAD}opgGH</i>	Cette étude
pNFW244	pUC18, Δ <i>uvrY</i> (PCR amont aval de <i>uvrY</i>)	Cette étude
pNFW245	pUC18, Δ <i>uvrY</i> ::Kan	Cette étude
pNFW249	pBSK, Δ ABF-0015810 (PCR amont aval de ABF-0015810)	Cette étude

pNFW250	pBSK, Δ ABF-0015810::Kan	Cette étude
pNFW252	pBSK, Δ ABF-0046568 (PCR amont aval de ABF-0046568)	Cette étude
pNFW253	pBSK, Δ ABF-0046568::Kan	Cette étude
pNFW257	pUC18Not, <i>rcsCBD</i>	Cette étude
pNFW261	pUTminiTn5-Spe, <i>rcsCBD</i>	Cette étude
pNFW336	pUC18Not, <i>rcsC2BD</i>	Cette étude
pNFW339	pUTminiTn5-Spe, <i>rcsC2BD</i>	Cette étude
pNFW260	pUC18Not, <i>araC P_{BAD}opgG-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW297	pUTminiTn5-Spe, <i>araC P_{BAD}opgG uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW397	pUC18Not, <i>rcsCB::Cml-rcsD</i>	Cette étude
pNFW398	pUC18Not, <i>rcsC2B::Cml-rcsD</i>	Cette étude
pNFW181	pUC18Not, <i>flhD</i>	Cette étude
pNFW203	pUC18Not, <i>flhD-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW204	pUC18Not, <i>flhD-uidA</i>	Cette étude
pNFW215	pUTminiTn5-Kan, <i>flhD-uidA</i>	Cette étude
pNFW182	pUC18Not, <i>ftsA</i>	Cette étude
pNFW193	pUC18Not, <i>ftsA-uidA</i> -Kan	Cette étude
pNFW201	pUC18Not, <i>ftsA-uidA</i>	Cette étude
pNFW220	pUTminiTn5-Kan, <i>ftsA-uidA</i>	Cette étude

B. Techniques génétiques

I. Transduction

Les transductions chez *D. dadantii* ont été effectuées en utilisant le phage ϕ EC2 (Réсибоis et coll. 1984).

II. Conjugaison

Les souches donatrices (*E. coli*) et réceptrices (*D. dadantii*) sont mélangés en proportion 1 pour 10 et déposés sur boîte de milieu 63 sans source de carbone pendant 1h à 30°C. Les bactéries sont ensuite reprises dans 1,5 mL de milieu 63 et étalées par aliquots de 200µl sur milieux sélectifs :

- Pour le transfert de mini transposons contenus dans les pUT : sur boîtes de milieu 63 + source de carbone + antibiotique (résistance portée par le miniTn5). Les colonies apparues sont repiquées, seuls les clones sensibles à l'ampicilline (résistance apportée par le plasmide pUT) sont utilisés.
- Pour le transfert du miniTn5GGm : sur boîtes de milieu 63 + glycérol 2g/L + arabinose 2g/l + gentamycine + saccharose 2g/L. En effet j'ai cloné le gène *sacB* dans le pUT portant ce mini transposon pour augmenter le rendement d'insertion. Celui-ci rend la souche sensible au saccharose (Huguet et coll. 1998). Cela permet une sélection associée à la perte du plasmide. La vérification de la sensibilité à l'ampicilline est quand même effectuée pour chaque clone. L'arabinose est ajouté au milieu pour éviter que les clones soient muqueux.

-

III. Transformation

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

IV. Electroporation

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). Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB + antibiotique (cassette interrompant le gène d'intérêt) permettant la sélection des bactéries ayant reçu le plasmide. Des cultures successives dans un milieu carencé en phosphate complémenté par une source de carbone et l'antibiotique adéquat sont utilisées pour favoriser la perte des plasmides et observer la recombinaison homologue (Torriani, 1968).

C. Techniques de biologie moléculaire

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

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

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

-

II. Enzymes de restriction et de modification

- Les endonucléases de restriction (New England Biolabs, Takara, Boehringer Mannheim, Eurogentec, Gibco BRL) ont été utilisées selon les recommandations des fabricants. Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8 à 1%) en présence de bromure d'éthidium (1µg/mL) et de RNase (4µg/mL, Sigma) dans du TAE (Tris 200mM, EDTA 5 mM, ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique). Le marqueur de masse moléculaire est le « Smart ladder » d'Eurogentec.

- Certains fragments sont rendus bouts francs grâce à la T4 polymérase (New England Biolabs) utilisée selon Sambrook et coll. (1989).

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

III. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR, PCR inverse, Tail PCR)

L'ADN polymérase (Taq DNA polymérase, Eppendorf ou 5PRIME) a permis de réaliser des PCR dans les conditions standard préconisées par le fabriquant. Les réactions sont réalisées dans un volume de 50µL. Les PCR sont faites avec 100 ng d'ADN génomique ou sont effectuées à partir d'une colonie. Le tableau 11 récapitule les amorces utilisées.

Tableau 11 : Amorces utilisées.

Amorce	Séquence
delrcs1	AAGGTACCTTGCCGGAAGCGAGCCGCGGCTCGCGGT
delrcs2	AACCCGGGTCAAAGGCATACCGTAAAGGTTGTCAGCAA
delrcs3	AACCCGGGCGCAGGCATGAAATCAGGCTCCTGATGAAC
delrcs4	AAAAGCTTTACCCCGTAATAACCTGCTTACCCACCCGC
RcsC1	GCTGAACCGGTGGAAGACGATGAGCTCGACAGCGTG
RcsC4	CTGAAAGGTGTCTTTGCCATGCTGAATCTTCATCCC
YojN1	CTGTGACAAAGCCTTCGATCTG
YojN8	GTTCATCAGGAGCCTGATTTC
flhD1	CACTGCGGGGTAAGGATCCGTGAAATATTATG
flhD2	GCATCGAGCTCGATGCGTCTGAGGTGCCGGCTCTTCA
ftsA1	GATCGAGGATCCGCCCTGGATTAACAGGCCAGCG
ftsA2	CGGCATGAGCTCATTGCCGATGCGCTCAGCCGGC
jep132	CTAGGCGGCCAGATCTGATCAA
omegaC2	TCAAAAGGTCATCCACCGGATC
mTn5-GGmTail1	GTAACGCGCTTTCCACCAAC
mTn5-GGmTail2	TCCAGACTGAATGCCACAG
mTn5-GGmTail3	GTTTCTACAGGACGTAACATAAGG
AD1	NTCGASTWTSWGTT
AD2	NGTCGASWGANAWGAA
AD3	WGTGNAGWANCANAGA
opgGHfrontNheI	GGGTGCTAGCTGATTTAGGCACACATACAGGGGG
opgGHbackchryKpnI	AACTGGTACCAGACGGCAACGCCGTGTCGATAGCC
uvrYdelstartReV	CCTTGAGGATATCAATATCGTCAAGAATGCGCCGTATCC
uvrYdelendfor	CGGTGATATCAGTGCGGAGACATTGATTAGTAGTGACTG
uvrYdelendrev	CCCCCCCCGGGACTTTAGGGAAATAGCTGCGACTG
uvrYdelstartfor	GCCGGTCTAGACCCAGCAGAACCAGTAAGTCCAGC
S1DelStarFor	CCGGTCGACACAAGACCATCGAAGTCCTCAAGCGC
S1DelEndRev	TTCCATCTAGAGCCATTGATCCCTCGGGCTGTGCG
S1ADelEndFor	CCCCGTATACGGACTATCTTGAACAAACCGGCGTGCTG
S1ADelStarRev	CGCTGTATACCGGAGAGACCCCGACTTTCGTCATCG
S8DelStarFor	CACGCCCGGGGGCGTTACGCGGAAGTGTTCGCC
S8DelStarRev	GCGCGTATACATTCAGCGACGGATGTTCAATTCAGAAGGG
S8DelEndFor	AGCCGTATACCTGGCCGAAGTGGTGGCGCTGTACGATGC
S8DelEndRev	CGGTGCTAGATGGAAACCGGCCTGTCAGCC

- PCR inverse : L'ADN génomique extrait de *D. dadantii* est digéré par une enzyme de restriction reconnaissant un site à 4 paires de bases donc très représenté sur le chromosome (ici TaqI). Le produit digéré est ensuite circularisé à l'aide de la T4 DNA ligase. Le produit de ligation est utilisé comme matrice pour une réaction de PCR classique. Les amorces utilisées sont divergentes, elles s'hybrident au niveau du pied du transposon à localiser et il n'y a pas de site TaqI entre ces amorces.
- TAIL PCR : La TAIL PCR est très utile pour localiser rapidement un grand nombre d'insertion du même fragment d'ADN (Liu et Whittier 1995). En effet il n'y a pas besoin d'étape d'extraction d'ADN ou de modifier celui-ci comme dans la PCR inverse. Le

principe de la TAIL PCR est d'utiliser une amorce dégénérée et des amorces spécifiques du transposon. En jouant sur les températures d'hybridation il est possible d'augmenter la spécificité de l'amplification. De plus l'amplification se fait au niveau de trois PCR gigognes ce qui augmente la spécificité. Cette technique a été utilisée pour la localisation des miniTn5-GGm créant des fusions transcriptionnelles aléatoires avec le gène *uidA*.

Les amorces spécifiques utilisées sont :

mTn5-GGmTail1 GTAACGCGCTTTCCCAACCAAC

mTn5-GGmTail2 TCCAGACTGAATGCCCCACAG

mTn5-GGmTail3 GTTTCTACAGGACGTAACATAAGG

L'amorce dégénérée utilisée est :

AD2 NGTCGASWGANAWGAA

➤ Les réactions de PCR s'effectue sur un volume de 20µl :

- Tail 1

Tampon	2µl
Amorce AD2 (100µM)	1µl
Amorce Tail 1 (10µM)	1µl
dNTP (25mM)	0,2µl
Taq	0,2µl
Eau	15,6µl

Ajouter un peu de bactéries (piquer dans une colonie isolée) lancer le programme PCR :
tail 1

- Tail 2

Tampon	2µl
Amorce AD2 (100µM)	1µl
Amorce Tail 2 (10µM)	1µl
dNTP (25 mM)	0,2µl
Taq	0,2µl
Eau	14,6µl

Dans les 19µl, ajouter 1µl de la dilution 10^{-2} de la Tail 1

PCR : programme tail 2

- Tail 3

Tampon	2 μ l
Amorce AD2 (100 μ M)	1 μ l
Amorce Tail 3 (10 μ M)	1 μ l
dNTP (25 mM)	0,2 μ l
Taq	0,2 μ l
Eau	14,6 μ l

Dans les 19 μ l, ajouter 1 μ l de la dilution 10⁻² de la Tail 2

PCR : programme tail 3 (ou tail 2 s'il y a encore beaucoup de bandes aspécifiques)

➤ Les programmes utilisés :

- Tail1 :

1. T = 94°C 4 min
2. T = 95°C 1 min
3. T = 94°C 1 min
4. T = 62°C 1 min
5. T = 72°C 2 min
6. Go To 3 4 Rep
7. T = 94°C 1 min
8. T = 25°C 30 sec
9. T = 72°C 2 min ramping to 72°C 2 min R=0,3°C/s
10. T = 94°C 30 sec
11. T = 44°C 1 min
12. T = 72°C 2 min
13. Go To 10 9 Rep
14. T = 94°C 30 sec
15. T = 62°C 1 min
16. T = 72°C 2 min
17. T = 94°C 30 sec
18. T = 62°C 1 min
19. T = 72°C 2 min
20. T = 94°C 30 sec
21. T = 44°C 1 min
22. T = 72°C 2 min

23. Go to 14 14 Rep

24. T = 72°C 5 min

25. Hold 4°C

- Tail 2 :

1. T = 94°C 30 sec

2. T = 62°C 1 min

3. T = 72°C 2 min

4. T = 94°C 30 sec

5. T = 62°C 1 min

6. T = 72°C 2 min

7. T = 94°C 30 sec

8. T = 44°C 1 min

9. T = 72°C 2 min

10. Go To 1 15 Rep

11. 72°C 5 min

12. Hold 4°C

- Tail 3 :

1. T = 94°C 30 sec

2. T = 44°C 1 min

3. T = 72°C 2 min

4. Go To 1 30 Rep

5. 72°C 5 min

6. Hold 4°C

IV. Séquençage

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

D. Clonages moléculaires

I. Clonage du locus *rscCBD*

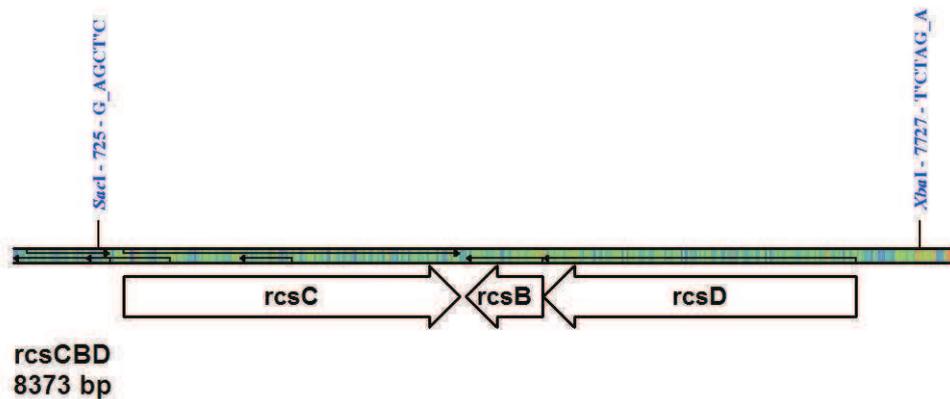


Figure 52 : Représentation du locus *rscCBD* de *D. dadantii*.

Afin de cloner le locus *rscCBD* en entier, Anne-France Prouvost a effectué une digestion d'ADN génomique de la souche EC3937. 5µg d'ADNg ont été digérés par l'enzyme *SacI* puis par l'enzyme *XbaI*. Après séparation en gel d'Agarose des fragments de l'ADNg digéré et elle a récupéré l'ADN présent de 6 à 8kb (le fragment *rscCDB* est de 7kb). Elle a ensuite cloné les fragments *SacI-XbaI* (Figure 52) dans pUC18Not digéré par *SacI-XbaI* et sélectionné sur LB+Amp+Xgal. Elle a obtenu plusieurs clones blancs dont certains présentaient un phénotype muqueux. Ceux-ci ont été analysés par séquençage: un des clones contenait un fragment d'ADN comportant le gène *rscF*, et deux autres clones comportaient le locus *rscCBD* en entier.

II. Constructions des mutants (*rscC*, $\Delta rcsCBD$ et *rscB*)

1. Construction du mutant *rscC*

Ce mutant a été réalisé par Franck Bouchart.

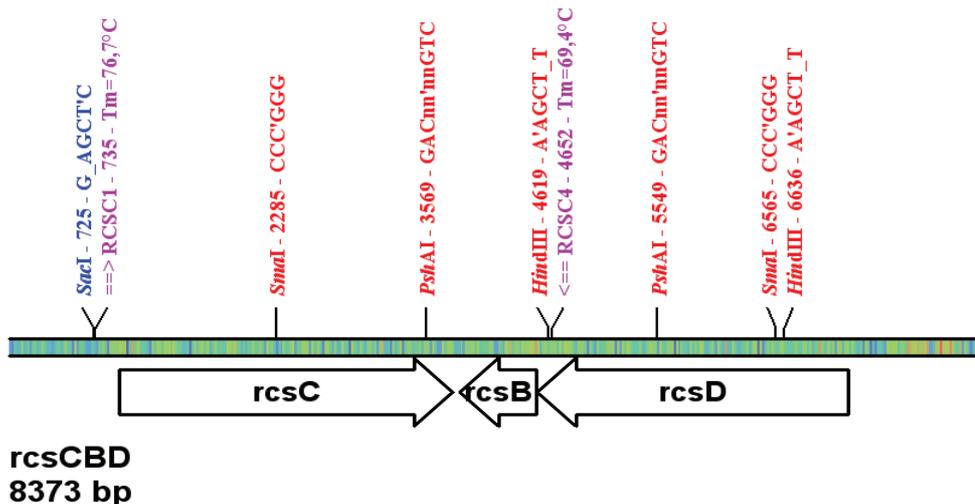


Figure 53: Représentation du locus *rscCBD* de *D. dadantii* avec les amorces et les sites de restriction utilisés pour la construction du mutant *rscC*.

Afin de construire le mutant *rscC*, Franck Bouchart a cloné le fragment de PCR RcsC1-RcsC4 (Figure 53, SacI-HindIII) dans pUC18 digéré par les mêmes enzymes (pNFW137). Il a ensuite délété le fragment SmaI-PstAI et inséré une cassette chloramphénicol (issue de la digestion EcoRV de pNFCml) dans ce plasmide délété (pNFW149). Enfin, il a sous-cloné le fragment SalI-HpaI dans le plasmide pOK digéré par SalI-SmaI (pNFW161). Le plasmide a été introduit chez *D. dadantii* par conjugaison.

2. Délétion du locus *rscCBD* : $\Delta rscCBD$

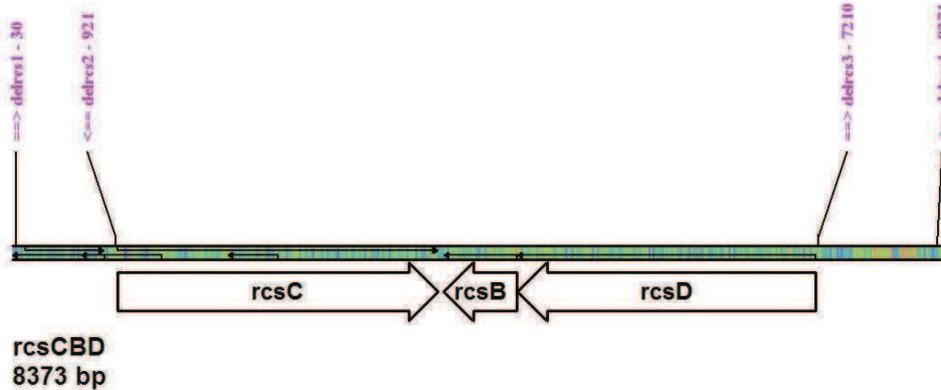


Figure 54 : Représentation du locus *rscCBD* de *D. dadantii* avec les amorces pour la délétion du locus.

Afin de déléter le locus *rscCBD*, Anne-France Prouvost a cloné dans pUC18Not (KpnI-HindIII), les fragments de PCR *delrcs1-2* (KpnI-SmaI) et *delrcs3-4* (SmaI-HindIII) (Figure 54) (=pNFW170= pUC18, '*gyrA* Δ (*rscDB rscC*) *menF*'). Une cassette chloramphénicol (Cml) a été introduite au niveau du site SmaI de pNFW170. Ce plasmide (pNFW173) a été électroporé dans EC3937.

3. Construction du mutant *rscB*

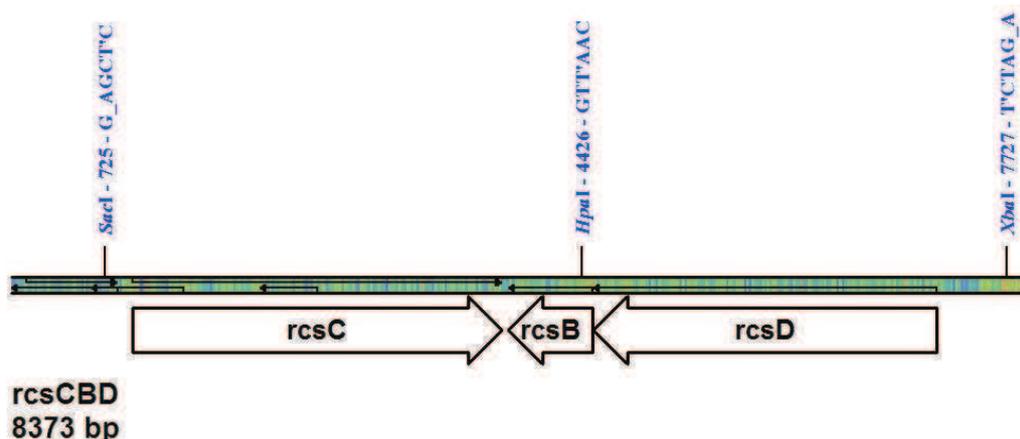


Figure 55 : Représentation du locus *rscCBD* de *D. dadantii* et du site de restriction *HpaI* permettant l'insertion de la cassette pour la construction du mutant *rscB*.

Afin de construire le mutant *rcsB*, j'ai inséré une cassette chloramphénicol au niveau du site HpaI de pNFW257 (pUC18Not *rcsCBD*). J'ai ensuite électroporé la construction (pNFW397) dans EC3937.

4. Construction du mutant *rcsC2 rcsB*

Afin de construire le mutant *rcsC2 rcsB*, j'ai inséré une cassette chloramphénicol au niveau du site HpaI de pNFW336 (pUC18Not *rcsC2BD*). J'ai ensuite électroporé la construction (pNFW397) dans EC3937.

III. Construction des fusions transcriptionnelles

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

1. Construction de la fusion *ftsA-uidA*

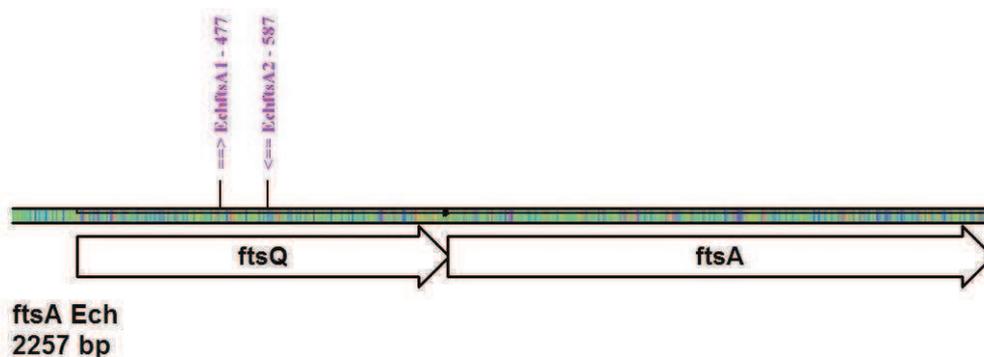


Figure 56 : Représentation de l'opéron *ftsQA* de *D. dadantii* et les amorces permettant la construction de la fusion *ftsA-uidA*.

Afin de construire la fusion *ftsA-uidA*, Anne-France Prouvost a cloné le fragment de PCR ftsA1-ftsA2 (Figure 56, BamHI et SacI) dans pUC18Not digéré par BamHI et SacI (pNFW182). Elle a ensuite inséré une cassette *uidA*-Kan (issue de la digestion par SmaI du plasmide pUIDK11) au niveau du site NgoMIV rendu bout franc de pNFW182 (pNFW193). La cassette Kan a été enlevée par digestion NcoI+HpaI), le plasmide a été rendu bout franc et refermé (pNFW201). Le fragment NotI contenant la fusion *ftsA-uidA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Kan (pNFW220). Le miniTn5 a été introduit chez *D. dadantii* par conjugaison.

2. Construction de la fusion *flhD-uidA*

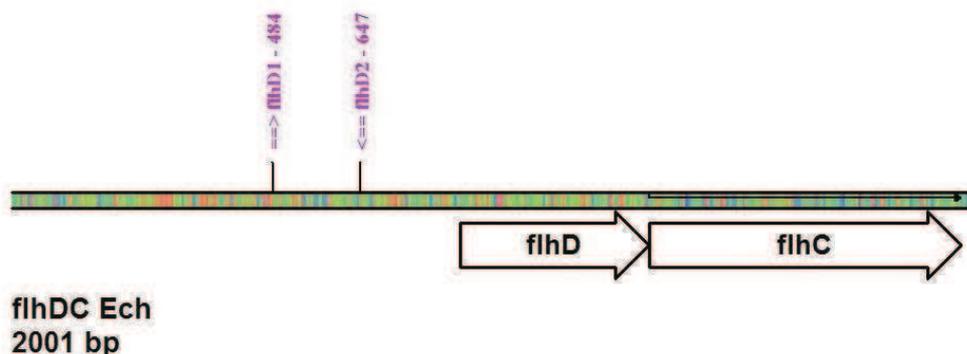


Figure 57 : Représentation de l'opéron *flhDC* de *D. dadantii* et les amorces permettant la construction de la fusion *flhD-uidA*.

Afin de construire la fusion *flhD-uidA*, Anne-France Prouvost a cloné le fragment de PCR *flhD1-flhD2* (Figure 57, BamHI et SacI) dans pUC18Not digéré par BamHI et SacI (pNFW181). Elle a ensuite inséré une cassette *uidA-Kan* (issue de la digestion par SacI du plasmide pUIDK11) au niveau du site SacI de pNFW181 (pNFW203). La cassette Kan a été enlevée par digestion NcoI+HpaI, le plasmide a été rendu bout franc et refermé (pNFW204). Le fragment NotI comprenant la fusion *flhD-uidA* a été sous-cloné dans le pUTminiTn5Kan (pNFW215). Le miniTn5 a été introduit chez *D. dadantii* par conjugaison.

IV. Clonage de l'opéron *opgGH* sous le promoteur P_{araBAD}

Le clonage de l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* dans le plasmide pBAD18 (Guzman et coll., 1995) a été effectué en deux étapes. Le début de l'opéron a été amplifié par PCR à partir du plasmide pNFW32 (Figure 58) grâce aux amorces *opgGHfrontNheI* et *opgGHbackcrhyKpnI* afin d'adapter les sites de restrictions adéquat aux clonage dans pBAD18 (NheI et KpnI). Ce produit de PCR digéré par NheI et KpnI a été cloné dans le plasmide pBAD18 digéré par les mêmes enzymes. Ce plasmide a été nommé pNFW208 (figure 59). Ensuite le fragment issu de la digestion de pNFW32 par EcoRI et KpnI a été cloné dans le plasmide pNFW208 digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu, pNFW212 (Figure 60), contient donc l'opéron *opgGH* sous le contrôle du promoteur P_{araBAD} .

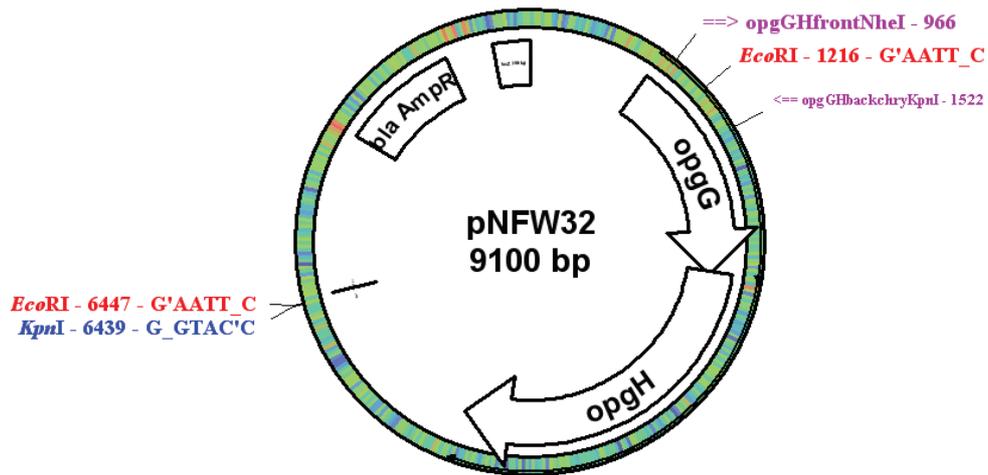


Figure 58 : Plasmide pNFW32 contenant l'opéron *opgGH* de *D. dadantii* (Page et coll., 2001)

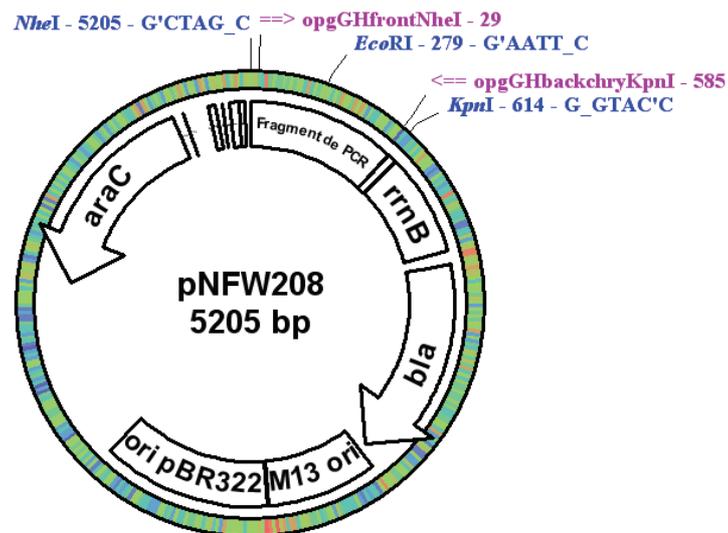


Figure 59 : pNFW208, la première étape de clonage de l'opéron *opgGH* dans le plasmide pBAD18.

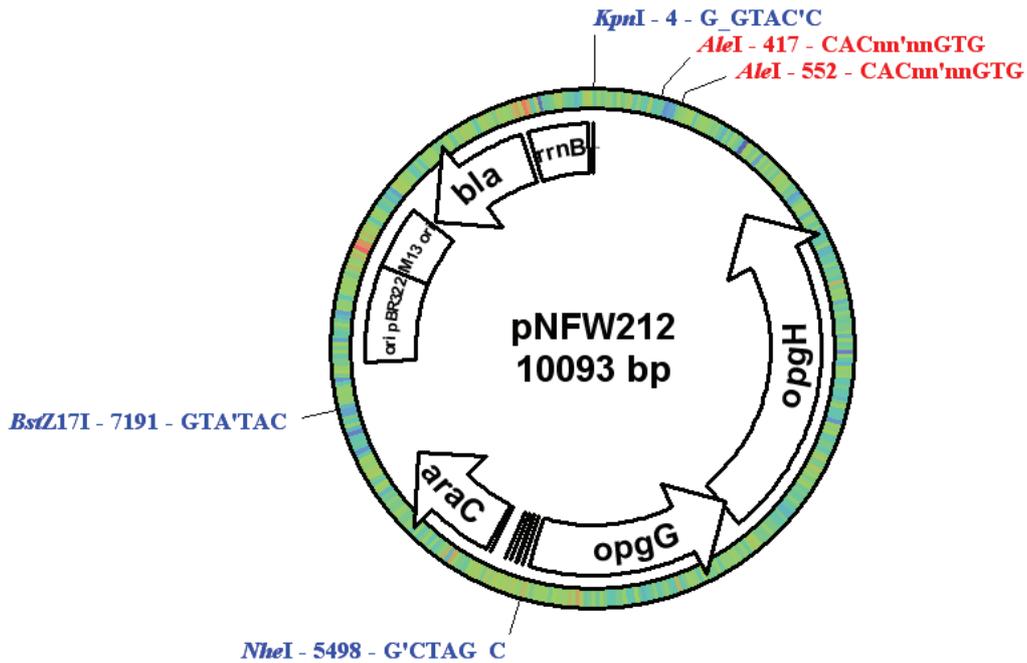


Figure 60 : pNFW212 contenant l'opéron *opgGH* sous le contrôle du promoteur P_{BAD}

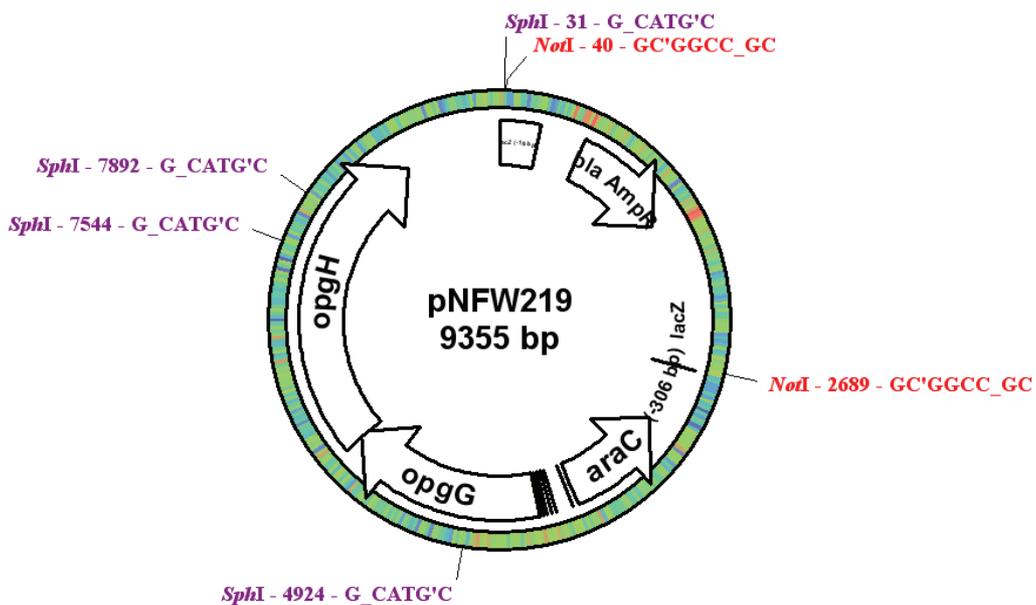


Figure 61 : pNFW219 contenant la construction *araC-P_{BAD}opgGH* bornée par deux sites de restriction NotI

Le plasmide pNFW212 a été digéré par *AleI* et *Bstz17I*. Le fragment obtenu (bout franc) a été inséré au site *SmaI* du plasmide pUC18Not. Cette étape permet le rajout de sites *NotI* aux bornes de l'insert. Ce plasmide, pNFW219 (Figure 61), a été digéré par *NotI* pour libérer la construction *araC-P_{BAD}opgGH* et l'insérer au site *NotI* du miniTn5 Sp/Sm (Figure 19) contenu dans le plasmide pUT.

V. Construction de la fusion transcriptionnelle $P_{araBAD}opgG-uidA$

La cassette *uidA*-kan issue de la digestion du plasmide pUIDK11 par SphI a été insérée au niveau du site SphI du gène *opgG* dans le plasmide pNFW219 (Figure 61). Cette construction fut ensuite clonée au site NotI du miniTn5Sp/Sm porté par la plasmide pUT. La conjugaison entre *E. coli* et *D. dadantii* a permis l'insertion du miniTn5 dans le chromosome de *D. dadantii*. Suite à cette conjugaison entre *E. coli* et *D. dadantii*, trois insertions indépendantes du miniTn5 $P_{BAD}opgG-uidA$ -Kan dans la souche sauvage ont été étudiées. Chaque insertion a été retransmise dans la souche sauvage donnant les souches NFB3924, NFB3925 et NFB3926.

VI. Construction du mutant *uvrY*

J'ai amplifié par PCR l'aval et l'amont du gène *uvrY* en utilisant respectivement les couples d'amorces *uvrYdelstartfor-uvrYdelstartrev* et *uvrYdelendfor-uvrYdelendrev* (Figure 62). Ces produits de PCR digérés par XbaI-EcoRV et EcoRV-XmaI ont été insérés dans un pUC18 digéré par XbaI et XmaI donnant le plasmide pNFW244 (Figure 63). La cassette contenant le gène conférant la résistance à la kanamycine (bornée par des sites EcoRV) a ensuite été insérée dans ce même plasmide au niveau du site EcoRV donnant le plasmide pNFW245 (Figure 64). Ce plasmide a été transféré chez *D. dadantii* par électroporation.

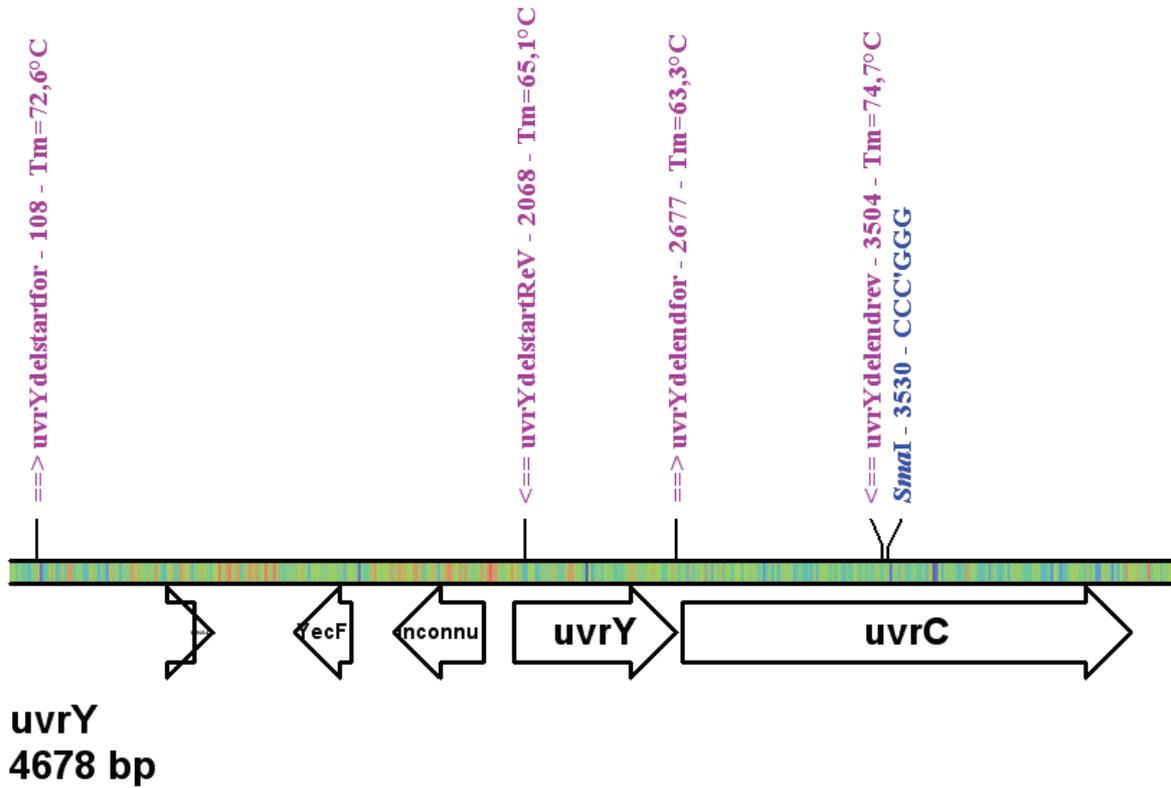


Figure 62 : Locus du gène *uvrY* de *D. dadantii*. Les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la construction du mutant nul *uvrY* sont notées.

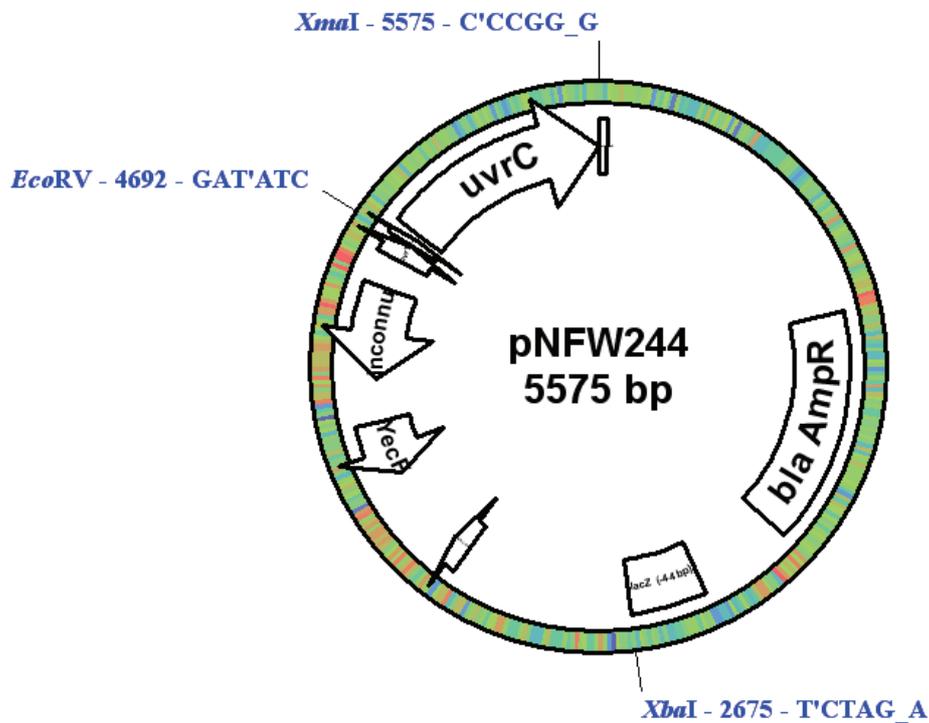


Figure 63 : Le plasmide pNFW244 contient les deux amplifications par PCR en amont et en aval du gène *uvrY* dans un pUC18.

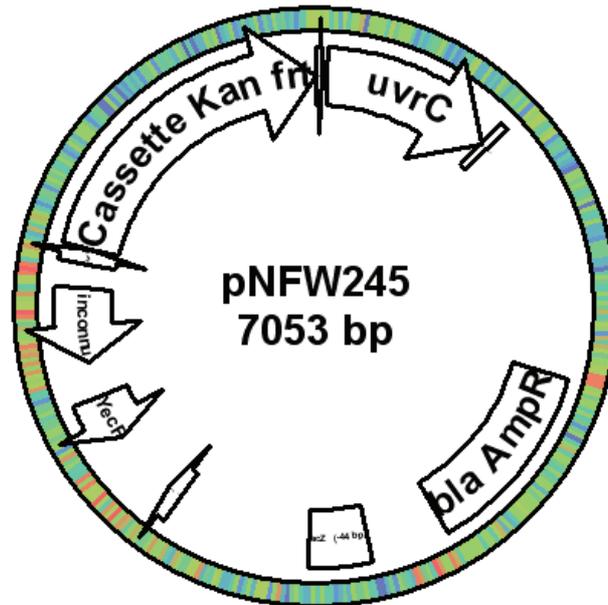


Figure 64 : Le plasmide pNFW245 contient les amplifications en amont et en aval du gène *uvrY* dans un pUC18, la cassette conférant la résistance à la kanamycine remplaçant le gène *uvrY*.

VII. Construction du mutant ABF-0046568

L'amplification par PCR des parties en amont et en aval du gène ABF-0046568 a été effectuée en utilisant les couples d'amorces S1DelStarFor-S1ADelStarRev et S1ADelEndFor-S1DelEndRev (Figure 65). Ces produits de PCR digérés par SalI-BstZ17I et BstZ17I-XbaI ont été insérés dans un pBSK digéré par SalI et XbaI donnant le plasmide pNFW252 (Figure 66). La cassette contenant le gène conférant la résistance à la kanamycine (bornée par des sites EcoRV) a ensuite été insérée dans ce même plasmide au niveau du site BstZ17I donnant le plasmide pNFW253 (Figure 67). Ce plasmide a été transféré chez *D. dadantii* par électroporation.

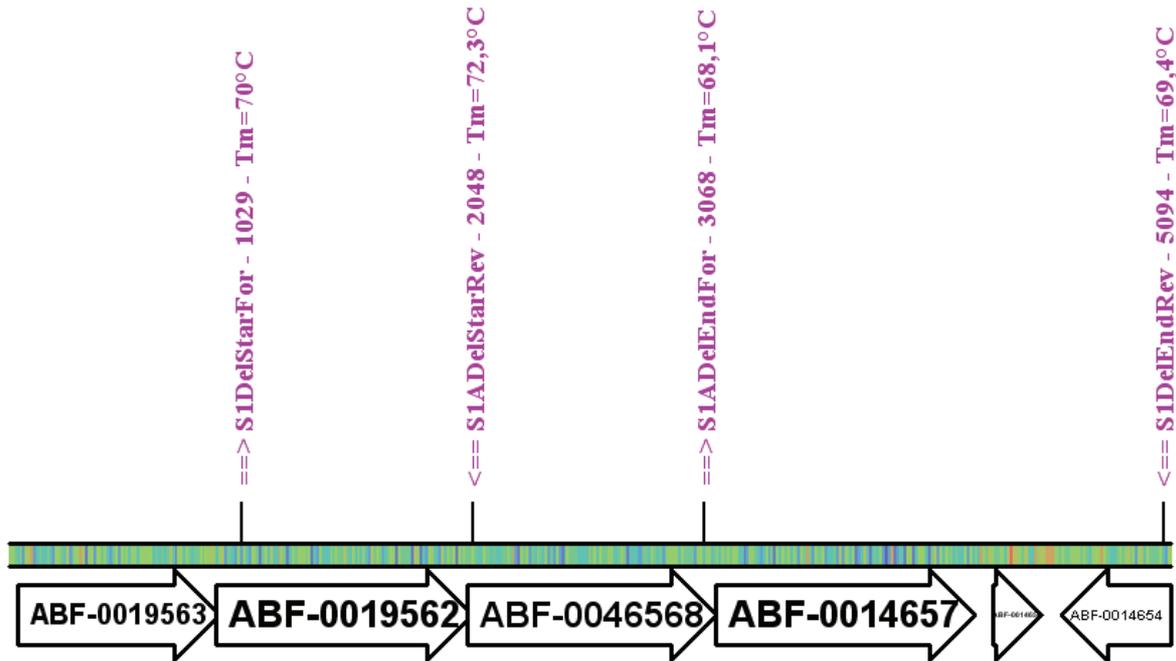


Figure 65 : Locus du gène ABF-0046568 de *D. dadantii*. Les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la construction du mutant nul sont notées.

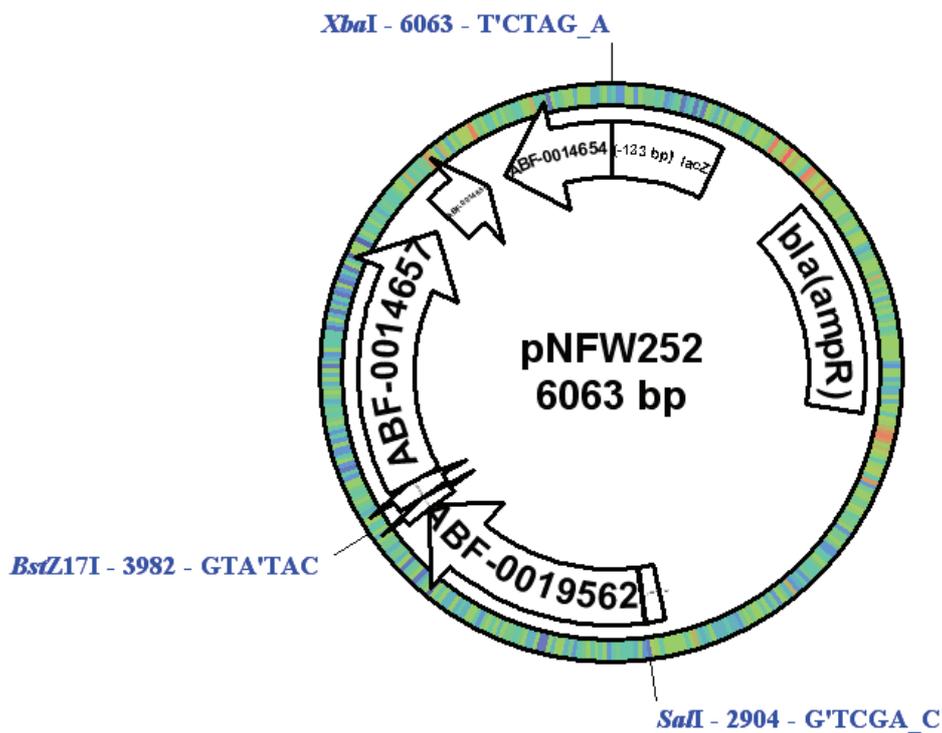


Figure 66 : Le plasmide pNFW252 contient les deux amplifications par PCR en amont et en aval du gène ABF-0046568 dans un pBSK.

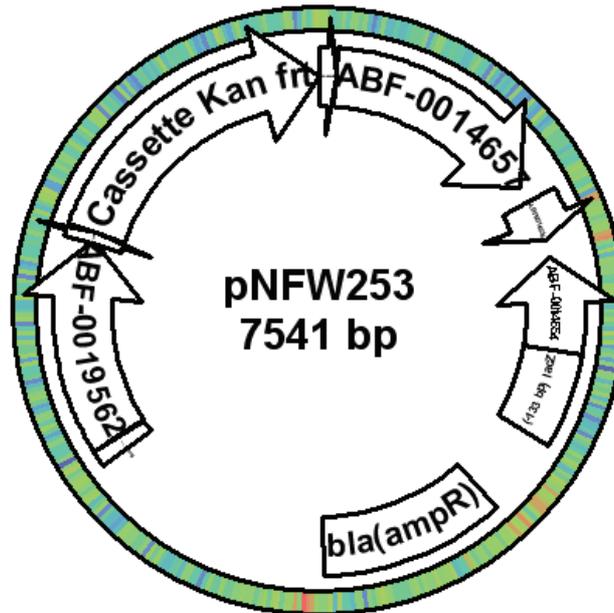


Figure 67 : Le plasmide pNFW253 contient les amplifications en amont et en aval du gène ABF-004658 dans un pBSK, la cassette conférant la résistance à la kanamycine remplaçant le gène ABF-004658.

VIII. Construction du mutant ABF-0015810

L'amplification par PCR des parties en amont et en aval du gène ABF-0015810 a été effectuée en utilisant les couples d'amorces S8DelStarFor-S8DelStarRev et S8DelEndFor-S8DelEndRev (Figure 68). Ces produits de PCR digérés par XmaI-BstZ17I et BstZ17I-XbaI ont été insérés dans un pBSK digéré par XmaI et XbaI donnant le plasmide pNFW249 (Figure 69). La cassette contenant le gène conférant la résistance à la kanamycine (bornée par des sites EcoRV) a ensuite été insérée dans ce même plasmide au niveau du site BstZ17I donnant le plasmide pNFW253 (Figure 70). Ce plasmide a été transféré chez *D. dadantii* par électroporation.

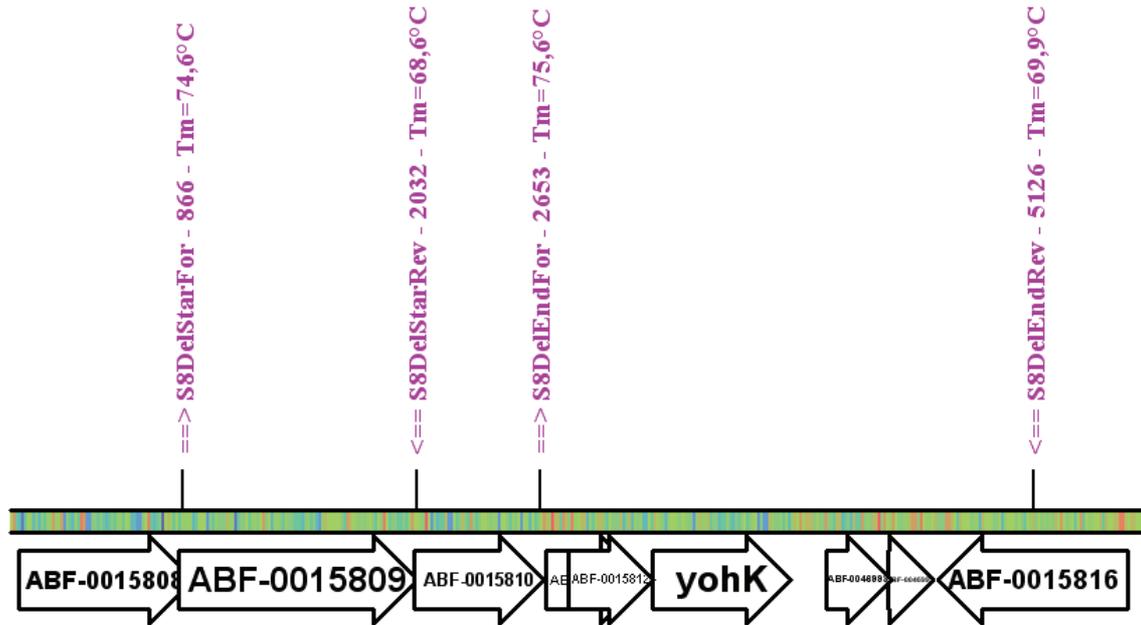


Figure 68 : Locus du gène ABF-0015810 de *D. dadantii*. Les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la construction du mutant nul sont notés.

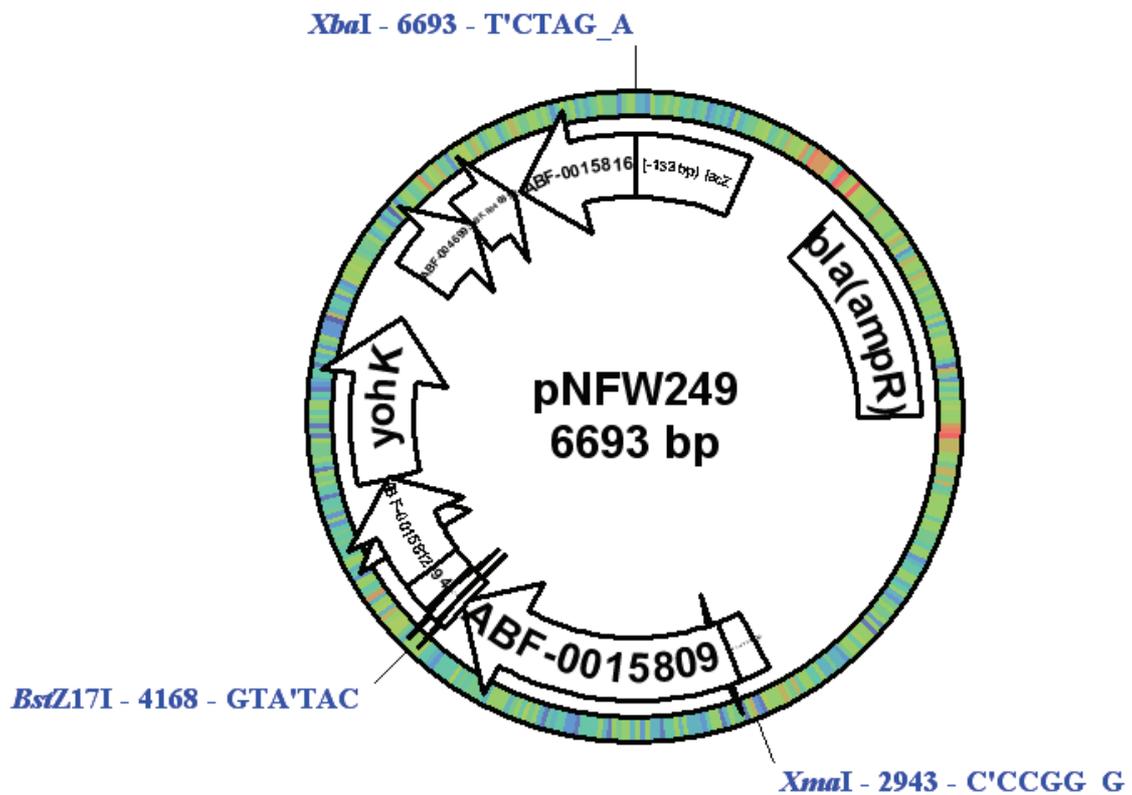


Figure 69 : Le plasmide pNFW249 contient les deux amplifications par PCR en amont et en aval du gène ABF-0015810 dans un pBSK.

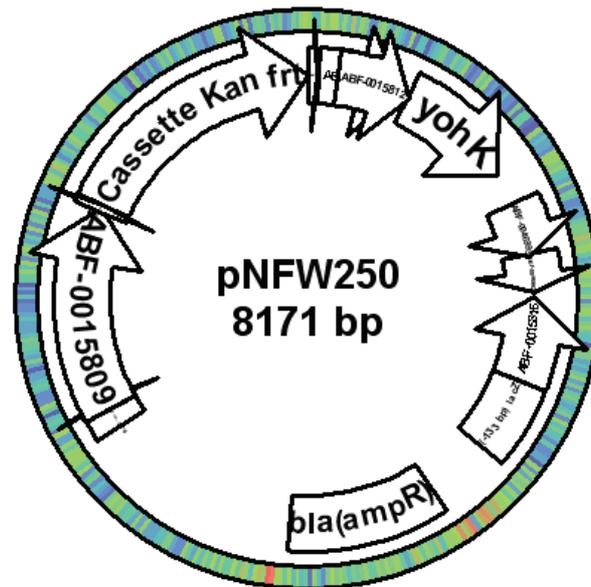


Figure 70 : Le plasmide pNFW250 contient les amplifications en amont et en aval du gène ABF-0015810 dans un pBSK, la cassette conférant la résistance à la kanamycine remplaçant le gène ABF-0015810.

E. Techniques de biochimie

I. Dosage des protéines

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

II. Dosage des OPG

La méthode d'extraction utilisée (Kennedy 1982) fait intervenir l'acide trichloracétique (TCA) dans lequel les OPG restent solubles tandis que les macromolécules sont précipitées. A 200ml de culture sont ajoutés 13 ml de TCA 100% et 2g de sérumalbumine bovine (BSA). Après une agitation forte de 10 minutes et centrifugation, le surnageant est récupéré. Ce surnageant est mélangé à 80mL de charbon actif en suspension dans l'eau (50mg/mL) puis soumis à agitation forte pendant 15 min. Les OPG s'adsorbent au charbon. Après trois lavages successifs à l'eau distillée, les molécules adsorbées sur le charbon sont extraites deux fois par 40 mL de pyridine aqueuse 15%. Les OPG sont ensuite concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif et purifiés sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 medium (Pharmacia). La colonne (2 x 45cm) est équilibrée avec de l'acétate d'ammonium 0,15M dans le propanol 7%.

L'échantillon est élué dans le même tampon à une vitesse de 15mL/H. Chaque fraction contient 1,5mL.

Les OPG sont révélés par la méthode colorimétrique utilisant l'antrone dans l'acide sulfurique (Spiro 1966). Leur quantité est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de concentration de glucose. Les fractions contenant les OPG sont rassemblés et un dosage précis est effectué selon la même méthode. Au besoin les OPG sont concentrés avant dosage.

III. Dosage des activités β -glucuronidase

Les dosages sont réalisés sur des cultures en phase exponentielle de croissance ($DO \approx 0,6$). Les cellules sont centrifugées (50mL à 7000g, 10min, 4°C) et reprises dans 10 mL de milieu 63. Les cellules sont ensuite cassées à la presse de French à $1,4 \cdot 10^7$ Pascal. Puis l'extrait est centrifugé (7000g, 10min, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Les dosages ont été réalisés 3 fois sur des extraits indépendants. Certains dosages sont effectués sur des extraits issus de la sonication de culture en phase stationnaire. Un aliquot de la culture est resuspendu dans 1mL de milieu 63 pour avoir une D.O. de 2. Après deux passages à la sonication (20s puis 15s) l'extrait est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le dosage s'effectue sur le surnageant.

L'activité β -glucuronidase est mesurée dans du milieu minimum 63 à température ambiante, par hydrolyse du 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (PNPU, 4mg/mL). La réaction se fait avec 200 μ L de substrat, 100 μ L d'échantillon (200 μ L si l'activité est faible) et 700 μ L (600 μ L) de milieu minimum 63 (Bardonnnet et Blanco 1992).

IV. Test phénotypiques : pectinase, cellulase, protéase

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

* Le test cellulase (Teather et Wood, 1982) se réalise sur boîte de milieu minimum 63 solide contenant de la carboxyméthylcellulose (0,2%), du glycérol (0,2%) et du MgSO₄ (7mM). Après 24 h de croissance à 30°C, le milieu est recouvert pendant 15 min par une solution aqueuse de rouge Congo (1g/L) qui se fixe à la carboxyméthylcellulose. L'excès de colorant

est éliminé par plusieurs lavages par du NaCl 1M durant 5 à 10 min. Les souches sécrétant des cellulases sont entourées d'un halo translucide jaune sur fond rouge, dû à l'hydrolyse de la cellulose du milieu.

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

F. Test de virulence

Les bactéries sont cultivées une nuit en milieu LB ou 63 additionné de glycérol comme source de carbone, centrifugées puis ressuspendues dans du milieu 63. Les tubercules de pomme de terre sont lavés, stérilisés en surface par du NaOCl 0,5%, rincés à l'eau stérile puis séchés par ventilation. L'inoculation est réalisée avec 10^6 et 10^7 bactéries dans un volume de 5 μ L dans un trou creusé à l'aide d'un cône de micropipette stérile. Les tubercules sont incubés à 30°C pendant 72h en atmosphère humide. Les feuilles d'endives sont lavées à l'eau stérile puis scarifiées au scalpel. L'inoculation est réalisée au niveau de l'incision avec 10^7 bactéries dans un volume de 5 μ L, les feuilles sont incubées à 30°C pendant 48 h.

Références

Références :

Aizawa, S. I. and Kubori, T. 1998. Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells.* **3**:625-634.

Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., and Buschiazzo, A. 2009. Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *PNAS.* **106**:16185–16190.

Alfano, J. R., and Collmer, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**:5655-5662.

Anantharaman, V., Balaji, S. and Aravind, L. 2006. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol. Direct.* **1**:25.

Antúnez-Lamas, M., Cabrera-Ordóñez, E., López-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O., Rodríguez-Moreno, A. and Rodríguez-Palenzuela, P. 2009. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology.* **155**:434-442.

Appleman, J. A., and Stewart, V. 2003. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J. Bacteriol.* **185**:89–97.

Bardonnet, N. and Blanco, C. 1992. *'uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:243-247.

Bayan, N., Guilvout, I. and Pugsley, A. P. 2006. Secretins take shape. *Mol. Microbiol.* **1**:1-4.

Berks BC. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**:393–404.

Bernstein HD. 2007. Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends in Microbiology.* **15**:441–447.

Bhagwat, A. A., Jun, W., Liu, L., Kannan, P., Dharne, M., Peh, B., Tall, B. D., Kothary, M. H., Gross, K. C., Angle, S., Meng, J. and Smith, A. 2009. Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are required for optimal virulence in mice. *Microbiology.* **155**:229-237.

Bijlsma, J.J., and Groisman, E.A. 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**:359–366.

Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Boccarda, M., Aymeric, J. L. and Camus, C. 1994. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bacteriol.* **176**:1524-1526.

- Bohin, J. P.** 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:11-19.
- Bohin JP and Lacroix JM.** 2007. Osmoregulation in the periplasm. In *The Periplasm*, pp 325-341. Edited by M. Ehrmann. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bontemps-Gallo, S.** 2010. Recherche de suppresseurs du phénotype pléiotrope d'un mutant dépourvu de glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Dickeya dadantii*. Master de recherche. Université des sciences et technologie de lille.
- Bouchart, F., Delangle, A., Lemoine, J., Bohin, J. P. and Lacroix, J. M.** 2007. Proteomic analysis of a non-virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology.* **153**:760-767.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Breedveld, M. W. and Miller, K. J.** 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58**:145-161.
- Briones, G., de Iannino, N. I., Steinberg, M. and Ugalde, R. A.** 1997. Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella spp.* is not osmoregulated. *Microbiology.* **143**:1115-1124.
- Burkholder, W. H., MacFadden, L. H. and Dimock, A. H.** 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology.* **43**, 522–525.
- Burse, A., Weingart, H. and Ullrich, M. S.** 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* ., *Mol. Plant. Microbe Interact.* **17**:43-54.
- Cano, D. A., Domínguez-Bernal, G., Tierrez, A., Portillo, F. G. and Casadesús, J.** 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics.* **162**:1513-1523.
- Carballes F, Bertrand C, Bouche JP, and Cam K.** 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system RcsC-RcsB. *Mol. Microbiol.* **34**:442-450.
- Charbit, A.** 2003. Maltodextrin transport through LamB. *Front. Biosci.* **8**:265-74.
- Chen, M. H., Takeda, S., Yamada, H., Ishii, Y., Yamashino, T. and Mizuno, T.** 2001. Characterization of the RcsC→YojN→RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:2364–2367
- Cho US, Bader MW, Amaya MF, Daley ME, Klevit RE, and Miller SI.** 2006. Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J. Mol. Biol.* **356**:1193–1206.
- Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J. and Bohin, J. P.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**:3127-3133.

- Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F. and Enard, C.** 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**:45-52.
- Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A. K.** 2001. 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.* **14**:516-526.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. and Raina, S.** 2001. Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. *J. Biol. Chem.* **276**:20866-20875.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**:6640-6645.
- Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C. and Cam, K.** 2001 Regulation of *osmC* Gene Expression by the Two-Component System *rscB-rscC* in *Escherichia coli*. *J. bact.* **183**:5870-5876
- Davis, R. W., Botstein, D. and Roth, J. R.** 1980. A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Debarbieux, L., Bohin, A. and Bohin, J. P.** 1997. Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6692-6698.
- Delcour A. H.** 2009. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta.* **1794**:808–816.
- Delepelaire, P. and Wandersman, C.** 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the Gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **5**:2427-2434.
- Delorenzi, M. and Speed, T.** 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics*, **18**:617-625.
- De Lorenzo, V. and Timmis, K. N.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- Dominguez-Bernal, G., Pucciarelli, M. G., Ramos-Morales, F., Garcia-Quintallina, M., Cano, D. A., Casadesus, J. and Garcia del Portillo, F.** 2004. Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* **53**:1437-1449.
- Dowhan, W.** 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity : Why are they so many lipids ? *Annu. Rev. Biochem.* **66**:199–232
- Dye, D. W.** 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *N Z J Sci* **11**:590–607.

- Dye, D. W.** 1969a. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The *carotovora* group. *N Z J Sci* **12**, 81–97.
- Dye, D. W.** 1969b. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. III. The *herbicola* group. *N Z J Sci* **12**:223-236.
- Dye, D. W.** 1969c. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. IV. The atypical *Erwiniae*. *N Z J Sci* **12**:833-839.
- Ebel, W., Vaughn, G. J., Peters, H. K. and Trempy, J. E.** 1997. Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**:6858-6861.
- Enard, C., Diolez, A., and Expert, D.** 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* **170**:2419–2426
- Ferrandez Y. and Condemine G.** 2008. Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **69**:1349-1357.
- Ferrières L. and Clarke D. J.** 2003. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol. Microbiol.* **50**:1665-82.
- Ferrières, L., Aslam, S. N., Cooper, R. M. and Clarke, D. J.** 2007. The *yjbEFGH* locus in *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production. *Microbiology.* **153**:1070-1080.
- Fiedler, W. and Roterling, H.** 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:14684-14689.
- Filloux, A., Hachani, A. and Bleves S.** 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570–1583.
- Fineran, P. C., Williamson, N. R., Lilley, K. S. and Salmond, G. P. C.** 2007. Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J. Bacteriol.* **189**:7653-7662.
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Gemert, A. V., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M., Gutierrez, C. and Cam, K.** 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:823-832.
- Francez-Charlot A., Castanie-Cornet M. P., Gutierrez C., and Cam K.** 2005. Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB his-asp phosphorelay. *J. Bacteriol.* **187**:3873–3877.
- Franza, T., Mahé, B. and Expert, D.** 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* **55**:261-275.
- Fuller-Schaefer, C. A. et Kadner R. J.** 2005. Multiple Extracellular Loops Contribute to Substrate Binding and Transport by the *Escherichia coli* Cobalamin Transporter BtuB. *J Bacteriol.* **187**:1732–1739.

- García-Calderón, C. B., Casadesús, J. and Ramos-Morales, F.** 2009. Regulation of *igaA* and the Rcs system by the MviA response regulator in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **191**:2743-2752
- García-Calderon, C. B., M. García-Quintanilla, J. Casadesus, and F. Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica rcsC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**:579-588.
- Gao R., Tao Y., and Stock A. M.** 2008. System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol. Microbiol.* **69**:1336-40.
- Gemayel R., Fortpied J., Rzem R., Vertommen D., Veiga-da-Cunha M., and Van Schaftingen E.** 2007. Many fructosamine 3-kinase homologues in bacteria are ribulosamine/erythrulosamine 3-kinases potentially involved in protein deglycation. *FEBS J.* **274**:4360-4374.
- Girgis H. S., Liu Y., Ryu W. S., and Tavazoie S.** 2007. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet.* **3**:1644–1660.
- Goehring, N. W. and Beckwith, J.** 2005. Diverse paths to midcell: Assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**:R514–R526.
- Gottesman, S., Trisler, P. and Torres-Cabassa, A.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.* **162**:1111-1119.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-4130.
- Hagiwara D, Sugiura M, Oshima T, Mori H, Aiba H, Yamashino T, Mizuno T.** 2003. Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:5735-5746.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Gijsegem, F. V. and Barras, F.** 1999. The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:887-892.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J.** 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:384–397.
- Heeb, S. and Haas, D.** 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* **14**:1351-1363.

- Hinchliffe, S. J., Howard, S. L., Huang, Y. H., Clarke, D. J. and Wren, B. W.** 2008. The importance of the Rcs phosphorelay in the survival and pathogenesis of the enteropathogenic *yersiniae*. *Microbiology*. **154**:1117-1131.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S.** 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:213-257.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U.** 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**:1379-1390.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J. Schultz, J. E., Lupas, A. N. and Coles, M.** 2006. The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*. **126**:929-940
- Inouye, M.** 2006. Signaling by Transmembrane Proteins Shifts Gears. *Cell*. **126**:829-831
- Jenal, U. and Malone, J.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385-407.
- Kadner, R. J.** 1996. Cytoplasmic Membrane in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp 58-87.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.** 2004. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*. **4**:3177-3186.
- Kastowsky, M., Gutberlet, T. and Bradaczek, H.** 1992. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **174**:4798-4806.
- Kennedy, E. P.** 1996. Membrane derivated oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*, pp. 1064-1074. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D. C.
- Komaniecka, I. and Choma, A.** 2003. Isolation and characterization of periplasmic cyclic beta-glucans of *Azorhizobium caulinodans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**:263-269.
- Lacroix, J. M.** 1989. Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. thèse. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.
- Lacroix, J. M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A. and Bohin, J. P.** 1999. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J Bacteriol.* **181**:3626-3631.
- Lacroix, J. M., Loubens, I., Tempête, M., Menichi, B. and Bohin, J. P.** 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* **5**:1745-1753.

- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Cote, E., Nasser, W. and Van Gijsegem, F.** 2008. The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ. Microbiol.* **10**:545-559.
- Lepleux, C.** 2009. Etude du stress de l'enveloppe induit par l'absence de Glucanes Périplasmiques Osmorégulés (OPG) chez *Erwinia chrysanthemi*. Master de recherche. Université des sciences et technologie de lille.
- Lequette, Y., Lanfroy, E., Cogez, V., Bohin, J. P. and Lacroix, J. M.** 2008. Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in *Escherichia coli*: the membrane-bound and the soluble periplasmic phosphoglycerol transferases are encoded by the same gene. *Microbiology.* **154**:476-483.
- Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J. P. and Lacroix, J. M.** 2004. Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. *J. Bacteriol.* **186**:3695-3702.
- Lequette, Y., Rollet, E., Delangle, A., Greenberg, E. P. and Bohin, J.** 2007. Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **153**:3255-3263.
- Liu Y. G., Whittier R. F.** 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics.* **25**:674-681.
- López-Solanilla, E., Llama-Palacios, A., Collmer, A., García-Olmedo, F. and Rodríguez-Palenzuela, P.** 2001. Relative Effects on Virulence of Mutations in the *sap*, *pel*, and *hrp* Loci of *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI.* **14**:386-393.
- Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix J. M. & Bohin, J. P.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329-340.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., de Gier, J. W.** 2005. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* **59**:329-355.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J.** 1991. Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* **252**:1162-1164.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. and Ausubel, F. M.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* **96**:47-56.
- Majdalani, N., Heck, M., Stout, V. and Gottesman, S.** 2005. Role of RcsF in Signaling to the Rcs Phosphorelay Pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:6770-6778.
- Majdalani, N. and Gottesman, S.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:379-405.

- Mariscotti, J. F. and Garcia-del Portillo, F.** 2008. Instability of the *Salmonella* RcsCDB signalling system in the absence of the attenuator IgaA. *Microbiology* **154**:1372-1383.
- Mariscotti, J. F. and Garcia-del Portillo, F.** 2009. Genome Expression Analyses Revealing the Modulation of the *Salmonella* Rcs Regulon by the Attenuator IgaA. *J. Bacteriol.* **191**:1855-1867.
- Mascher, T., Helmann, J. D. and Unden, G.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:910-938.
- Miller J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Möglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K.** 2009. Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *J. Mol. Biol.* **385**:1433–1444.
- Mousslim, C., Delgado, M. and Groisman, E. A.** 2004. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* **54**:386-395.
- Mousslim, C. and Groisman, E. A.** 2003. Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol. Microbiol.* **47**:335–44
- Mousslim, C., Latifi, T. and Groisman, E. A.** 2003. Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated *ugd* gene. *J. Biol. Chem.* **278**:50588-50595
- Narita, S. and Tokuda, H.** 2006. An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett.* **580**:1164-1170.
- Nasser, W., Reverchon, S., Vedel, R., and Boccara, M.** 2005. PecS and PecT coregulate the synthesis of HrpN and pectate lyases, two virulence determinants in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:1205-1214.
- Natale, P., Brüser, T. and Driessen, A. J. M.** 2007. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**:1735-1756.
- Nikaido, H.** 1996. Outer Membrane. *Neidhardt, R Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. (ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 29-47.*
- Oliver, D. B.** 1996. Periplasm. *Neidhardt, R Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. (ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 88-103.*
- Ophir, T. et Gutnick, D. L.** 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:740-745
- Paetzel M., Karla A., Strynadka N. C., Dalbey R. E.** 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* **102**:4549–4580.

- Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J. M., Robert-Baudouy, J. and Bohin, J. P.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**:3134-3141.
- Parker, C. T., Kloser, A. W., Schnaitman, C. A., Stein, M. A., Gottesman, S. and Gibson, B. W.** 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**:2525–38
- Parker C. T., Sperandio V.** 2009. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **11**:363-369.
- Parkins, M. D., Ceri, H. and Storey, D. G.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol.* **40**: 1215–1226.
- Pérombelon, M. C. M.** 2001. Potato diseases caused by soft rot erwinias : an overview of pathogenesis. *Plant. Pathol.* **51**:1-12.
- Philippe N, Alcaraz J-P, Coursange E, Geiselmann J, Schneider D.** 2004. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid.* **51**:246–255.
- Praillet, T., Reverchon, S., Robert-Baudouy, J., and Nasser, W.** 1997. The PecM protein is necessary for the DNA-binding capacity of the PecS repressor, one of the regulators of virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* **154**:265-270.
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. and Silhavy, T. J.** 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:911-917.
- Raetz, C. R.** 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu. Rev. Genet.* **20**:253-295.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., Ausubel, F. M.** 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899–1902.
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Worsley, P. S., Dilworth, M. J., Glenn, A. R. and Howieson, J. G.** 1999. Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology.* **145**:1307-1316.
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M. and Madden, D. R.** 2003. The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J. Biol. Chem.* **278**:39189-39196.
- Resibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, T. and Toussaint, A.** 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology.* **137**:102-112.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. and Nasser, W.** 2002. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **184**:654-665.

- Richter, G., Ritz, H. Katzenmeier, G. Volk, R. Kohnle, A. Lottspeich, F. Allendorf, D., and Bacher, A.** 1993. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:4045–4051.
- Rodriguez-Sanz, M., Antunez-Lamas, M., Rojas, C., Lopez-Solanilla, E., Palacios, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P., and Rey, L.** 2010. The Tat pathway of plant pathogen *Dickeya dadantii* 3937 contributes to virulence and fitness. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**:151–158.
- Rolin, D. B., Pfeffer, P. E., Osman, S. F., Szwegold, B. S., Kappler, F. and Benesi, A. J.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim Biophys Acta* **1116**:215-225.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F., Achouak, W. and Gardan, L.** 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1415-1427.
- Sankaran, K., and Wu, H. C.** 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **269**:19701-19706.
- Santos, R., Franza, T., Laporte, M. L., Sauvage, C., Touati, D. and Expert, D.** 2001. Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**:758-767.
- Schoonejans, E., Expert, D. and Toussaint, A.** 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysanthemi* lipopolysaccharide-defective, phi EC2-resistant mutants., *J. Bacteriol.* **169**:4011-4017.
- Shiba, Y., Matsumoto, K. and Hara, H.** 2006. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* **81**:51-56.
- Shin S., Park C.** 1995. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J. Bacteriol.* **177**:4696–4702.
- Sledjeski, D., and Gottesman, S.** 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**:1204–1206.
- Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* **8**:3–27.
- Spoonamore, J. E., Dahlgran, A. L., Jacobsen, N. E., and Bandarian, V.** 2006. Evolution of New Function in the GTP Cyclohydrolase II Proteins of *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry.* **45**:12144–12155.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C. and Palmer, T.** 2001. *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**:139-144.

- Stock, J. B., Rauch, B. and Roseman, S.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **252**:7850-7861.
- Talaga, P., Coge, V., Wieruszski, J., Stahl, B., Lemoine, J., Lippens, G. and Bohin, J. P.** 2002. Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Eur. J. Biochem. **269**:2464-2472.
- Talaga, P., Fournet, B. and Bohin, J. P.** 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J. Bacteriol. **176**:6538-6544.
- Talaga, P., Stahl, B., Wieruszski, J. M., Hillenkamp, F., Tsuyumu, S., Lippens, G. and Bohin, J. P.** 1996. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. J. Bacteriol. **178**:2263-2271.
- Teather, R. M. and Wood, P. J.** 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. **43**:777-780.
- Thérisod, H., Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P.** 1986. An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **83**:7236-7240.
- Tomenius, H., Pernestig, A. K., Mendez-Catala, C. F., Georgellis, D., Normark, S. and Melefors, O.** 2005. Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarAUvrY two component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. J. Bacteriol. **187**:7317-7324.
- Tomenius, H., Pernestig, A. K., Jonas, K., Georgellis, D., Mollby, R., Normark, S. and Melefors, O.** 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. BMC Microbiol. **6**:27.
- Torriani, A.** 1968. Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo. J. Bacteriol. **96**:1200-1207.
- Toutain, C. M., Clarke, D. J., Leeds, J. A., Kuhn, J., Beckwith, J., Holland, I. B. and Jacq, A.** 2003. The transmembrane domain of the DnaJ-like protein DjlA is a dimerisation domain. Mol. Genet. Genomics. **268**:761-770.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. and Setubal, J. C.** 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC Microbiol. **9**(suppl1):S2.
- Vanden Boom, T. V. and Cronan, J. E.** 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. Annu. Rev. Microbiol. **43**:317-343.
- Van Golde, L. M.** 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. **70**:1368-1372.
- Vieira, J., and Messing, J.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. **19**:259-268.
- Vimr, E., Steenbergen, S. and Cieslewicz, M.** 1995. Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. J. Ind. Microbiol. **15**:352-360.

- Vollmer, W., Blanot, D. and de Pedro, M. A.** 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:149-167.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**:4776-80.
- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M. and Harshey, R. M.** 2007. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J. Bacteriol.* **189**:8447–8457.
- Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C. Jr., Rogers, L. A. and Smith, G. H.** 1917. The families and genera of the bacteria preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* **2**:505-566.
- Yang, C.-H., Gavilanes-Ruiz, M., Okinaka, Y., Vedel, R., Berthuy, I., Boccara, M., Chen, J. W., Perna, N. T., Keen, N. T.** 2002. *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol Plant Microbe Interact.* **15**:472–480.
- Yang, S., Peng, Q., Zhang, Q., Yi, X., Choi, C. J., Reedy, R. M., Charkowski, A. O. and Yang, C. H.** 2008. Dynamic regulation of GacA in type III secretion, pectinase gene expression, pellicle formation, and pathogenicity of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**:133-142.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Yap, M. N., Yang, C. H., Barak, J. D., Jahn, C. E., and Charkowski, A. O.** 2005. The *Erwinia chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior. *J. Bacteriol.* **187**:639-648.
- Yap, M. N., Yang, C. and Charkowski, A. O.** 2008. The response regulator HrpY of *Dickeya dadantii* 3937 regulates virulence genes not linked to the *hrp* cluster. *Mol Plant-Microbe Interact.* **21**:304-314.
- York, W. S.,** 1995. A conformational model for cyclic beta-(1->2)-linked glucans based on NMR analysis of the beta-glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**:205-225.
- Zhao, Y., Wang, D., Nakka, S., Sundin, G. W. and Korban S. S.** 2009. Systems level analysis of two-component signal transduction systems in *Erwinia amylovora*: role in virulence, regulation of amylovoran biosynthesis and swarming motility. *BMC Genomics.* **10**:245.

Annexes

The Virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 Mutant Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans Is Restored by Inactivation of the RcsCD-RcsB Phosphorelay[∇]

Franck Bouchart,[‡] Gilles Boussemart,[‡] Anne-France Prouvost, Virginie Cogez, Edwige Madec, Olivier Vidal, Brigitte Delrue, Jean-Pierre Bohin, and Jean-Marie Lacroix*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576 IFR147, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 10 February 2010/Accepted 14 April 2010

***Dickeya dadantii* is a pectinolytic phytopathogen enterobacterium that causes soft rot disease on a wide range of plant species. The virulence of *D. dadantii* involves several factors, including the osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) that are general constituents of the envelope of proteobacteria. In addition to the loss of virulence, *opg*-negative mutants display a pleiotropic phenotype, including decreased motility and increased exopolysaccharide synthesis. A nitrosoguanidine-induced mutagenesis was performed on the *opgG* strain, and restoration of motility was used as a screen. The phenotype of the *opg* mutant echoes that of the Rcs system: high level activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay is needed to activate exopolysaccharide synthesis and to repress motility, while low level activation is required for virulence in enterobacteria. Here, we show that mutations in the RcsCDB phosphorelay system restored virulence and motility in a *D. dadantii* *opg*-negative strain, indicating a relationship between the Rcs phosphorelay and OPGs.**

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are general periplasmic constituents of the envelope of most proteobacteria. Their common features are that glucose is the sole constituent sugar, and their abundance in the periplasm increases as the osmolarity of the medium decreases. In *Enterobacteriaceae* and related bacteria, the glucose backbone synthesis is catalyzed by both products of the *opgGH* operon (5). Studies of several bacterial pathogens, including *Dickeya dadantii*, showed the importance of OPGs for virulence (4, 5, 18, 25, 26).

Dickeya dadantii is a member of the pectinolytic erwiniae causing soft rot disease in a wide range of plant species (33). The virulence of *D. dadantii* is associated with the synthesis and the secretion of a set of plant cell wall-degrading enzymes (pectinases, cellulases, and proteases) causing maceration of the plant tissues (22). *D. dadantii* synthesizes OPGs containing 5 to 12 glucose units joined by β ,1-2 linkages and branched by β ,1-6 linkages that are substituted with succinyl and acetyl residues (11). The *opgG* or *opgH* mutants unable to synthesize OPGs show a pleiotropic phenotype. They are nonvirulent on chicory leaves and potato tubers, and synthesis and secretion of pectate-lyases, cellulases, and proteases are reduced (32). Motility is severely reduced, while exopolysaccharide secretion is increased (mucoid phenotype) (32). Data suggest that the *opg* mutants are impaired in perception of the environment, which prevents *D. dadantii* from recognizing host cells, suggesting a possible dysfunction of phosphorelay signaling pathways, major systems required for environmental perception in

bacteria (6). In these systems, upon stimuli, a kinase/phosphatase sensor autophosphorylates and transfers the phosphate group to a cytoplasmic regulator which modulates expression of target genes.

Here, we show that mutations in the *rscC* and *rscB* genes, encoding, respectively, the sensor and the cognate regulator of the RcsCD-RcsB phosphorelay, suppress several phenotypes of an *opgG* mutant, including the nonvirulent phenotype on potato tubers. This suggests interactions between the RcsCD-RcsB phosphorelay and OPG molecules and constitutes a first hint at the molecular role of these ubiquitous glycans in virulence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. *D. dadantii* and *Escherichia coli* strains are listed in Table 1. Bacteria were grown at 30°C (*D. dadantii*) or 37°C (*E. coli*) in Luria-Bertani broth (LB) or in minimal medium M63 supplemented with a carbon source at a concentration of 2 g/liter (29). Solid media were obtained by adding agar at 15 g/liter. When low-osmolarity medium was required, LB without NaCl was used. Motility was tested on LB agar plates containing 4 g/liter agar. The solid media used to test the pectinases, cellulases, and proteases activities have been described previously (32).

Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin and kanamycin (Kan) at 50 μ g/ml (*E. coli*) or 25 μ g/ml (*D. dadantii*), chloramphenicol and tetracycline at 25 μ g/ml (*E. coli*) or 12.5 μ g/ml (*D. dadantii*), and spectinomycin at 100 μ g/ml (*E. coli*) or 50 μ g/ml (*D. dadantii*). X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) and X-GlcA (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) were used at a concentration of 40 μ g/ml.

Recombinant DNA techniques. Standard procedures were performed for genomic and plasmid DNA extractions (36). DNA purification was performed with Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Restriction enzymes (Biolabs), T4 DNA ligase (Biolabs), *Taq* polymerase (Eppendorf), and the large fragment of DNA polymerase I (Klenow fragment; Invitrogen) were used according to the manufacturer's recommendations.

Construction of the mutations. Plasmids and primers designed for PCR are listed in Tables 2 and 3, respectively. The chloramphenicol cassette used for gene inactivation was released from pNFCml after digestion by EcoRV. The *rscCDB* locus was cloned by shotgun. The *D. dadantii* 3937 chromosomal DNA was

* Corresponding author. Mailing address: Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576 IFR147, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 33 3 20 43 65 92. Fax: 33 3 20 43 65 55. E-mail: jean-marie.lacroix@univ-lille1.fr.

[‡] These authors contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 23 April 2010.

TABLE 1. Bacterial strains

Strain	Relevant description/genotype	Source or reference
<i>D. dadantii</i> strains		
EC3937	Wild type	Laboratory collection
NFB3500	EC3937 <i>opgG::uidA</i> Kan ^r	Laboratory collection
NFB3591	NFB3500 <i>rcsC2</i>	This study
NFB3602	EC3937 <i>opgG::Cml^r ura</i>	Laboratory collection
NFB3609	NFB3602 <i>rcsC2</i>	This study
NFB3611	EC3937 <i>rcsC2</i>	This study
NFB3682	EC3937 <i>rcsC::Cml^r</i>	This study
NFB3683	NFB3500 <i>rcsC::Cml^r</i>	This study
NFB3753	EC3937 Δ (<i>rcsCBD</i>)::Cml ^r	This study
NFB3754	NFB3500 Δ (<i>rcsCBD</i>)::Cml ^r	This study
NFB3800	EC3937 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB3805	NFB3602 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB3806	NFB3609 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB3807	NFB3611 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB3808	NFB3753 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB3809	EC3937 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB3810	NFB3602 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB3811	NFB3609 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB3812	NFB3611 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB3813	NFB3753 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB3859	NFB3811 (mini-Tn5Spe <i>rcsCBD</i>)	This study
NFB3946	EC3937 <i>opgG::FRT</i>	Laboratory collection
NFB3948	NFB3810 (mini-Tn5Spe <i>rcsC2BD</i>)	This study
NFB3983	NFB3946 Δ (<i>rcsCBD</i>)::Cml ^r	This study
NFB3991	NFB3500 (mini-Tn5Spe <i>rcsCBD</i>)	This study
NFB7007	NFB3983 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7107	NFB3983 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7127	NFB3682 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7128	NFB3682 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7154	NFB3946 <i>rcsC::Cml^r</i>	This study
NFB7191	NFB7154 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7192	NFB7154 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7199	EC3937 <i>rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7200	EC3937 <i>rcsC2 rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7202	NFB7199 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7203	NFB7200 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7205	NFB7199 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7206	NFB7200 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7208	NFB3946 <i>rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7209	NFB3946 <i>rcsC2 rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7210	NFB3500 <i>rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7211	NFB3500 <i>rcsC2 rcsB::Cml^r</i>	This study
NFB7212	NFB7208 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7213	NFB7208 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
NFB7214	NFB7209 (mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
NFB7215	NFB7209 (mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
<i>E. coli</i> strains		
JM83	F' <i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15)	40
S17-1 λ pir	<i>recA thi pro hsdR λpir</i> RP4-2-Tet::Mu-Kan::Tn7 Tmp ^r Str ^r	30

digested by SacI and XbaI, and fragments from 6 kb to 8 kb were isolated by agarose gel electrophoresis, purified, and cloned into pUC18Not digested by the same restriction enzymes (21). Plasmids extracted from mucoid colonies were analyzed by restriction. The NotI fragment from pNFW257, containing the *rcsCBD* locus, was subcloned into pUTmini-Tn5Spe (13) digested by NotI. The resulting plasmid (pNFW261) was introduced into *D. dadantii* cells by conjugation.

TABLE 2. Plasmids

Plasmids	Genotype and/or phenotype ^a	Source or reference
pUC18	Amp ^r	40
pUC18Not	Amp ^r	21
pB21	pSUP102::Tn5-B21 Tet ^r	37
pNFCml	Cml ^r	Laboratory collection
pUIDK11	Cml ^r <i>uidA</i> -Kan ^r	3
pOK1	<i>sacB oriR6K Spe^r</i>	23
pCP20	Rep(Ts) <i>flp⁺ Amp^r Kan^r</i>	9
pUTmini-Tn5Kan	mini-Tn5Kan <i>oriR6K Kan^r Amp^r</i>	13
pUTmini-Tn5Spe	mini-Tn5Spe <i>oriR6K Spe^r Amp^r</i>	13
pNFW190	pKO1 <i>opgG::Kan^r</i>	This study
pNFW198	pKO1 <i>opgG::FRT</i>	This study
pNFW138	pUC18 <i>rcsC</i>	This study
pNFW149	pUC18 <i>rcsC::Cml^r</i>	This study
pNFW161	pOK1 <i>rcsC::Cml^r</i>	This study
pNFW170	pUC18 ' <i>gyrA ΔrcsCBD menF</i> '	This study
pNFW171	pUC18 ' <i>gyrA ΔrcsCBD::Cml^r menF</i> '	This study
pNFW181	pUC18Not <i>flhD'</i>	This study
pNFW203	pUC18Not <i>flhD-uidA</i> -Kan ^r	This study
pNFW204	pUC18Not <i>ftsA-uidA</i>	This study
pNFW215	pUT(mini-Tn5Kan <i>flhD-uidA</i>)	This study
pNFW182	pUC18Not <i>ftsA'</i>	This study
pNFW193	pUC18Not <i>ftsA-uidA</i> -Kan ^r	This study
pNFW201	pUC18Not <i>ftsA-uidA</i>	This study
pNFW220	pUT(mini-Tn5Kan <i>ftsA-uidA</i>)	This study
pNFW257	pUC18Not <i>rcsCBD</i>	This study
pNFW261	pUT(mini-Tn5Spe <i>rcsCBD</i>)	This study
pNFW336	pUC18Not <i>rcsC2BD</i>	This study
pNFW339	pUT(mini-Tn5Spe <i>rcsC2BD</i>)	This study
pNFW397	pUC18Not <i>rcsCB::Cml^r rcsD</i>	This study
pNFW398	pUC18Not <i>rcsC2B::Cml^r rcsD</i>	This study

^a Cml^r, chloramphenicol resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Kan^r, kanamycin resistance; Spe^r, spectinomycin resistance; Tet^r, tetracycline resistance.

To clone the *rcsC2BD* locus, a fragment of the *rcsC* DNA encompassing the *rcsC2* mutation was amplified by PCR (*rcs5* and *rcs6* primers) from the NFB3611 chromosomal DNA, digested by SspI and NheI, and cloned into pNFW257 digested by the same enzymes (pNFW336); the cloned sequence was sequenced. The SacI-AscI fragment of pNFW336 was cloned into pNFW261 digested by the same enzymes. The resulting plasmid (pNFW339) was introduced into *D. dadantii* cells by conjugation.

To inactivate *rcsC*, *rcsC* was amplified by PCR (*rcs7* and *rcs8* primers), digested by SacI and HindIII, and cloned into pUC18 cleaved by the same enzymes (pNFW138). The cloned DNA fragment was sequenced. A Cml^r cassette was inserted into pNFW138 digested by PshAI and SmaI (pNFW149). The SalI-HpaI fragment from pNFW149, containing the *rcsC* gene disrupted by the Cml^r cassette, was cloned into the pOK1 vector digested by SalI and SmaI. The resulting plasmid (pNFW161) was introduced into *D. dadantii* cells by conjugation.

The *rcsB::Cml^r* allele was obtained by the insertion of the Cml^r cassette into pNFW257 digested by HpaI. The resulting plasmid (pNFW397) was introduced into *D. dadantii* cells by electroporation.

The *rcsC2 rcsB::Cml^r* allele was obtained by the insertion of the Cml^r cassette into pNFW336 digested by HpaI. The resulting plasmid (pNFW398) was introduced into *D. dadantii* cells by electroporation.

To delete the *rcsCBD* locus, two DNA fragments (1 kb), located upstream and encompassing, for the first fragment, the beginning of the *rcsC* coding sequence (*rcs1* and *rcs2* primers) and encompassing, for the second fragment, the beginning of the *rcsD* coding sequence (*rcs3* and *rcs4* primers), were amplified by PCR. These fragments were digested by KpnI and SmaI and by SmaI and HindIII, respectively, and cloned into pUC18 cleaved by KpnI and HindIII (pNFW170). The cloned sequence was sequenced. The Cml^r cassette was inserted into pNFW170 digested by SmaI. The resulting plasmid, pNFW171, was introduced into *D. dadantii* cells by electroporation.

The *opgG::FRT* allele was obtained as described by Cherepanov and Wackernagel (9). An *opgG::Kan^r* allele was inserted into the pOK1 plasmid (pNFW190). The Kan^r cassette is flanked by two FLP recombination target

TABLE 3. Primer sequences

Primer	Sequence ^a
rcs1	AAGGTACCTTGCCGGAAGCGAGCC GCGGCGCTCGCGGT
rcs2	AACCCGGGTCAAAGGCATACCGTA AAGGTTGTACGCAA
rcs3	AACCCGGGCGCAGGCATGAAATCA GGCTCCTGATGAAC
rcs4	AAAAGCTTTACCCCGTAATAACCTG CTTACCCACCCGC
rcs5	GCAATAGCCTCAGCCATTACCCGGA
rcs6	CGTCTGACAAAGAGTAATGC
rcs7	GCTGAACCGGTGGAAGACGATGAG CTCGACCCGTG
rcs8	CTGAAAGGTGTCTTTGCCATGCTGA ATCTTCATCCC
flhD1	CACTGCGGGGTAAGGATCCGTGAA ATATTATG
flhD2	GCATCGAGCTCGATGCGTCTGAGG TGCCGCTCTTCA
ftsA1	GATCGAGGATCCGCCCTGGATTAA ACAGCCAGCG
ftsA2	CGGCATGAGCTCATTGCCGATGCGC TCAGCCGCG
Tn5-1	CTAGGCGGCCAGATCTGATCAA
Tn5-2	TCAAAAAGTTCATCCACCCGGATC
Tn5B21-1	CATGGAAGTCAGATCCTGG
Tn5B21-2	GTTCACTCCGTTCTCTTGC

^a Restriction sites are underlined.

(FRT) sites recognized by the Flp recombinase expressed by the pCP20 plasmid. This recombinase was used to obtain a Kan^r mutant *opgG* allele by removing the Kan^r cassette. The resulting pOK1 plasmid harboring the *opgG::FRT* allele (pNFW198) was introduced into *D. dadantii* cells by conjugation.

Construction of the transcriptional fusions. The *uidA*-Kan^r cassette used for gene fusions was extracted from plasmid pUIDK11 (3). The *flhD'* and *ftsA'* DNA fragments were amplified by PCR (*flhD1* and *flhD2*, and *ftsA1* and *ftsA2* primers, respectively). The *flhD'* fragment was digested by BamHI and SacI and cloned into pUC18Not digested by the same enzymes (pNFW181). The SacI DNA fragment containing the *uidA*-Kan^r cassette was inserted into pNFW181 digested by SacI (pNFW203). The *ftsA'* DNA fragment was digested by BamHI and SacI and cloned into pUC18Not digested by the same enzymes (pNFW182). The SmaI DNA fragment containing the *uidA*-Kan^r cassette was inserted into pNFW182 digested by NgoMIV and blunt ended with the Klenow enzyme (pNFW193).

The Kan^r cassette was removed from pNFW203 (*flhD'*) and pNFW193 (*ftsA'*) by NcoI and HpaI digestion, blunt ended, and annealed (pNFW204 and pNFW201, respectively). The NotI fragments of these plasmids were subcloned into pUTmini-Tn5Kan (13) to give pNFW215 and pNFW220, respectively (Table 2), and introduced into *D. dadantii* by conjugation.

Transduction, conjugation, and transformation. Transformation of *E. coli* cells was carried out by the rubidium chloride technique (29). Plasmids were introduced in *D. dadantii* by electroporation (36) or conjugation (30). The insertions were integrated into the *D. dadantii* chromosome by marker exchange recombination in the presence of the appropriate antibiotic after successive cultures in low-phosphate medium (35). Transduction with phage Φ EC2 was carried out according to the method of Resibois et al. (34).

Nitrosoguanidine and transposon mutagenesis. *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (nitrosoguanidine) mutagenesis was performed according to Adelberg et al. (1). Briefly, NFB3500 was grown in LB medium at 30°C to mid-log phase. One milliliter of culture was centrifuged, and the pellet was washed with TM buffer [50 mM Tris, 50 mM maleic acid, 8 mM MgSO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, pH 6]. The washed bacterial pellet was resuspended in 1 ml TM buffer, nitrosoguanidine was added at a concentration of 100 µg/ml, and the suspension was incubated for 30 min at 30°C. The bacteria were then washed twice with TM buffer. The pellet was resuspended in 1 ml LB medium and divided into 10 independent aliquots of 0.1 ml. Each aliquot was diluted in 5 ml LB medium, grown overnight, and stored in 20% glycerol at -80°C. Nitrosoguanidine mutagenesis efficiency was estimated by the percentage of auxotroph mutant.

Transposon mutagenesis by Tn5-*B21* or mini-Tn5 was performed by conjuga-

tion between the *E. coli* S17-1 λ pir harboring the suicide vector containing transposon and various *D. dadantii* EC3937 derivatives. Mutants were selected on minimal medium 63 plates containing sucrose as a unique carbon source (counterselection of the *E. coli* donor) and the appropriate antibiotic (13, 37).

Localization of transposon insertions and sequence data. Transposon insertions were localized on the *D. dadantii* chromosome by inverse PCR using Tn5-1 and Tn5-2 primers (mini-Tn5 insertions) or Tn5B21-1 and Tn5B21-2 primers (Tn5-*B21* insertions) after digestion of the chromosomal DNA with TaqI. The sequence and annotations of the *D. dadantii* chromosome (J. D. Glasner, C.-H. Yang, S. Reverchon, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, J.-P. Bohin, F. van Gijsegem, S. Yang, T. Franza, D. Expert, G. Plunkett, M. San Francisco, A. Charkowski, B. Py, L. Grandemange, K. Bell, L. Rauscher, P. Rodríguez-Palenzuela, A. Toussaint, M. Holeva, S.-Y. He, V. Douet, M. Boccara, C. Blanco, I. Toth, A. D. Anderson, B. Biehl, B. Mau, S. M. Flynn, F. Barras, M. Lindeberg, P. Birch, S. Tsuyumu, X. Shi, M. Hibbing, M.-N. Yap, U. Masahiro, J. F. Kim, P. Soni, G. F. Mayhew, D. Fouts, S. Gill, F. R. Blattner, N. T. Keen, and N. T. Perna, submitted for publication) are available at <http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm>. Sequence accession numbers of the *rcsC*, *rcsB*, and *rcsD* genes are ABF-0017295, ABF-0017296, and ABF-0017297, respectively.

Determination of enzyme activities. β -Glucuronidase assays were performed on crude extracts obtained from bacteria disrupted by passage through a French pressure cell at 1.4 $\times 10^7$ Pa (20,000 lb/in²) as previously described (12). β -Glucuronidase activity was determined by monitoring spectrometrically at 410 nm the hydrolysis of PNPU (4-nitrophenyl- β -D-glucuronide).

The protein concentration was determined by the Bradford assay with bovine serum albumin as a standard (7).

OPG analysis. Measurement of OPG synthesis in *D. dadantii* was performed as previously described (32).

Pathogenicity test. Chicory leaves were inoculated as previously described (12). Bacteria from an overnight culture in LB medium were recovered by centrifugation and diluted in M63 medium. Leaves were slightly wounded in their center with a sterile razor blade and infected using 10⁷ bacteria per inoculation site. After incubation in a dew chamber for 48 h at 30°C, the length of rotted tissue was measured to estimate the disease severity. Potatoes tubers were inoculated as previously described (24). Sterile pipette tips containing a bacterial suspension of 10⁷ or 10⁸ bacteria in 5 µl were inserted into the tuber parenchyma. After 72 h at 30°C, tubers were sliced vertically through the inoculation point and the weight of decayed tissues was measured. Each measure was repeated in three independent experiments.

RESULTS

Screening and characterization of the *rcsC2* mutation. Nitrosoguanidine-induced mutations were isolated from the *opgG* strain NFB3500. Mutagenized bacteria were screened for motility by spotting 10⁶ bacteria on soft agar plates. The swarm diameter obtained for the *opgG* mutagenized strain was higher than the swarm diameter observed for the *opgG* strain. Bacteria from the periphery circumference of the halo were purified and screened for motility. Motile clones were tested for mucoidy and virulence on chicory leaves and potato tubers. None of the tested clones were virulent on chicory leaves, but two of them were virulent on potato tubers (Fig. 1) and display a nonmucoid phenotype. One of the suppressive mutations (NFB3591) was further studied because these two clones were isolated from the same mutagenesis pool.

Random transposon mutagenesis with Tn5-*B21* (Tet^r) was performed on wild-type strain EC3937 and used to map the suppressive mutation. Transposon insertions were then introduced into the suppressor strain (NFB3591) by generalized transduction using the Φ EC2 phage, and the resulting Tet^r colonies were screened for mucoidy and motility. One insertion of Tn5-*B21*, located in the gene ABF-0020432, was 24% cotransducible with the mucoid and the nonmotile phenotypes. The distance between the Tn5 insertion and the suppressive mutation is about 20 kb according to the equation of Wu (39). The distance, the phenotypes observed, and the isolation of a

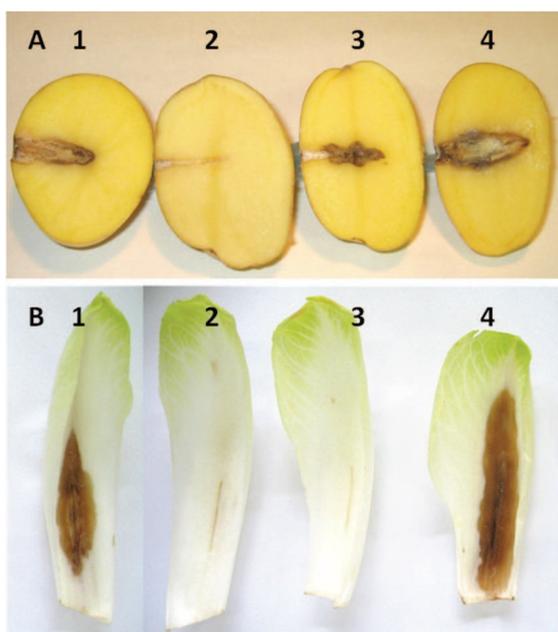


FIG. 1. Pathogenicity of the wild-type (EC3937) strain and the *opgG* (NFB3500), *opgG rcsC2* (NFB3591), and *rcsC2* (NFB3611) mutant strains of *D. dadantii* on potato tubers and chicory leaves. (A) Bacteria (10^7) of the wild-type strain (EC3937) (spot 1), the *opgG* strain (NFB3500) (spot 2), the *opgG rcsC2* strain (NFB3591) (spot 3), and the *rcsC2* strain (NFB3611) (spot 4) were inoculated into holes on potato tubers. Disease symptoms were observed after 72 h of incubation at 30°C. (B) Bacteria (10^7) of the wild-type strain (EC3937) (spot 1), the *opgG* strain (NFB3500) (spot 2), the *opgG rcsC2* strain (NFB3591) (spot 3), and the *rcsC2* strain (NFB3611) (spot 4) were inoculated into scarified chicory leaves. Disease symptoms were observed after 48 h of incubation at 30°C.

null mutation in the *rcsC* gene abolishing the mucoid phenotype of an *opgH* null mutation in *E. coli* (15), suggest that the suppressor mutation lies within the *rcsCBD* locus. DNA sequencing revealed a unique C/T transition located in the *rcsC* gene. This mutation, named *rcsC2*, led to an alanine-to-valine substitution at position 463. This A463V substitution is located in the cytoplasmic linker domain of the protein RcsC (in the vicinity of phosphorylatable H479) between the second transmembrane domain and the histidine kinase domain (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). RcsC is the transmembrane sensor component of the RcsCD-RcsB signaling pathways phosphorylating the RcsB regulator via the intermediate RcsD protein (27). These data suggest that a modification of RcsCD-RcsB signaling suppresses *opg* mutation phenotypes.

Decreased activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay signaling pathway restores motility and the nonmucoid aspect in the *opgG* strain. To test this hypothesis, null *rcsC*, *rcsB*, and Δ *rcsCBD* mutations were introduced in the *opgG* mutant strain. Motility, mucoid aspect, plant cell-degrading enzyme activity, and virulence of the double mutants were evaluated. The nonmucoid aspect of colonies was restored in the *opgG rcsC*, *opgG rcsB*, and the *opgG Δ rcsCDB* double mutant strains (Table 4). Motility was determined on swarming plates. Restoration of motility occurred in all the *opgG rcs* mutant strains compared to the *opgG* strain (Table 4), while motility levels

were similar for the wild-type and the various *rcs* strains (Table 4). These data suggest that loss of activation of RcsCD-RcsB signaling suppresses the *opg* mutation phenotype.

Decreased activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay signaling pathway is required for restoration of virulence in the *opgG* strain. Secretion of plant cell wall-degrading enzymes is required for full virulence of *D. dadantii*. Global pectinase, cellulase, and protease activities were estimated on plates. The halo diameters of degraded substrates indicated that the global exoenzyme activities were restored in the *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB*, and *opgG Δ rcsCBD* double mutant strains compared to the *opgG* single mutant strain, while activities observed for the corresponding single *rcs* mutant strains remained unaffected compared to the wild-type strain (Table 4). Thus, in *D. dadantii*, activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay represses exoenzyme synthesis, as observed with *Pectobacterium carotovorum* (2).

Virulence of the *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB*, and *opgG Δ rcsCBD* double mutant strains was assessed by measuring the severity of the disease on potato tubers and on chicory leaves. Virulence was restored in potato tubers for all the double mutant strains compared to the *opgG* single mutant strain. The weights of macerated tissues were similar for the wild-type and for all the double mutant strains (Fig. 2). On chicory leaves, no restoration of virulence was observed for any of the double mutant strains (data not shown). In contrast, for the *rcsC*, *rcsB*, and Δ *rcsCBD* single mutant strains, virulence levels were similar to those observed for the wild-type strain for both potato tubers (Fig. 2) and chicory leaves (data not shown). A slight but reproducible increase of the disease severity was observed for the *rcsC2* strain (Fig. 1 and 2). This increase depends on the RcsCD-RcsB phosphorelay since the maceration observed with the *rcsB rcsC2* double mutant was reduced to the level observed for the *rcsB* single mutant strain (Fig. 2). These data demonstrate that the restoration of virulence in the *opgG* strain is the result of decreased activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay.

Absence of OPGs induces the Rcs regulon. The RcsCD-RcsB phosphorelay regulates motility by negatively regulating the *flhDC* master operon (19, 20). The *flhD* and *flhC* genes

TABLE 4. Phenotypes observed in various *opg* and *rcs* mutant strains compared to the wild-type strain^a

Main strain or genotype (strain name)	Motility	Pectinase activity	Cellulase activity	Protease activity	Mucoidy
Wild-type (EC3937)	2.6	2.5	1.6	+	-
<i>opgG</i> (NFB3500)	1.1	1.6	1	-	+
<i>rcsC2</i> (NFB3611)	2.6	2.7	1.8	+	-
<i>opgG rcsC2</i> (NFB3591)	2.4	2.4	1.8	+	-
<i>rcsC</i> (NFB3682)	2.9	2.3	1.4	+	-
<i>opgG rcsC</i> (NFB3683)	2.8	2.3	1.8	+	-
Δ <i>rcsCBD</i> (NFB3753)	2.8	2.5	1.7	+	-
<i>opgG ΔrcsCBD</i> (NFB3754)	1.7	2.3	1.8	+	-
<i>rcsB</i> (NFB7199)	2.7	2.7	1.7	+	-
<i>opgG rcsB</i> (NFB7210)	1.6	2.3	1.5	+	-
<i>rcsB rcsC2</i> (NFB7200)	2.9	2.9	1.8	+	-
<i>opgG rcsB rcsC2</i> (NFB7211)	2.1	2.2	1.6	+	-

^a For motility, the swarm diameters are expressed in cm. Exoenzyme activities: for pectinase activity, the halo diameters of substrate degradation are expressed in cm; for cellulase activity, the halo diameters of substrate degradation are expressed in cm; for protease activity, + or - indicates presence or absence of halo of degradation. For mucoidy, - indicates a nonmucoid phenotype, while + indicates a mucoid phenotype.

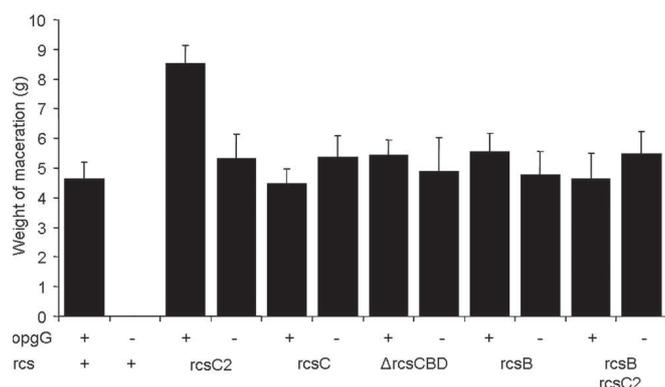


FIG. 2. Weight of maceration on potato tubers for various *opgG* and *rcs* mutant strains of *D. dadantii* measured. Bacteria (10^7) were inoculated into holes on potato tubers. Maceration (g) was weighed after 72 h of incubation at 30°C.

encode regulators activating expression of the flagellar apparatus genes. An *flhD-uidA* transcriptional fusion was constructed and introduced in the various *opgG* and *rcs* single and double mutant strains, and its expression was evaluated. In the four strains harboring the different *rcs* alleles (the *rcsC2*, *rcsC*, *rcsB*, and Δ *rcsCDB* mutants), expression of the *flhD-uidA* fusion that was 2-fold higher than that of the wild-type strain was observed (Fig. 3A), indicating that the expression of *flhDC* is repressed by activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay in *D. dadantii*. In the *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB*, and *opgG* Δ *rcsCBD* double mutant strains, expression of the *flhD-uidA* fusion that was 3- to 4-fold higher than that of the *opgG* strain was observed (Fig. 3A). Repression of the *flhDC* operon was severely diminished in the *opgG* strains harboring the *rcs* mutations. To analyze the regulation of other genes of the Rcs regulon in the absence of OPGs, an *ftsA-uidA* transcriptional fusion was constructed and introduced in the various *opgG* and *rcs* single and double mutant strains, and its expression was evaluated. The *ftsAZ* operon, needed for cell division, is activated by the RcsCD-RcsB phosphorelay (8). The *ftsAZ* operon is transcribed by several promoters, one of them, activated by the RcsB regulator, was cloned in the *ftsA-uidA* fusion. In the four strains harboring the different *rcs* alleles inactivating the RcsCD-RcsB phosphorelay, a low-level expression of the *ftsA-uidA* fusion in the different *rcs* strains was observed (Fig. 3B), indicating that the *ftsAZ* operon is positively regulated by activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay in *D. dadantii*. The *ftsA-uidA* expression of the *opgG* strain was 13- to 14-fold higher than in the *opgG rcsC2*, *opgG rcsC*, *opgG rcsB*, and *opgG* Δ *rcsCBD* double mutant strains (Fig. 3B). Thus, activation was diminished in the *opgG* strains harboring the different *rcs* mutations. These results indicate an increased activation level of the RcsCD-RcsB phosphorelay in the *opgG* mutant strain. Thus, OPGs regulate genes under the control of the Rcs phosphorelay system.

The *rcsC2* allele is dominant over the wild-type allele of *rcsC*.

The simplest explanation for the observed phenotype of the *rcsC2* allele is that this mutant gene encodes a mutant protein decreasing the kinase activity or increasing the phosphatase activity of the RcsCD-RcsB phosphorelay. These two possibilities could be distinguished genetically by phenotypic analysis

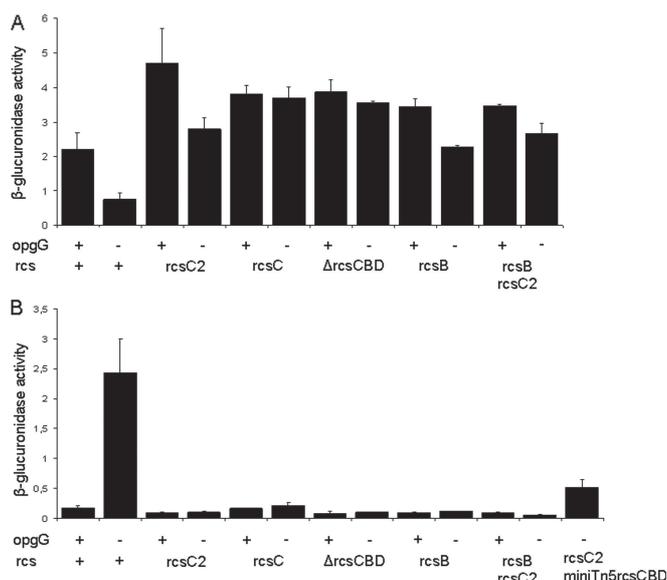


FIG. 3. Expression of the *flhD-uidA* (A) or the *ftsA-uidA* (B) gene fusions in various *opg* and *rcs* mutant strains of *D. dadantii*. Bacteria were grown in LB without NaCl at 30°C until mid-log phase and broken by passing through a French press cell, and β -glucuronidase activity was measured with PNP-UG as a substrate (see Materials and Methods). Results reported are the average of 3 independent experiments. Specific activity is expressed as the change in optical density at 410 nm (Δ OD₄₁₀) per min and per mg of protein.

of a merodiploid strain harboring both the wild-type *rcsC* allele and the *rcsC2* one. If the kinase activity is decreased, the *rcsC2* mutation will be recessive, and if the phosphatase activity is increased, the *rcsC2* mutation will be, at least in part, dominant. The *rcsCBD* locus, cloned into a minitransposon Tn5, was introduced in the *opgG rcsC2* double mutant strain. Two merodiploid clones, isolated from independent transposon mutagenesis, were tested, and both present similar phenotypes. Motility of the merodiploid strain (NFB3859) was restored, but the halo diameter was 25% lower than that in the parental *opgG rcsC2* strain (NFB3811). The expression of the *ftsA-uidA* fusion in the NFB3859 strain showed an intermediate level between the NFB3810 (*opgG*) and the NFB3811 (*opgG rcsC2*) strains (Fig. 3B). Maceration occurred in 15/30 and in 10/10 potato tubers inoculated with, respectively, 10^7 and 10^8 bacteria of the merodiploid strain. Similar results were observed when the *rcsC2* mutation was located on the transposon. A merodiploid for the wild-type *rcsCBD* locus in an *opgG* strain displayed nonvirulent and mucoid phenotypes. Taken together, these results indicate that wild-type *rcsC* and *rcsC2* alleles are codominant and suggest that the *rcsC2* mutation increases the phosphatase activity of the RcsCD-RcsB phosphorelay. However, the *rcsC* null mutation and the *rcsC2* mutation display similar phenotypes because both of them lower RcsB phosphorylation.

DISCUSSION

In this paper, we characterized a suppressor of the Opg phenotype in *D. dadantii* lying within the *rcsC* gene. The RcsCD-RcsB phosphorelay was first identified in *E. coli* as a positive regulator of exopolysaccharide synthesis (27). Further

studies demonstrated the role of this phosphorelay in regulation of motility, cell division, and virulence in various enterobacterial species, such as *E. coli*, *Salmonella enterica*, and *P. carotovorum* (2, 8, 19, 20, 28, 31). In *D. dadantii*, this phosphorelay also controls these cellular processes.

Restoration of virulence in the *opgG rcs* double mutant strains occurs only on potato tubers, despite the restoration of essential virulence factors, such as motility and exoenzyme secretion. Infection of chicory leaves by *D. dadantii* is a more demanding process than infection of potato tubers. Absence of restoration of virulence in chicory leaves may be explained in part by a more efficient defense host response in chicory leaves than in potato tubers. In addition, absence of restoration of virulence in chicory leaves may be explained by an inappropriate expression of additional bacterial virulence genes needed for infection in chicory leaves remaining in strains devoid of OPGs. This suggests that this wide-host-range phytopathogenic bacterium requires expression of different sets of genes to achieve virulence, depending on the colonized host.

The *rscC2* mutation is dominant and results in constitutive, low-level activation of the phosphorelay compatible with constitutive phosphatase activity of RcsC2. This is in agreement with the low level of RcsCD-RcsB activation needed for full virulence in *S. enterica* (14, 20, 31) and with the restoration of virulence in *D. dadantii* for *opgG* strains harboring the null mutation *rscC* or *rscB*. Three dominant mutations were isolated in the *barA* gene encoding the sensor protein of the BarA-UvrY phosphorelay system of *E. coli*. Like the *rscC2* mutation, these mutations lie within the linker domain of BarA located just upstream of the histidine kinase domain and harbor constitutive phosphatase activity (38). Constitutive kinase activity-dominant mutations were isolated in the same region of the *rscC* gene of *S. enterica* (20). These mutations suggest that this domain is important for sensor proteins to finely tune the phosphorylated level of regulators.

Isolation of the suppressor of the Opg phenotype found in the *envZ-ompR* locus in *E. coli* (17) or in the *pigX* gene in *Serratia* sp., encoding a cyclic dimeric GMP phosphodiesterase (18), the alteration of the proteome in an *opgG* mutant strain (6), and the fact that the RcsCD-RcsB phosphorelay is specific to enterobacteria (16, 27) could not be explained only by inaccurate expression of the RcsCD-RcsB phosphorelay-regulated genes. Expression of additional genes, whose expression is independent of this phosphorelay, may be affected in *opg* mutant strains. The requirement of several phosphorelay systems and the requirement of periplasmic glucans in virulence are now well established (5). The relationship between OPGs and the RcsCD-RcsB phosphorelay was shown for the regulation of colanic acid capsular polysaccharide synthesis in *E. coli* (15), but to our knowledge, this is the first study connecting these glucans and a phosphorelay system with virulence.

The constitutive activation of the RcsCD-RcsB phosphorelay could be the result of the alteration of envelope integrity in *opg* strains (6, 10, 32). This hypothesis cannot be excluded, but in this case, it is surprising that in the various *rsc opgG* double mutant strains virulence is restored and that no additional deleterious phenotypes are associated with this mutant strain. The relationship between OPGs and the RcsCD-RcsB phosphorelay may be direct or indirect and remains to be elucidated. One of the stimuli activating the RcsCD-RcsB phos-

phorelay is an upshift in osmolarity (15, 41). These are physiological conditions under which the OPG level is low, since OPG levels decrease as the medium osmolarity increases (5). Thus, one can imagine that variation of the OPG level in the periplasm modulates the RcsCD-RcsB phosphorelay activation. This modulation could occur indirectly via the IgaA protein, an attenuator of RcsCD-RcsB phosphorelay activation (14), since an *igaA* mutant and an *opgG* mutant display similar phenotypes. This hypothesis will be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guy Lippens and Florent Sebbane for carefully reading the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

We acknowledge members of the International *Erwinia* Consortium for the exchange of unpublished data concerning the *D. dadantii* 3937 genome sequence.

REFERENCES

- Adelberg, E. A., M. Mandel, and G. Chein Ching Chen. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by *N*-methyl-*N'*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**:788–795.
- Andresen, L., V. Koiv, T. Alamae, and A. Mae. 2007. The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**:229–238.
- Bardonnnet, N., and C. Blanco. 1992. *uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:243–247.
- Bhagwat, A. A., W. Jun, L. Liu, P. Kannan, M. Dharne, B. Pheh, B. D. Tall, M. H. Kothary, K. C. Gross, S. Angle, J. Meng, and A. Smith. 2009. Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are required for optimal virulence in mice. *Microbiology* **155**:229–237.
- Bohin, J.-P., and J.-M. Lacroix. 2007. Osmoregulation in the periplasm, p. 325–341. In M. Ehrmann (ed.), *The periplasm*. ASM Press, Washington, DC.
- Bouchart, F., A. Delangle, J. Lemoine, J.-P. Bohin, and J.-M. Lacroix. 2007. Proteomic analysis of a non virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology* **153**:760–767.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Carballés, F., C. Bertrand, J.-P. Bouché, and K. Cam. 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol. Microbiol.* **34**:442–450.
- Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
- Clavel, T., J.-C. Lazzaroni, A. Vianney, and R. Portalier. 1996. Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol. Microbiol.* **19**:19–25.
- Cogez, V., P. Talaga, J. Lemoine, and J.-P. Bohin. 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**:3127–3133.
- Delangle, A., A.-F. Prouvost, V. Cogez, J.-P. Bohin, J.-M. Lacroix, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2007. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi gan* locus, involved in galactan catabolism. *J. Bacteriol.* **189**:7053–7061.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568–6572.
- Dominguez-Bernal, G., M. G. Pucciarelli, F. Ramos-Morales, M. Garcia-Quintallina, D. A. Cano, J. Casadesus, and F. Garcia del Portillo. 2004. Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* **53**:1437–1449.
- Ebel, W., G. J. Vaughn, H. K. Peters III, and J. E. Trempy. 1997. Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6858–6861.
- Erickson, K. D., and C. S. Detweiler. 2006. The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Mol. Microbiol.* **62**:883–894.
- Fiedler, W., and H. Roterings. 1988. Properties of *Escherichia coli* mu-

- tants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:14684–14689.
18. **Fineran, P. C., N. R. Williamson, K. S. Lilley, and G. P. C. Salmond.** 2007. Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J. Bacteriol.* **189**:7653–7662.
 19. **Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M. P. Castanié-Cornet, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:823–832.
 20. **García-Calderon, C. B., M. García-Quintanilla, J. Casadesus, and F. Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**:579–588.
 21. **Herrero, M., V. De Lorenzo, and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
 22. **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser, and S. Reverchon.** 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:213–257.
 23. **Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas.** 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* *pv. vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**:1379–1390.
 24. **Lojkowska, E., C. Masclaux, M. Boccara, J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1995. Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **16**:1183–1195.
 25. **Loubens, I., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix, and J.-P. Bohin.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329–340.
 26. **Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47–56.
 27. **Majdalani, N., and S. Gottesman.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:379–405.
 28. **Mariscotti, J. F., and F. García-del Portillo.** 2009. Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella* Rcs regulon by the attenuator IgaA. *J. Bacteriol.* **191**:1855–1867.
 29. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 30. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575–2583.
 31. **Mousslim, C., M. Delgado, and E. A. Groisman.** 2004. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* **54**:386–395.
 32. **Page, F., S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy, and J.-P. Bohin.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**:3134–3141.
 33. **Perombelon, M., and A. Kelman.** 1980. Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**:361–387.
 34. **Resibois, A., M. Colet, M. Faelen, T. Schoonejans, and A. Toussaint.** 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology* **137**:102–112.
 35. **Roeder, D. L., and A. Collmer.** 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **164**:51–56.
 36. **Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 37. **Simon, R., J. Quandt, and W. Klipp.** 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operons fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **80**:161–169.
 38. **Tomenius, H., A.-K. Pernestig, C. F. Mendez-Catala, D. Georgellis, S. Normark, and O. Melefors.** 2005. Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *J. Bacteriol.* **187**:7317–7324.
 39. **Wu, T. T.** 1966. A model for a three point analysis of random general transduction. *Genetics* **54**:405–410.
 40. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.
 41. **Zhou, L., X. H. Lei, B. R. Bochner, and B. L. Wanner.** 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* **185**:4956–4972.

Titre : Rôle des glucanes périplasmiques osmorégulés dans la perception du signal par les systèmes à deux composants chez *Dickeya dadantii*.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des constituants du périplasme de l'enveloppe de la plupart des bactéries à Gram négatif dont la concentration augmente en réponse à la baisse d'osmolarité du milieu. Les OPG sont d'importants facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes pour l'animal ou pour les végétaux puisque leur absence conduit à une forte diminution, voire à une perte totale de la virulence. Notre modèle d'étude, *Dickeya dadantii*, est une entérobactérie phytopathogène responsable de la formation d'une pourriture molle sur un large spectre de plantes hôtes. L'absence d'OPG chez un mutant *opgG* ou *opgH* provoque un phénotype pleiotrope incluant une perte totale de la virulence. L'objectif de cette thèse est de tenter de mieux comprendre le rôle des OPG au sein du périplasme. Une mutation suppressive du phénotype Opg⁻ localisée dans le gène *rscC* a été isolée. Cette mutation *rscC2* conduit à une baisse de phosphorylation de RcsB due à l'augmentation de l'activité phosphatase de RcsC. Elle restaure de nombreux phénotypes y compris la virulence sur tubercule de pomme de terre mais pas sur feuille d'endive. La protéine RcsC fait partie du système à deux composants RcsCD-RcsB. L'ensemble des phénotypes observés indiquent que l'absence d'OPG active le système RcsCD-RcsB. L'opéron *opgGH* a été placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose, ce qui nous a permis de moduler finement la quantité d'OPG produite en fonction de la concentration d'arabinose présente dans le milieu. Nous avons ainsi pu montrer que la quantité d'OPG module l'activité du système RcsCD-RcsB. De plus, nous avons pu identifier d'autres gènes régulés par les OPG. Les résultats suggèrent que certains de ces gènes pourraient être régulés par des systèmes à deux composants différents de RcsCD-RcsB. Il semble donc que les OPG interviennent dans la signalisation cellulaire par une ou plusieurs interactions à déterminer avec différents systèmes à deux composants.

Mots Clés : glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG), système à deux composants RcsCD-RcsB, *Dickeya dadantii*, virulence, signalisation

Title : Role of Osmoregulated Periplasmic Glucans in the perception of the environment by the two-component systems in *Dickeya dadantii*

The Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPG) are general periplasmic components of the envelope of most Gram negative bacteria. Their concentration increases as the osmolarity of the medium decreases. OPG are important virulence factors in plant or animal pathogenic bacteria, since their absence leads to a strong decrease or even complete loss of virulence. Our study model, *Dickeya dadantii*, is a phytopathogenic enterobacteria causing soft rot disease in a wide range of plant species. The *opgG* or *opgH* mutants are unable to synthesize OPGs and display a pleiotropic phenotype including a complete loss of virulence. The aim of this study is to better understand the role of OPG in the periplasm. The genetic study of a suppressor mutation in an *opgG* mutant was carried out. The suppressing mutation is located in the *rscC* gene. This mutation, called *rscC2*, increases the RcsC phosphatase activity, thus leading to a decrease of RcsB phosphorylation. It restores many phenotypes including virulence on potato tubers but not on chicory leave. The RcsC protein belongs to the RcsCD-RcsB two-component system. In *D. dadantii*, all the phenotypes observed suggest that the lack of OPG leads to an increased phosphorylation of RcsB by RcsC. The *opgGH* operon was cloned under the control of an arabinose-inducible promoter which enables us to finely tune the amount of OPG in response to arabinose concentration. We show that the amount of OPG modulates the activity of the RcsCD-RcsB system. We were able to identify new OPG-regulated genes using the system described above. Results suggest that some of these genes could be to be regulated by additional regulators. Thus, OPG are involved in cell signaling pathways through one or several interactions with several two-component systems.

Keywords : Osmoregulated periplasmic glucans (OPG), RcsCD-RcsB two-component system, *Dickeya dadantii*, virulence, signalization