

Université de Lille
Faculté des Sciences et Technologies
École Doctorale Biologie Santé

Thèse

Présentée par

Marine Caby

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille,
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Rôle du phosphorelais EnvZ/OmpR chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Soutenue le 27 novembre 2020, devant la commission d'examen composée de :

- Pr Valérie LECLERE (Professeure des Universités de Lille) – Présidente du jury
- Dr Claire PRIGENT-COMBARET (Directrice de Recherche CNRS) – Rapporteuse
- Dr Jean-François COLLET (Directeur de Recherche FRS-FNRS) – Rapporteur
- Dr Florent SEBBANE (Directeur de Recherche INSERM) – Examineur
- Pr Jérôme LEMOINE (Professeur des Universités de Lyon 1) – Examineur
- Pr Jean-Marie LACROIX (Professeur des Universités de Lille) – Directeur de Thèse

Université de Lille
Faculté des Sciences de Technologies
École Doctorale Biologie Santé

Thèse

Présentée par

Marine Caby

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille,
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Rôle du phosphorelais

EnvZ/OmpR chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Soutenue le 27 novembre 2020, devant la commission d'examen composée de :

- Pr Valérie LECLERE (Professeure des Universités de Lille) – Présidente du jury
- Dr Claire PRIGENT-COMBARET (Directrice de Recherche CNRS) – Rapporteuse
- Dr Jean-François COLLET (Directeur de Recherche FRS-FNRS) – Rapporteur
- Dr Florent SEBBANE (Directeur de Recherche INSERM) – Examineur
- Pr Jérôme LEMOINE (Professeur des Universités de Lyon 1) – Examineur
- Pr Jean-Marie LACROIX (Professeur des Universités de Lille) – Directeur de Thèse

Remerciements

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

Pour commencer, je souhaite remercier les différents membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Claire Prigent-Combaret ainsi que le Dr Jean-François Collet d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux. Je souhaite également remercier le Dr Florent Sebbane d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit ainsi que le Pr Valérie Leclère d'avoir endossé la tâche de présider ce jury.

Je souhaite ensuite adresser mes plus chaleureux remerciements au Pr Jean-Marie Lacroix pour m'avoir encadrée toutes ces années même si, pour toi, cela n'a pas dû être de tout repos. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour les discussions scientifiques et non scientifiques qui ont rythmé la vie du laboratoire.

Un grand merci aux Dr Edwige Madec et au Dr Olivier Vidal avec qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler et d'apprendre. Merci pour ce que vous avez pu m'apporter durant ces 4 années que ce soit au niveau des connaissances ou de la technique. Un grand merci au Dr Brigitte Delrue pour tous les conseils professionnels et personnels que tu as pu me prodiguer. J'espère qu'un jour les étudiants se rendront compte de la chance qu'ils ont d'avoir des gens qui se battent pour eux. Moi je m'en rends compte aujourd'hui alors merci.

Un merci tout particulier au Dr Sébastien Bontemps-Gallo. Merci d'avoir pris le temps de m'aider, d'avoir répondu patiemment à mes nombreuses questions et de m'avoir remotivée quand l'envie venait à manquer. Merci au Dr Franck Bouchart pour son accueil et pour tous les conseils techniques que tu as pu me fournir. Merci Estelle pour toutes ces séances de TP et cette bonne humeur. Une pensée toute particulière à Jacqueline Dondeyne qui était présente lors de mon tout premier stage. Tu as contribué autant que les autres à mon envie d'être ici aujourd'hui alors merci.

C'était obligé que tu aies un paragraphe rien que pour toi ! Un immense merci à Peggy Gruau. Sans toi, cette thèse n'était pas prête d'arriver à sa fin. Merci pour toute l'aide que tu as pu me fournir dans mes travaux. Merci aussi pour toute cette bonne humeur et ces franches parties de rigolade. Merci de m'avoir suivie dans mes délires ce qui m'a évité de me sentir parfois bien seule. Je te souhaite bon courage pour la suite mais, de toute façon, on sait bien toutes les deux que l'on se reverra.

Je souhaite également remercier le Dr Michael Marceau ainsi que le Pr Jérôme Lemoine et Valérian Hausard pour les précieuses collaborations effectuées lors de cette étude.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'UGSF pour les nombreux conseils que vous m'avez prodigués durant ma thèse. Un merci tout particulier à Laurence Labaeye, la plus efficace des gestionnaires !

Une immense pensée pour nos ex-voisins, les E-Zyvec ! Trois années à se côtoyer cela ne s'oublie pas ! Merci pour tous ces bons moments partagés et pour les précieux conseils techniques que vous m'avez prodigués. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Une petite pensée pour tous ces petits stagiaires passés par le laboratoire : Léa, Benjamin, Maxime, Angèle, et tous les autres ... J'ai adoré vous encadrer et vous transmettre ce que je savais. J'espère que votre route vous mènera là où vous le souhaitez. Spéciale dédicace à mon successeur : Clémence. Je te souhaite bien du courage, toi qui as osé te lancer dans la folle aventure de la thèse. Quand j'ai annoncé que je passais le concours pour la bourse de thèse, on m'a prise pour une folle. Et pourtant je ne regrette rien alors profite à fond de cette riche aventure ! Trois ans c'est si long et si court à la fois. Tout ne se déroulera pas comme prévu, parfois tu auras envie de tout plaquer mais tu pourras toujours compter sur l'équipe. Alors fonce et on se voit dans trois ans quand ce sera ton tour !

On dit souvent que les vrais amis se comptent sur le doigt d'une main. Et c'est vrai ! Je vous ai rencontrés tout au long de ma vie, du collège à l'université. Joffrey, Marie, Typhanie, Antoine et Basile, je sais que quoi qu'il se passe, même si on se voit qu'une seule fois par an, je pourrai toujours compter sur vous comme vous savez que vous pourrez toujours compter sur moi. Je vous remercie d'avoir toujours été là et de m'avoir toujours encouragée. Merci de vous réjouir de mes succès et d'être là dans les moments de doute. Je vous aime les gars.

Typhanie, on s'était promis un paragraphe de folie, alors le voici ! On s'est rencontrées sur les bancs de l'université et on s'est plus lâchées. On disait en riant qu'on partageait un seul cerveau. Ça fonctionne plutôt pas mal car on est là toutes les deux aujourd'hui. Huit longues années partagées. On a ri (beaucoup), on a pleuré (de rire aussi), on a stressé (souvent), on a parlé (beaucoup, longtemps), on a voyagé (Except Chicago mais on le fera un jour ... j'espère juste que ce soit avant nos 90 ans !). Je ne compte plus les « On va boire un verre ? », le nombre de cocktails découverts, les repas improvisés, les restaurants. Mais si je devais retenir qu'une chose, ce serait tous ces fous rires de folie. Alors merci pour ton soutien indéfectible et d'avoir été là toutes ces années et encore aujourd'hui.

Ce dernier paragraphe est pour ma famille. Je ne vais pas vous remercier individuellement, cela serait beaucoup, beaucoup, beaucoup trop long ! Merci d'avoir été là pour moi tous autant que vous êtes, de m'avoir suivie et encouragée toutes ces années. Un merci tout particulier à mes parents. Sans vous, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. Je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir des parents qui m'encouragent encore et toujours quels que soient mes projets. Vous m'avez poussée à me dépasser et si je suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Alors cette thèse, c'est aussi un peu la vôtre. Mille mercis.

La dernière phrase est pour toi Robin. Merci d'être qui tu es, merci de m'avoir soutenue et encouragée toutes ces années. J'ai hâte d'entamer ce nouveau chapitre de notre vie.

Résumé

Rôle du phosphorelais EnvZ/OmpR chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Au cours de leur vie, les bactéries pathogènes sont confrontées à de nombreuses variations environnementales souvent appelées stress, notamment au cours du processus infectieux. Pour survivre et coloniser avec succès son hôte, la bactérie doit percevoir ce nouvel et hostile environnement pour s'y adapter rapidement. C'est le rôle principal assigné aux phosphorelais. Ces systèmes sont composés d'un couple capteur/régulateur. Sous l'action d'un stimulus, le capteur s'autophosphoryle et transmet son phosphate au régulateur, qui module l'activité d'un ensemble de gènes cibles permettant l'adaptation au nouvel environnement. Notre modèle expérimental *Dickeya dadantii* est une bactérie phytopathogène nécrotrophe responsable de la maladie de la pourriture molle chez un large spectre de plantes hôtes. Les variations de pH et d'osmolarité sont deux des stress souvent rencontrés et combattus par les bactéries pathogènes. Les phosphorelais EnvZ/OmpR et RcsCDB sont deux systèmes majeurs répondant à ces stress. Le laboratoire avait précédemment démontré que le niveau d'activation du système RcsCDB dépendait de la concentration en glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Leur concentration est d'autant plus élevée dans le périplasme que l'osmolarité du milieu est basse ce qui fait des OPG un intermédiaire essentiel dans la perception de l'osmolarité. Cela nous a poussé à éclaircir la relation entre EnvZ/OmpR et les OPG. J'ai montré que, contrairement à l'activation du système RcsCDB, l'activation du système EnvZ/OmpR ne dépend pas de la concentration des OPG, tout en nécessitant leur présence pour l'activation correcte de ce phosphorelais. Pour mieux comprendre le rôle du système EnvZ/OmpR chez *D. dadantii*, l'activité de ce système a été étudiée *in vivo* et *in planta*. Alors que le système EnvZ/OmpR est activé dans un milieu à pH acide et à une osmolarité élevée chez *E. coli*, mes travaux montrent que seule la variation du pH active ce phosphorelais. De plus, contrairement à *E. coli* qui possède deux porines majeures, il ne semblait exister qu'une seule porine majeure chez *D. dadantii*. Mes études ont cependant révélé l'existence d'une seconde porine apparaissant à pH acide *in vivo* et *in planta*. Ces deux porines de type OmpF sont régulées par le pH via OmpR. Passée une adaptation de quelques heures dans l'hôte, le profil de ces porines dans l'enveloppe ne change plus durant l'infection. Pourtant, le niveau d'activation d'EnvZ/OmpR durant cette même période fluctue. Ainsi, au moins un autre paramètre environnemental module l'activation de EnvZ/OmpR *in planta*. Enfin, l'absence de variation des porines dans l'enveloppe durant cette même période suggère qu'un autre régulateur, peut-être RcsCDB, permettrait le maintien de leur niveau d'expression.

Mots Clés : *Dickeya dadantii* ; phosphorelais EnvZ/OmpR ; stress environnementaux ; virulence ; glucanes périplasmiques osmorégulés ; porines

Summary

Role of EnvZ/OmpR phosphorelay in the phytopathogen bacterium *Dickeya dadantii*

During their lifetime, pathogenic bacteria are confronted with numerous environmental variations often referred to stress, particularly during infection. In order to survive and successfully colonize its host, the bacterium must perceive this new and dangerous environment to adapt quickly. This is the main role assigned to phosphorelays. These systems are composed of a sensor and a cognate regulator. Under the action of a stimulus, the sensor autophosphorylates and transmits the phosphate group to its regulator, which in turn modulates the activity of a set of target genes allowing adaptation to the new environment. Our experimental model *Dickeya dadantii* is a necrotrophic plant pathogen bacterium responsible for soft rot disease in a wide range of plant species. The variation of pH and osmolarity are two stresses often faced and fought by pathogenic bacteria. EnvZ/OmpR and RcsCDB phosphorelays are two major systems known to respond to these stresses. The laboratory had previously demonstrated that the level of activation of the RcsCDB system was dependent on the concentration of periplasmic osmoregulated glucans (OPG). Their concentration in the periplasm increases as the medium osmolarity decreases, making OPGs a major intermediate in the perception of osmolarity. This prompted us to decipher the relationship between EnvZ/OmpR and OPGs. I showed that, unlike for the activation of the RcsCDB system, the activation of EnvZ/OmpR doesn't depend on the concentration of OPGs, but still requires its presence for proper activation of the phosphorelay. To go deeper into the EnvZ/OmpR system, activities of this system have been studied *in vivo* and *in planta*. While the EnvZ/OmpR system is activated in a medium with an acidic pH and a high osmolarity in *E. coli*, my work shows that only pH variation activates this phosphorelay in *D. dadantii*. In addition, only one major porin (versus two in *E. coli*) was previously detected in *D. dadantii*. My studies revealed the existence of a second porin expressed at acidic pH *in vivo* and *in planta*. These two OmpF-like porins are regulated by the pH via OmpR. After adaptation for a few hours *in planta*, the pattern of these two porines remains the same over the rest of the infection. However, the level of OmpR activation during the same period fluctuates indicating that at least one other environmental parameter modulates the activation of EnvZ/OmpR *in planta*. The steady state level of the porines in the envelope during this same period suggests that another regulatory system, perhaps RcsCDB may maintain their expression level.

Keywords: *Dickeya dadantii* ; phosphorelay EnvZ/OmpR ; environmental stress ; virulence ; osmoregulated periplasmic glucans ; porins

Sommaire

Remerciements.....	2
Résumé	6
Liste des Figures et des Tableaux.....	12
Liste des Abréviations	15
Introduction	16
1. <i>Dickeya dadantii</i>, notre modèle d'étude	17
1.1. Taxonomie de <i>Dickeya spp</i>	17
1.2. Expansion géographique de <i>Dickeya spp</i>	18
1.3. La pathogénicité de <i>D. dadantii</i> , un processus multifactoriel	20
1.3.1. Les différentes étapes de l'infection	20
1.3.2. Le processus de dégradation de la paroi végétale.....	22
1.3.2.1. La composition de la paroi végétale.....	22
1.3.2.2. L'action des enzymes de dégradation sur la paroi végétale	23
1.3.3. La régulation d'un processus multifactoriel	25
2. L'enveloppe bactérienne, une barrière face à l'environnement	28
2.1. Structure de l'enveloppe bactérienne chez les Protéobactéries	28
2.1.1. La membrane externe	28
2.1.2. La membrane interne	29
2.1.3. Le périplasme	30
2.1.4. L'enveloppe bactérienne dans le processus infectieux	30
2.2. Composition et régulation de la synthèse du flagelle bactérien	30
2.2.1. Structure du flagelle bactérien.....	30
2.2.2. Cascade de régulation de la synthèse du flagelle	32
2.3. Rôle des exopolysaccharides dans la bactérie	33
2.4. Structure, synthèse et régulation des Glucanes Périplasmiques Osmorégulés	34
2.4.1. Structures et synthèse des OPG	34
2.4.2. Régulation de la synthèse des OPG	37
2.4.3. L'absence d'OPG s'associe à un phénotype pléiotrope.....	38
3. Les systèmes à deux composants ou phosphorelais	39
3.1. Généralités.....	39
3.1.1. Le capteur.....	40
3.1.2. Le régulateur	41
3.2. Quelques exemples de phosphorelais	43
3.2.1. Le phosphorelais EnvZ/OmpR	43
3.2.1.1. Composition du système EnvZ/OmpR	43

3.2.1.2.	Activité du système EnvZ/OmpR.....	45
3.2.1.3.	Régulation des porines OmpF et OmpC par EnvZ/OmpR	46
3.2.1.4.	Le régulon d'OmpR	49
3.2.2.	Le phosphorelais RcsCDB	49
3.2.2.1.	Composition du système RcsCDB	49
3.2.2.2.	La réponse de RcsCDB face aux stimuli.....	51
3.2.2.3.	Le système RcsCDB chez <i>D. dadantii</i>	53
3.2.3.	Le phosphorelais CpxAR.....	54
3.2.3.1.	Composition du système CpxAR	54
3.2.3.2.	La réponse du système CpxAR face aux stimuli.....	54
3.2.3.3.	Le système CpxAR chez <i>D. dadantii</i>	57
4.	Objectifs de la thèse	57
Résultats		58
1.	Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont nécessaires à l'activation du phosphorelais EnvZ/OmpR mais ne modulent pas son activité.	59
1.1.	L'inactivation du système EnvZ/OmpR entraîne un rétablissement des pectinases dans une souche dépourvue d'OPG.....	59
1.2.	Le phosphorelais EnvZ/OmpR est impliqué dans la régulation de la motilité.	62
1.3.	L'inactivation du phosphorelais EnvZ/OmpR dans une souche dépourvue d'OPG rétablit une virulence partielle en pomme de terre.....	64
1.4.	L'activation du système CpxAR ne dépend pas des OPG contrairement au phosphorelais EnvZ/OmpR.	65
1.5.	Le niveau d'activation d'EnvZ/OmpR ne dépend pas de la concentration en OPG.....	68
1.6.	Discussion	71
2.	L'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est modulée en fonction du pH, affectant de ce fait l'expression des porines OmpF.....	73
2.1.	Le gène <i>ompF</i> de <i>D. dadantii</i> présente des boîtes de fixation similaires à celles observées pour le gène <i>ompC</i> d' <i>E. coli</i>	73
2.2.	Phosphorylé, le régulateur OmpR se fixe plus efficacement à la région régulatrice d' <i>ompF</i>	76
2.3.	OmpR est nécessaire pour la transcription du gène <i>ompF</i> mais n'intervient pas dans sa modulation lors d'une variation d'osmolarité.	78
2.4.	Le régulateur RcsB est capable de se fixer en amont du gène <i>ompF</i>	79
2.5.	La transcription du gène <i>ompF</i> varie selon l'osmolarité mais pas la quantité de porines OmpF.	82
2.6.	Le génome de <i>D. dadantii</i> code deux autres porines.....	83
2.7.	L'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est modulée lors de la variation du pH.....	86
2.8.	L'expression des porines OmpF1 et OmpF2 dépend du pH.....	87
2.9.	Phosphorylée, OmpR se fixe plus efficacement à la région régulatrice d' <i>ompF2</i>	90
2.10.	Discussion	91

3. Le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important lors des premières étapes de l'infection.....	95
3.1. Le phosphorelais EnvZ/OmpR participe au phénomène de virulence.....	96
3.2. Une surphosphorylation d'OmpR entraîne une perte de virulence.....	98
3.3. Le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important durant les premières étapes de l'infection.....	102
3.4. Une fois installé, le profil des porines OmpF1 et OmpF2 ne varie plus lors de l'infection de la plante.....	106
3.5. Discussion.....	107
Discussion Générale et Perspectives	110
Procédures Expérimentales	116
1. Souches, Plasmides et Milieux.....	117
1.1. Géotypes des souches et des plasmides utilisés.....	117
1.2. Milieux de culture, conditions de croissance et conservation des bactéries.....	118
2. Techniques Génétiques.....	120
2.1. Transformation chimique d' <i>E. coli</i>	120
2.2. Électroporation de <i>D. dadantii</i>	120
2.3. Conjugaison.....	120
2.4. Transduction.....	120
3. Techniques de Biologie Moléculaire.....	121
3.1. Extraction et purification d'ADN génomique, plasmidique et d'ARN.....	121
3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	121
3.3. Enzymes de restriction et de modification.....	121
3.4. Constructions des mutants.....	122
3.4.1. Mutants <i>ompF1</i> , <i>ompF2</i> et <i>ompF3</i>	122
3.4.2. Mutants <i>ompF1F2</i> , <i>ompF2F3</i> et <i>ompF1F3</i>	122
3.4.3. Mutant <i>ompF1F2F3</i>	123
3.4.4. Mutant <i>envZ-241</i> , <i>envZ-247</i> et <i>ompR-55</i>	123
3.5. qRT-PCR (quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).....	124
3.6. Retard sur Gel.....	125
3.7. Séquençage.....	126
4. Techniques de Biochimie.....	126
4.1. Purification des protéines OmpR, RcsB et CpxR.....	126
4.2. Extraction des protéines membranaires.....	127
4.3. PhosTag.....	127
4.3.1. PhosTag <i>in vitro</i>	127
4.3.2. PhosTag <i>in vivo</i>	127
4.3.3. PhosTag <i>in planta</i>	128
4.4. Spectrométrie de Masse.....	128

5. Analyses Phénotypiques.....	128
5.1. Sécrétion d'exoenzymes et d'exopolysaccharides.....	128
5.1.1. Sécrétion de pectinases	128
5.1.2. Sécrétion de cellulases.....	129
5.1.3. Sécrétion de protéases.....	129
5.1.4. Sécrétion d'exopolysaccharides	129
5.2. Motilité	129
5.3. Tests de pathogénicité	129
5.3.1. Infection sur feuille d'endive	129
5.3.2. Infection sur tubercule de pomme de terre	129
5.4. Mesure du pH et de l'osmolarité dans la feuille d'endive	130
6. Analyses Statistiques	130
Références Bibliographiques.....	131

Liste des Figures et des Tableaux

<u>Figure 1</u> : Hôtes de <i>Dickeya spp</i> présentant la maladie de la pourriture molle.....	18
<u>Figure 2</u> : Cycle infectieux de <i>D. dadantii</i> et stress perçus par la bactérie durant les différentes étapes d'infection.	21
<u>Figure 3</u> : Composition de la paroi des cellules végétales.	23
<u>Figure 4</u> : Voie de dégradation de la pectine.	25
<u>Figure 5</u> : Composition de l'enveloppe bactérienne d'une entérobactérie à GRAM négatif.	29
<u>Figure 6</u> : Structure d'un flagelle bactérien.	31
<u>Figure 7</u> : Cascade de régulation du flagelle bactérien.....	32
<u>Figure 8</u> : Représentation structurale des quatre familles d'OPG.....	35
<u>Figure 9</u> : Modèle de biosynthèse des OPG chez <i>E. coli</i>	37
<u>Figure 10</u> : Représentation schématique de la transduction du signal par les phosphorelais.	40
<u>Figure 11</u> : Sites de fixation du régulateur OmpR en amont des gènes <i>ompF</i> et <i>ompC</i> chez <i>E. coli</i>	47
<u>Figure 12</u> : Régulation de la transcription des gènes <i>ompF</i> et <i>ompC</i> par le régulateur OmpR.	48
<u>Figure 13</u> : Représentation du système RcsCDB.	51
<u>Figure 14</u> : Une partie du régulon de RcsB chez <i>E. coli</i>	52
<u>Figure 15</u> : Activation du système RcsCDB dans une souche dépourvue d'OPG.	53
<u>Figure 16</u> : Représentation du phosphorelais CpxAR.....	55
<u>Figure 17</u> : Représentation des voies d'activation du phosphorelais CpxAR.	56
<u>Tableau 1</u> : Activité des protéases et aspect des colonies des différentes souches.	60
<u>Figure 18</u> : Effet des mutations des phosphorelais EnvZ/OmpR et CpxAR sur l'activité des cellulases (A) et des pectinases (B).....	61
<u>Figure 19</u> : Effet des différentes mutations des phosphorelais EnvZ/OmpR et CpxAR sur la motilité.....	62
<u>Figure 20</u> : Expression des gènes <i>flhD</i> et <i>fliC</i> à différentes osmolarités.....	63
<u>Figure 21</u> : Pathogénicité de la souche sauvage et des mutants <i>opgG</i> , <i>ompR</i> , <i>ompR opgG</i> , <i>envZ</i> et <i>envZ opgG</i> sur feuilles d'endive.....	64
<u>Figure 22</u> : Masse de la macération obtenue sur tubercule de pomme de terre suite à l'infection de la souche sauvage et des mutants <i>opgG</i> , <i>ompR</i> , <i>ompR opgG</i> , <i>envZ</i> et <i>envZ opgG</i>	65
<u>Figure 23</u> : Expression des gènes <i>ompF</i> et <i>kdgN</i> à différentes osmolarités.....	67
<u>Figure 24</u> : Expression des gènes <i>spy</i> et <i>degP</i> à différentes osmolarités.	68
<u>Figure 25</u> : Expression des gènes <i>opgG</i> et <i>opgH</i> à différentes concentrations de L-arabinose.	69

Figure 26 : Expression des gènes <i>ompF</i> et <i>kdgN</i> à différentes concentrations de L-arabinose.	70
Figure 27 : Comparaison et localisation des boîtes de fixation d'OmpR dans les régions régulatrices d' <i>ompF</i> et <i>ompC</i> d' <i>E. coli</i> et d' <i>ompF</i> de <i>D. dadantii</i>	74
Figure 28 : Retard sur gel des protéines OmpR d' <i>E. coli</i> et de <i>D. dadantii</i> sur les différentes régions promotrices <i>ompF</i> et <i>ompC</i> des deux espèces.	76
Figure 29 : Retard sur gel des protéines OmpR et OmpR-P sur la région promotrice d' <i>ompF</i>	77
Figure 30 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag <i>in vivo</i> de la souche sauvage à différentes osmolarités.	79
Figure 31 : Retard sur gel des protéines RcsB, RcsB-P, CpxR, CpxR-P sur la région promotrice d' <i>ompF</i>	81
Figure 32 : PhosTag <i>in vivo</i> de la souche sauvage à 330 et 700 mOsm.	81
Figure 33 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 à différentes osmolarités.	83
Tableau 2 : Récapitulatif de la présence d'orthologues des gènes <i>ompC</i> et <i>ompF</i> chez les genres <i>Dickeya</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Pectobacterium</i> et <i>Pantoea</i>	84
Figure 34 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 et des divers mutants de porines à 330 et 700 mOsm.	85
Figure 35 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag <i>in vivo</i> de la souche sauvage à différents pH.	87
Figure 36 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 à différents pH.	88
Figure 37 : Bandes du gel de porines analysées en spectrométrie de masse.	89
Figure 38 : Retard sur gel des protéines OmpR et OmpR-P sur la région promotrice d' <i>ompF2</i>	90
Figure 39 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à différents inocula.	97
Figure 40 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à une concentration bactérienne de 10 ⁴ bactéries.	98
Figure 41 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag <i>in vivo</i> des mutants du phosphorelais EnvZ/OmpR.	100
Figure 42 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à une concentration bactérienne de 10 ⁴ bactéries.	101
Figure 43 : Pathogénicité sur feuilles d'endives des souches sauvage et <i>envZ-241</i> à des concentrations bactériennes de 10 ⁴ et 10 ⁷ bactéries.	102
Figure 44 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag <i>in planta</i>	103
Figure 45 : Mesure du pH dans des endives infectées ou non à 0H, 24H, 48H, 72H.	104
Figure 46 : Mesure de l'osmolarité dans des endives infectées à 0H, 24H, 48H, 72H.	105
Figure 47 : Profil des porines OmpF1 et OmpF2 <i>in planta</i>	106
Tableau 3 : Souches et plasmides utilisés lors de cette étude.	118

<u>Tableau 4</u> : Liste des amorces utilisées lors des différents clonages	124
<u>Tableau 5</u> : Liste des amorces utilisées lors des expérimentations de qRT-PCR	125
<u>Tableau 6</u> : Liste des amorces utilisées lors des PCR effectuées pour les expériences de retard sur gel.....	126

Liste des Abréviations

AA	Acide Aminé
ACP	Acyl Carrier Protein ou Protéine porteuse d'acyl
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine 5' Triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumine ou Albumine de Sérum Bovin
CA	Site Catalytique de Liaison à l'ATP
CMC	Carboxyméthylcellulose
CRP	Récepteur de l'AMP Cyclique
DHp	Domaine de Dimérisation et de Phosphorylation de l'Histidine
DL50	Dose Létale 50
DKI	5-céto-4-désoxyuronate
HAMP	Histidine kinase, Adenyl cyclase, Methyl-accepting chemotaxis protein, and Phosphatase
His	Histidine
HK	Histidine Kinase
HPt	Domaine de Phosphotransfert contenant l'Histidine
KDG	2-céto-3-désoxygluconate
Lpp	Lipoprotéine de Braun
LPS	Lipopolysaccharide
MDO	Oligosaccharides Dérivés de la Membrane
NAcGlc	N-acétylglucosamine
NAcMur	N-acétylmuramique
OMP	Protéine de la Membrane Externe
OPG	Glucanes Périplasmiques Osmorégulés
PA	Phosphoramidate
PAM	Peptide Antimicrobien
PAS	Per Arnt Sim
PCWDE	Plant Cell Wall Degradation Enzymes ou Enzyme de Dégradation de la Paroi des Cellules Végétales
PG	Peptidoglycane
PGA	Polygalacturonate
ROS	Reactive Oxygen Species ou Espèce Réactive de l'Oxygène
RR	Régulateur de Réponse
T3SS	Système de Sécrétion de Type 3
TCS	Two-Component System ou Système à Deux Composants
UV	Ultraviolet
wHTH	winged-Helix-Turn-Helix ou motif Hélice-Tour-Hélice ailé

Introduction

1. *Dickeya dadantii*, notre modèle d'étude

1.1. Taxonomie de *Dickeya* spp

La classification des entérobactéries phytopathogènes a beaucoup évolué au cours du temps. Initialement, toutes les bactéries à GRAM négatif phytopathogènes ayant une forme de bacille, anaérobies facultatives et possédant une ciliature flagellaire péritriche sont regroupées dans un seul et unique genre : *Erwinia* (Winslow *et al.*, 1920). Dans ce genre, on distingue quatre sous-divisions : les *Erwiniae* nécrosantes, les *Erwiniae* pectinolytiques, les *Erwiniae* à pigments jaunes et les *Erwiniae* atypiques. A la fin des années 1990, des études de séquences d'ADNr 16S chez différentes espèces d'*Erwiniae* sont menées par Hauben *et al.* (1998), ce qui permet la formation de quatre nouveaux genres :

- *Erwinia* où on retrouve les *Erwiniae* nécrosantes tels que *Erwinia amylovora*.
- *Pectobacterium* où on retrouve les *Erwiniae* capables de fortes activités pectinolytiques tels que *Pectobacterium carotovorum*.
- *Brenneria* où on retrouve une partie des *Erwiniae* parasites des plantes lignifiées tels que *Brenneria salicis*.
- *Pantoea* où on retrouve les *Erwiniae* produisant un pigment jaune tels que *Pantoea agglomerans*.

Jusqu'en 2005, *Dickeya dadantii*, également appelée *Erwinia chrysanthemi*, appartenait au genre *Pectobacterium*. Une étude menée par Samson *et al.* a remis en question cette classification. En effet, des études génotypiques et phénotypiques réalisées sur 75 souches différentes d'*Erwinia chrysanthemi* ont entraîné la création d'un nouveau genre : *Dickeya*. Six espèces ont été mises en évidence : *Dickeya dieffenbachiae*, *Dickeya zaeae*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya paradisiaca* et *Dickeya dadantii* (Samson *et al.*, 2005). En 2012, Brady et ses collaborateurs classifient *D. dieffenbachiae* en l'associant à *D. dadantii* sous l'appellation de *D. dadantii* subsp *dieffenbachiae*, créant également de ce fait *D. dadantii* subsp *dadantii*. Récemment, de nouvelles espèces ont rejoint le genre *Dickeya*: *Dickeya solani* (isolée de pommes de terre infectées en 2014), *Dickeya aquatica* (isolée des nappes phréatiques en 2014) et *Dickeya fangzhongdai* (extraite de l'écorce de poiriers *Pyrus pyrifolia* en 2016) (Van der Wolf *et al.*, 2014 ; Parkinson *et al.*, 2014 ; Tian *et al.*, 2016). Peuvent être ajoutées à cette liste deux autres espèces ne possédant pas encore de dénomination : une souche isolée de la macération de feuilles d'orchidées *Phalaenopsis* et une souche isolée de plants d'*Ananas comosus* (Alič *et al.*, 2017 ; Marrero *et al.*, 2013).

1.2. Expansion géographique de *Dickeya* spp

Dickeya dadantii est responsable de la maladie de la pourriture molle sur un large spectre d'hôtes. Ce dernier comprend près de 35% des plantes issues du clade des angiospermes (Ma *et al.*, 2007). Les espèces du genre *Dickeya* sont capables d'infecter aussi bien les monocotylédones que les dicotylédones regroupant dans ses cibles 21 familles réparties sur 15 ordres de plantes angiospermes (Ma *et al.*, 2007). A l'origine tropicale, *D. dadantii* émerge dans les pays tempérés et se retrouve désormais dans tous les pays du monde (Source : European and Mediterranean Plant Protection Organization). Accompagnée de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani*, elle est notamment de plus en plus présente en Europe et en Israël causant des dégâts considérables que ce soit sur les plantes potagères comme *Solanum tuberosum* (pomme de terre), *Cichorium intybus* (endive) et *Vanilla planifolia* (vanille) ou ornementales avec *Saintpaulia ionantha* et *Pelargonium* (Toth *et al.*, 2011 ; Charkowski, 2018) (Figure 1). Les *Dickeya* spp sont responsables de nombreuses épidémies sur les cultures de pomme de terre notamment en Israël en 2005 (*D. solani* et *D. dadantii*), en Irlande en 2011 ou encore aux États-Unis en 2014 (*D. dianthicola* principalement mais *D. solani* et *D. dadantii* sont retrouvées également) (Toth *et al.*, 2011 ; Charkowski, 2018). L'impact économique majeur de cette dégradation se chiffre en milliards d'euros de pertes.

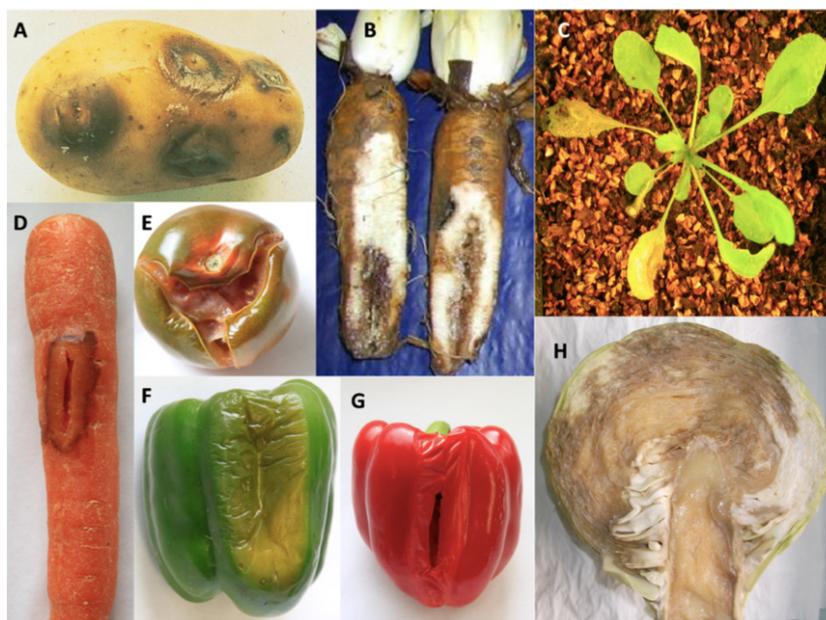


Figure 1 : Hôtes de *Dickeya* spp présentant la maladie de la pourriture molle

A : *Solanum tuberosum* (Pomme de terre) ; B : *Cichorium intybus* (Racines d'endives) ;

C : *Arabidopsis thaliana* ; D : *Daucus carota* subsp. *sativus* (Carotte) ; E : *Solanum lycopersicum* (Tomate) ; F & G : *Capsicum annuum* (Poivrons) ; H : *Brassic oleracea* (Chou). (Reverchon et Nasser, 2013)

Pourquoi *D. dadantii* et les *Dickeya spp* en général sont-elles présentes désormais dans tous les pays du monde ? La principale hypothèse repose sur la hausse des échanges commerciaux cumulée à l'exportation de plants contaminés de manière latente (Toth *et al.*, 2011). D'autres hypothèses sont également avancées. On dénote notamment de mauvaises pratiques de culture comme la monoculture ou encore l'absence de méthodes prophylactiques (Charkowski, 2018). Le réchauffement climatique est également mis en avant pour expliquer l'expansion des *Dickeya spp*. En effet, ces dernières sont dotées d'un grand pouvoir d'adaptation notamment en ce qui concerne la température : *D. dadantii* a un pouvoir infectieux plus important à 28°C mais elle reste capable de se développer jusqu'à 39°C (Charkowski, 2018). *D. dadantii* est également capable d'utiliser certains insectes comme hôte alternatif, notamment le puceron des bois *Acyrtosiphon pisum*. *D. dadantii* est la seule bactérie phytopathogène capable de sécréter des toxines Cyt qui lui permettent de coloniser le puceron. Cette enzyme, retrouvée chez les zoopathogènes, permet aux bactéries de perforer l'épithélium intestinal permettant ainsi sa dissémination. Une fois colonisé, l'insecte peut infecter de nouvelles plantes saines (Grenier *et al.*, 2006 ; Costechareyre *et al.*, 2012).

Il n'existe actuellement aucune méthode efficace pour éliminer les bactéries de la pourriture molle ; il n'y a donc pas moyen de guérir les plantes infectées. De nombreuses recherches sont effectuées pour contrer ce fléau. En Amérique du Nord, des solutions sont mises en place notamment le traitement des semences ou des cultures par des procédés biologiques, physiques ou chimiques comme la pulvérisation de cuivre. La sélection végétale est également mise en avant afin d'obtenir des plants ayant une meilleure tolérance aux pathogènes en optimisant par exemple la sécrétion de peptides antimicrobiens (Charkowski, 2018). En parallèle, l'utilisation de bactéries antagonistes et de bactériophages offre de possibles solutions. Des bactéries antagonistes comme *Serratia plymuthica* ont été testées pour limiter l'infection en pommes de terre par *Dickeya spp* avec des résultats prometteurs lors d'essais en serre (Czajkowski *et al.*, 2012). Les bactériophages offrent la possibilité la plus importante de ces dernières années avec un séquençage complet des génomes des phages de *Dickeya spp* depuis 2012. Il existe notamment des phages à larges spectres d'hôtes touchant à la fois *Pectobacterium* et *Dickeya*, réduisant ainsi la maladie de la pourriture molle chez la pomme de terre (Czajkowski, 2016).

1.3. La pathogénicité de *D. dadantii*, un processus multifactoriel

1.3.1. Les différentes étapes de l'infection

Principalement retrouvée dans les sols, *D. dadantii* est une bactérie saprophyte qui a la capacité de devenir pathogène lorsque son hôte est blessé. Le processus débute avec une phase de vie qualifiée d'épiphyte. Durant cette phase, la bactérie est présente à la surface de la plante et cherche à entrer dans les tissus végétaux. Pour cela, elle a besoin d'une lésion de la plante. Une plante blessée produit une molécule d'alerte qui est également un chimioattracteur puissant : l'acide jasmonique (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009 [A]). *D. dadantii* reconnaît cette molécule et se dirige vers elle, notamment grâce à ces capacités de motilité et de chimiotactisme (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009 [B]). La phase asymptomatique débute alors.

Une fois entrée, la bactérie colonise l'apoplaste, espace formé par les interstices cellulaires permettant le passage d'eau et de solutés dans la plante. Elle est alors confrontée à de nombreuses variations de son environnement, notamment en se retrouvant dans un milieu acide (pH 4 à 6,5 selon les espèces) et de basse osmolarité (Reverchon et Nasser, 2013 ; Figure 2). Dès l'entrée de la bactérie, la plante active ses systèmes de défense, l'acide jasmonique servant également de médiateur dans cette réponse (Taurino *et al.*, 2014). Une fois dans l'apoplaste, la bactérie entame sa phase de multiplication alors que la plante commence à synthétiser des ROS (Reactive Oxygen Species ou Espèces Réactives de l'Oxygène), entraînant un stress oxydatif, ainsi que des peptides antimicrobiens et des phytoalexines (composés phénoliques végétaux appartenant aux flavonoïdes) pour combattre l'infection (Reverchon et Nasser, 2013 ; Figure 2). Afin de contrer ces réactions de défenses, la bactérie produit de nombreuses molécules qui lui permettent de résister au stress oxydatif comme l'indigoïdine, molécule capable de piéger les ROS (Reverchon *et al.*, 2002), ou encore différentes enzymes anti-oxydantes telles que les superoxydes dismutases ou les catalases (Reverchon et Nasser, 2013). A ce stade-là, deux scénarios sont possibles : soit la réponse de la plante est suffisamment forte et stoppe l'infection, soit la bactérie parvient à surmonter ces attaques et passe à la dernière phase de l'infection : la phase symptomatique.

Durant la phase symptomatique, grâce entre autres à l'alcalinisation du milieu causée par la réponse immunitaire de la plante (Mathieu *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2016), la bactérie sécrète une batterie de PCWDE (Plant Cell Wall Degradation Enzymes ou Enzymes de Dégradation de la Paroi Cellulaire Végétale) : cellulases, protéases et surtout pectinases qui vont hydrolyser les différents composants de la paroi végétale et conduire à la lyse des cellules (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Cette lyse cellulaire entraîne une augmentation de l'osmolarité du milieu et permet à la bactérie de se nourrir, se multiplier et se disséminer de

proche en proche, contaminant ainsi les tissus sains de la plante. La macération, signe visible de l'infection, s'étend à travers la plante jusqu'à sa mort (Figure 2).

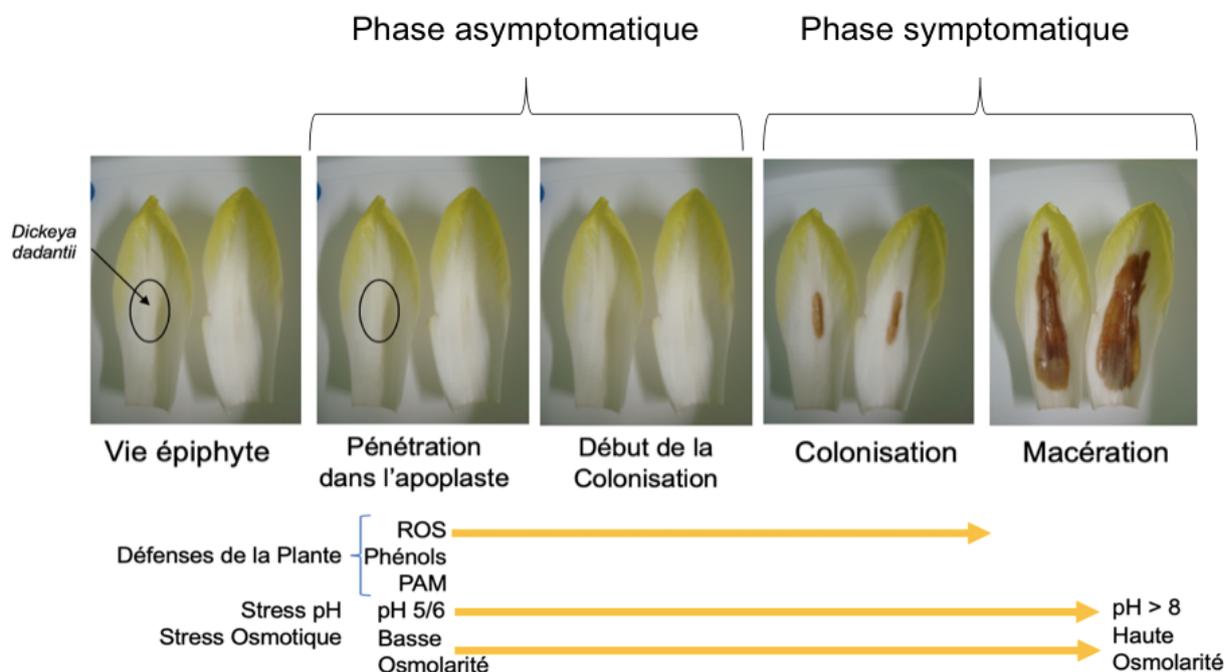


Figure 2 : Cycle infectieux de *D. dadantii* et stress perçus par la bactérie durant les différentes étapes d'infection.

Adapté de Reverchon et Nasser, 2013

L'entièreté de ces phénomènes n'est possible qu'à l'aide de nombreuses fonctions bactériennes. Parmi les processus impliqués, on peut citer entre autres :

- La motilité et le chimiotactisme (Jahn *et al.*, 2008) ;
- La sécrétion d'exopolysaccharides (Condemine *et al.*, 1999)
- La capture du fer notamment grâce à la présence de deux sidérophores : la chrysobactine et l'achromobactine (Franza *et al.*, 2002) ;
- Les systèmes de sécrétion de type II permettant la sécrétion des PCWDE (Tran *et al.*, 2013) ;
- Les systèmes contrant les défenses de la plante comme les systèmes de protection contre les peptides antimicrobiens (López-Solanilla *et al.*, 1998) ...

La sécrétion d'un large éventail d'enzymes (pectinases, cellulases, protéases ...) est également essentielle pour parfaire le processus de macération car ce sont elles qui vont permettre le démantèlement de la paroi cellulaire végétale (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996)

1.3.2. Le processus de dégradation de la paroi végétale

1.3.2.1. La composition de la paroi végétale

La paroi végétale forme un squelette externe entourant la bicouche lipidique permettant de donner à la cellule sa forme et de supporter des pressions de turgescence élevées. Cette barrière physique protège les cellules végétales contre l'infection et les dommages causés par les agents pathogènes. En plus de son action protectrice, la paroi permet également d'assurer une certaine rigidité au tissu végétal. Elle est composée de plusieurs niveaux : la paroi primaire, la paroi secondaire et la lamelle moyenne (Figure 3). Au niveau de cette paroi sont retrouvés de petits orifices de communication appelés plasmodesmes permettant les échanges aqueux. La paroi primaire et la paroi secondaire sont constituées des mêmes composants mais dans des proportions différentes. La cellulose, l'hémicellulose, la pectine et les protéines structurales représentent en moyenne respectivement 30%, 30%, 35% et 5% de la paroi (Cosgrove, 1997)

La cellulose, premier composant de la paroi, est constituée de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ formant ainsi des microfibrilles de longueur indéterminée. Le deuxième composant est l'hémicellulose. C'est un polymère de glucose sur lequel sont branchées des chaînes latérales courtes composées de xylose, galactose, arabinose ou encore fucose. Le dernier composant des parois est la pectine. La pectine est un polysaccharide hétérogène dont le monomère de base est le D-galacturonate. Ces derniers sont liés en $\alpha(1\rightarrow4)$. Le galacturonane est généralement estérifié et lié à des molécules de rhamnogalacturonanes s'intercalant entre les différentes chaînes. Certains monomères de galacturonate sont méthylestérifiés ou acétylestérifiés (Harholt *et al.*, 2010). En plus de ces trois composants, diverses protéines sont intercalées dans la paroi (Figure 3).

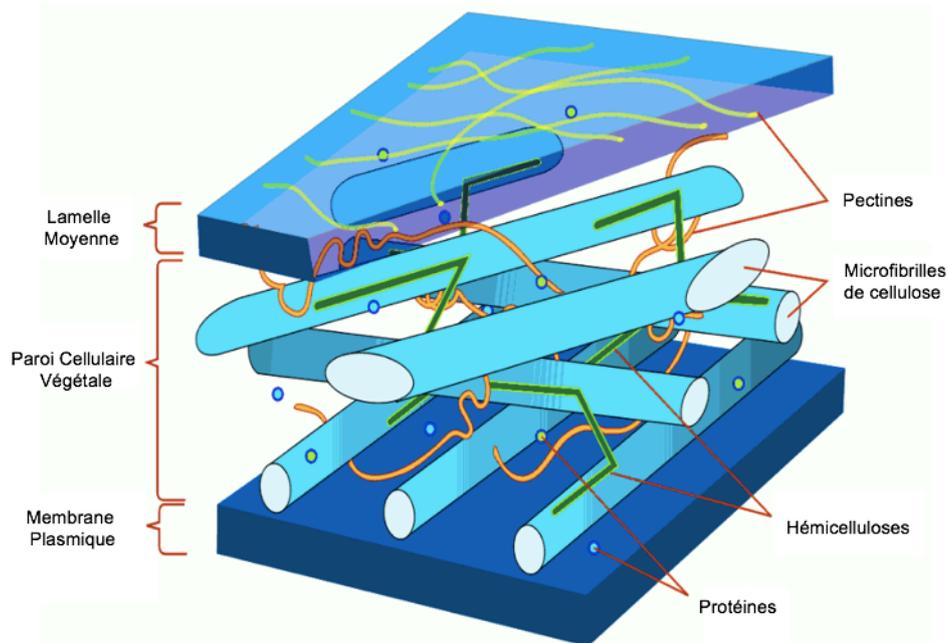


Figure 3 : Composition de la paroi des cellules végétales.

La paroi végétale est constituée d'une lamelle moyenne, composée de pectines, et des parois primaire et secondaire représentant la paroi cellulaire, composées toutes deux de microfibrilles de cellulose, hémicellulose, pectine et protéines solubles.

La paroi primaire, produite à partir de la lamelle moyenne, possède une certaine flexibilité favorisant la croissance cellulaire. À la différence de la paroi primaire, la paroi secondaire est enrichie en lignine ce qui permet de rigidifier la structure. La lamelle moyenne, quant à elle, est composée uniquement de pectine et permet d'assurer une cohérence dans le tissu végétal.

1.3.2.2. L'action des enzymes de dégradation sur la paroi végétale

Afin de pouvoir dégrader efficacement le tissu végétal, la bactérie doit démanteler la paroi cellulaire et pour cela, elle doit produire une multitude d'enzymes. Parmi celles-ci, on retrouve :

- Deux cellulases CelV et CelY : CelV est sécrétée par le système de sécrétion de type II tandis que CelY est périplasmique. Elles permettent la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose des parois primaires et secondaires (Py *et al.*, 1991 ; Boyer *et al.*, 1987).
- Des protéases PrtA à PrtG : Elles sont sécrétées par le système de sécrétion de type I et permettent la dégradation des protéines des parois (Létoffé *et al.*, 1990 ; Delepelaire *et al.*, 1991).
- Des pectates lyases, pectines méthylestérases, pectines acétyestérases, polygalacturonases, pectines lyases : Certaines sont sécrétées par le système de sécrétion de type II dans le milieu externe alors que d'autres sont périplasmiques voire intracellulaires. Cependant, toutes ces enzymes interviennent dans la dégradation de

la pectine, composant retrouvé dans les trois couches de la paroi cellulaire (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

Comme précisé précédemment, la pectine peut être estérifiée et porter des groupements méthyles ou acétyles. La première étape de la dégradation consiste à éliminer ces estérifications afin d'obtenir un polygalacturonate (PGA) accessibles aux enzymes. C'est le rôle des pectines estérases PaeY et PemA (Kazemi-Pour *et al.*, 2004). Une fois ces groupements soustraits, le PGA est dégradé par les pectates lyases (PelA à PelE, PelI, PelL, PelN et PelZ). Ces neuf enzymes clivent les liaisons glycosidiques du PGA afin de former des oligomères (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Ce rôle sera également assuré par une pectine lyase mineure PnlA. Toute cette première phase est extracellulaire. Les oligomères pénètrent alors dans le périplasme grâce aux porines KdgM et KdgN (Condemine et Ghazi, 2007). Une fois dans le périplasme, les oligomères donnent place à des digalacturonates grâce à l'action d'un ensemble d'enzymes périplasmiques comme l'exopolygalacturonate PehX ou la pectate lyase PelX. Pour finir, ces digalacturonates passent dans le cytoplasme grâce à différents transporteurs TogT, TogMNAB, ExuT et KdgT (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Reverchon, 2001) où ils sont clivés par l'oligogalacturonate lyase Ogl en monomère, donnant alors le galacturonate et le 5-céto-4-désoxyuronate (DKI). Ces deux composants une fois catabolisés deviennent du 2-céto-3-désoxygluconate (KDG), un intermédiaire du métabolisme général (Figure 4).

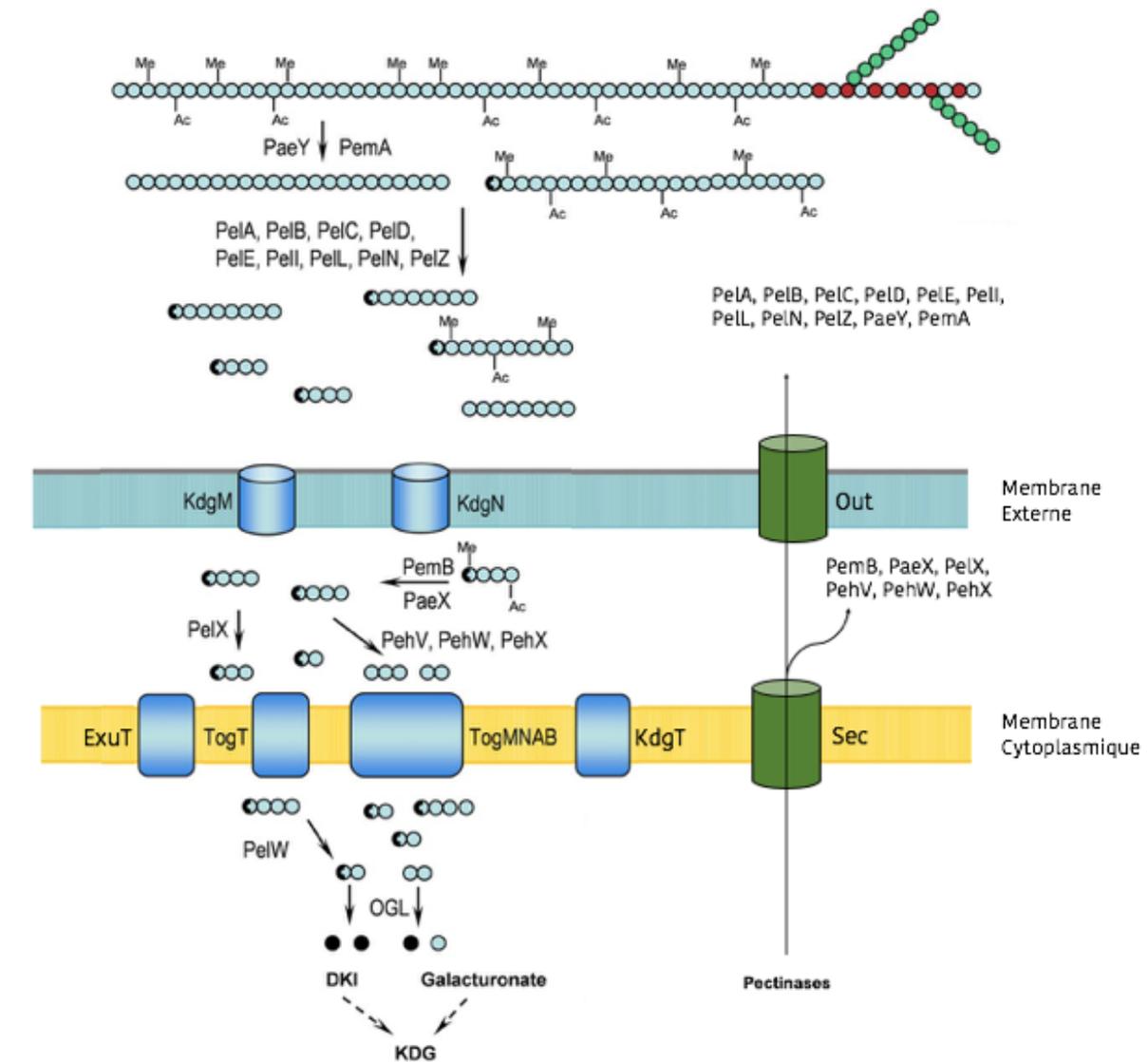


Figure 4 : Voie de dégradation de la pectine.

Les différentes pectinases nécessaires à la dégradation de la pectine sont sécrétées par le système de sécrétion de type II. Les polygalacturonates sont clivés par une multitude d'enzymes dans l'espace extracellulaire. Une fois clivés, les oligogalacturonates passent dans le périplasme par les porines KdgM et KdgN où ils seront clivés en digalacturonates. Ces derniers sont transportés par ExuT, TogT, TogMNAB et KdgT dans le cytoplasme pour être clivés en monomères : le galacturonate et la 5-céto-4-désoxyuronate (Adapté de Hugouvieux Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

1.3.3. La régulation d'un processus multifactoriel

Comme précisé précédemment, le processus infectieux se divise en plusieurs phases : la phase épiphyte ayant lieu jusqu'à l'entrée dans l'hôte, la phase asymptomatique consistant en la colonisation de l'hôte et la phase symptomatique durant laquelle se développe la maladie. Les différentes phases, aussi importantes soient-elles, n'ont pas été étudiées de la même manière. En effet, alors que la phase symptomatique est la plus étudiée à l'heure actuelle,

notamment en ce qui concerne la régulation du processus de macération, l'analyse des premiers stades de la virulence bactérienne pêche encore à l'échelle génomique même si elle a tendance à se développer ces dernières années.

Le passage d'une phase à l'autre nécessite des réseaux de régulation sophistiqués permettant la coordination de l'expression des nombreux gènes nécessaires au processus infectieux que ce soit pour la dispersion du pathogène, l'évasion face aux défenses de l'hôte ou encore le développement de la maladie (Pédrón *et al.*, 2018). Ces réseaux reposent sur un ensemble de régulateurs globaux répondant à différents signaux environnementaux (produits de dégradation végétale, température, privation d'azote et de fer, limitation en oxygène, répression catabolique ...) ainsi qu'à la densité cellulaire (Kazemi-Pour *et al.*, 2004 ; Sepulchre *et al.*, 2007 ; Mole *et al.*, 2007 ; Charkowshi *et al.*, 2012).

Parmi les régulateurs globaux se trouve PecS qui est un régulateur majeur. Suite à des études transcriptomiques, il apparaît que ce régulateur se situerait au sommet d'une régulation majeure avec un rôle prépondérant lors des premiers stades de l'infection (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011 ; Pédrón *et al.*, 2018). En effet, il empêcherait l'expression prématurée des gènes de virulence, PecS activant ou réprimant environ 13% des gènes de *D. dadantii*. Parmi ses cibles les plus connues, on retrouve les gènes codant les pectinases, la cellulase *celZ*, les gènes du système Out ou encore de la motilité avec le gène *fliC* (Reverchon *et al.*, 1994 ; Hommais *et al.*, 2008). Ces gènes sont réprimés pendant les premières heures de l'infection de même que les gènes de la voie de biosynthèse de l'indigoïdine (Reverchon *et al.*, 2002). Au contraire, PecS active le gène *hrpN* dont le produit participe à l'induction de la réponse hypersensible et à la formation du biofilm, biofilm important pour la vie épiphyte (Hommais *et al.*, 2008 ; Chapelle *et al.*, 2015).

Pédrón et ses collaborateurs ont montré, par une étude transcriptomique dans laquelle sont comparés les profils géniques de *D. dadantii* après 6H (phase asymptomatique) et après 24H (début de phase symptomatique) d'infection d'*Arabidopsis thaliana*, que certains régulateurs ont une expression modulée dans le temps. C'est le cas du régulateur PecT dont l'expression baisse à 24H comparativement à 6H (Pédrón *et al.*, 2018). Le régulateur PecT est principalement connu comme étant impliqué dans la thermorégulation (Herault *et al.*, 2014). Il réprime de nombreux gènes tels que les gènes *pel*, le gène *weaP* intervenant dans la synthèse des exopolysaccharides, le gène *fliC*, dernier gène de la cascade de régulation de la motilité mais aussi les gènes *celZ* et *prtC*, codant cellulase et protéase respectivement (Condemine *et al.*, 1999). PecT semble donc bien agir dans les premiers stades comme PecS en réprimant les facteurs essentiels à la phase symptomatique.

En plus de PecS et PecT, de nombreux régulateurs permettent un passage d'une phase à l'autre et il serait très long de tous les aborder. Certains jouent un rôle important pour l'établissement de la phase asymptomatique comme les régulateurs Fis (Reverchon et Nasser, 2013), Fur (Franza *et al.*, 2002) ou KdgR (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996), d'autres pour la mise en place de la phase symptomatique comme le régulateur CRP (Cyclic AMP Receptor ou Récepteur de l'AMP Cyclique) (Reverchon *et al.*, 1997).

Durant la phase asymptomatique, Fis réprime la production de cellulose nécessaire à la formation du biofilm et active la production de flagelles pour permettre la colonisation de l'apoplaste de l'hôte (Prigent-Combaret *et al.*, 2012). En parallèle, il active le système SAP, système de défense contre les peptides antimicrobiens, et le système de sécrétion de type III (T3SS), permettant la délivrance de molécules effectrices (Lopez-Solanilla *et al.*, 1998 ; Charkowshi *et al.*, 2012). Les gènes *pel* sont eux réprimés. Ces gènes sont également réprimés par les régulateurs KdgR et Fur en phase asymptomatique par des mécanismes différents. En effet, KdgR répond à la présence de pectines. En présence de KDG, produit de dégradation des polygalacturonates, la répression exercée par KdgR sur les pectates lyases est levée (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Le régulateur Fur utilise l'ion ferreux Fe^{2+} comme corépresseur (Franza *et al.*, 2002). L'action de ce régulateur est donc modulée par la disponibilité du fer, une carence en fer induisant la transcription des gènes *pelD* et *pelE* (Masclaux *et al.*, 1996 ; Franza *et al.*, 2002). Pour finir, la protéine CRP est connue pour être impliquée dans la répression catabolique (Reverchon *et al.*, 1997) et à la différence des régulateurs cités en amont, n'agit qu'en tant qu'activateur des gènes codant les pectates lyases (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Elle régule également les gènes liés au métabolisme et à la réponse aux stress (comme les gènes *alaU* ou *proK*) (Reverchon *et al.*, 1997 ; Gosset *et al.*, 2004).

Le processus infectieux est un processus complexe qui nécessite des réseaux de régulations sophistiqués et millimétrés afin de permettre le passage de la vie épiphyte à la phase infectieuse et de la phase asymptomatique à la phase symptomatique. Toutefois, pour faire fonctionner tous ces réseaux, il est primordial pour la bactérie de percevoir son environnement. C'est la mission prépondérante des systèmes à deux composants ou phosphorelais dont la composition et le rôle seront décrits par la suite.

2. L'enveloppe bactérienne, une barrière face à l'environnement

Afin de survivre aux conditions environnementales qui les entourent, les bactéries doivent s'isoler pour préserver leur intégrité. Elles sont entourées d'une enveloppe composée de plusieurs couches. Cette dernière possède à la fois un rôle structural, en définissant la forme de la bactérie, mais également un rôle protecteur en formant une barrière biologique. Elle assure les échanges de matière, d'énergie et d'informations entre la bactérie et le milieu extérieur.

2.1. Structure de l'enveloppe bactérienne chez les Protéobactéries

2.1.1. La membrane externe

La membrane externe fait directement face à l'environnement. Elle joue un rôle très important de barrière physique en limitant l'entrée de composés nocifs comme les antibiotiques ainsi que la perte de composés périplasmiques. Associée aux peptidoglycanes, elle contribue en prime à la rigidité mécanique de la bactérie. La membrane externe est composée d'une bicouche lipidique asymétrique. En effet, cette membrane est composée de phospholipides au niveau du feuillet interne et de lipopolysaccharides (LPS) au niveau du feuillet externe. Le LPS, principal constituant de la membrane externe, est composé de trois entités : le lipide A, le noyau et l'antigène O. Ce dernier représente une région hypervariable au contraire des deux autres qui sont très conservées d'une espèce à une autre. Cette composition asymétrique est très importante pour la perméabilité de la membrane.

La membrane externe comporte deux types de protéines principales : les porines et les lipoprotéines. Les porines appelées aussi OMP (Outer Membrane Protein ou Protéine de la Membrane Externe) sont généralement organisées en homotrimère et permettent le passage de petites molécules hydrophiles de moins de 600 Da (Decad et Nikaido, 1976). Parmi les porines les plus connues, on retrouve les porines OmpC et OmpF d'*E. coli*, connues pour être osmorégulées (Kawaji *et al.*, 1979 ; Misuno et Mizushima, 1990) (Figure 5). La lipoprotéine la plus présente dans la membrane est la lipoprotéine de Braun (Lpp). Considérée comme la protéine la plus abondante chez *E. coli* (Asmar *et al.*, 2017), elle est ancrée dans la membrane mais s'étend également dans l'espace périplasmique où elle se lie de manière covalente avec le peptidoglycane, permettant alors le maintien de l'intégrité de la membrane (Figure 5). En

plus des porines et des lipoprotéines, d'autres protéines sont retrouvées comme celles des systèmes de sécrétion ou du flagelle.

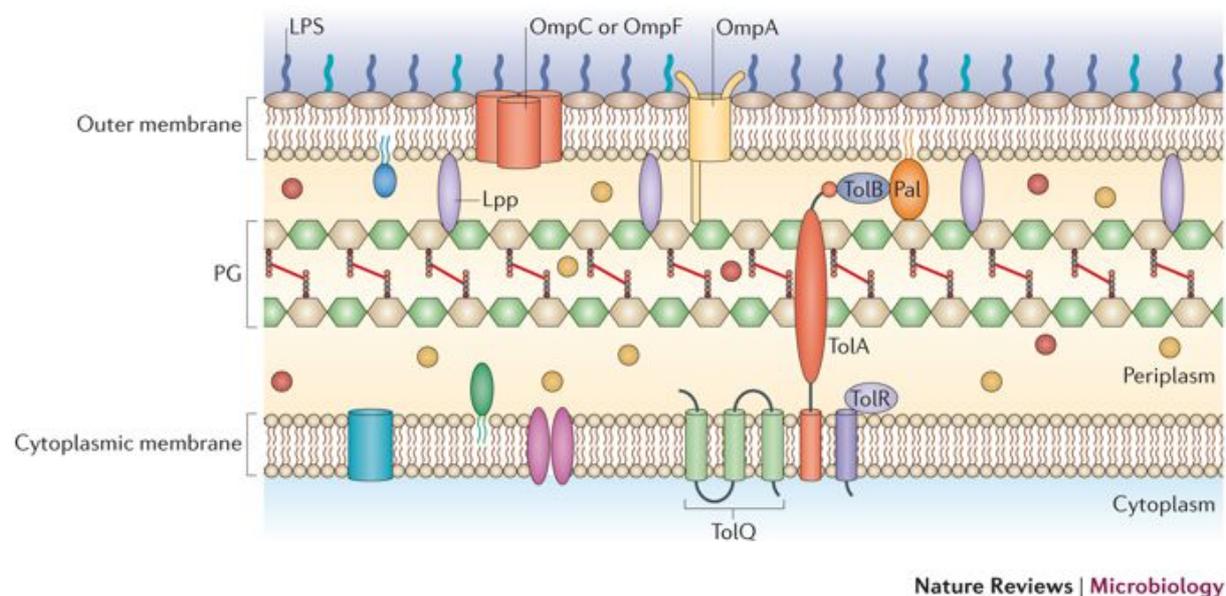


Figure 5 : Composition de l'enveloppe bactérienne d'une entérobactérie à GRAM négatif.

L'enveloppe bactérienne se compose de deux membranes : la membrane externe (outer membrane) et la membrane cytoplasmique (cytoplasmic membrane). La membrane externe est composée d'une bicouche asymétrique composée de lipopolysaccharides (LPS) et de phospholipides tandis que la membrane interne est constituée d'une bicouche de phospholipides. Entre les deux se situe un compartiment aqueux : le périplaste (periplasm) constitué de peptidoglycane (PG) (Schwechheimer et Kuehn, 2015).

2.1.2. La membrane interne

Contrairement à la membrane externe, la membrane cytoplasmique est composée d'une bicouche phospholipidique classique. Parmi les phospholipides majeurs chez *E. coli*, on retrouve la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol ou encore le cardiolipide dans des proportions d'environ 70%, 20% et 5% respectivement (Raetz et Dowhan, 1990). La membrane interne joue un rôle vital dans la bactérie, notamment en permettant le transport de petits composés, en jouant sur le processus énergétique ou encore en détectant des variations environnementales physiques ou chimiques (température, pH, osmolarité) permettant alors à la bactérie d'activer une réponse adéquate. Les protéines intégrées dans la membrane interne sont diverses dans leurs structures comme dans leurs fonctions. Ces protéines agissent entre autres dans la biosynthèse des lipides, le transport (ex : transporteur ABC), la sécrétion de protéines (ex : système SEC) ou encore la respiration avec les protéines intervenant dans la phosphorylation oxydative.

2.1.3. Le périplasme

Le périplasme, situé entre les deux membranes, est un compartiment aqueux représentant 20 à 40% du volume total de la bactérie (Stock *et al.*, 1977), ce volume dépendant des conditions environnementales. En effet, il a été montré que le volume du périplasme pouvait varier selon l'osmolarité (Cayley *et al.*, 2000). Le principal glycane retrouvé dans ce compartiment est le peptidoglycane. Composé de résidus de N-acétylglucosamine (NAcGlc) et N-acétylmuramique (NAcMur) reliés en β 1-4, ce glycane a une longueur de chaîne variable et possède un branchement de quatre acides aminés sur le NAcMur. Ce térapeptide est composé d'acides aminés D et L alternés et varie selon l'espèce.

Le peptidoglycane que l'on pourrait également qualifier d'exosquelette bactérien a un rôle fondamental dans le maintien de la forme cellulaire et dans la résistance mécanique notamment face aux pressions osmotiques subies par la bactérie (Typas *et al.*, 2012). En plus du peptidoglycane, le périplasme contient des protéines. Parmi celles-ci sont retrouvées des protéines de liaison, de dégradation (comme les pectinases, les cellulases) ou encore des protéines de signalisation cellulaire ... Une deuxième sorte de glycanes est présente : les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG), connus pour être impliqués dans la perception de l'environnement (Bontemps-Gallo *et al.*, 2017).

2.1.4. L'enveloppe bactérienne dans le processus infectieux

Comme mentionné plus haut, l'aboutissement de la macération dans le processus d'infection de *D. dadantii* est réalisable uniquement grâce à de nombreuses fonctions bactériennes dont les systèmes sont, pour la plupart, localisés au niveau de l'enveloppe bactérienne. Le flagelle et les systèmes de sécrétion s'étendent à travers toute la paroi bactérienne. On y retrouve également certains des éléments nécessaires à la détection de l'environnement : les OPGs au niveau périplasmique et le capteur des systèmes à deux composants au niveau de la membrane interne qui sont tous deux essentiels au bon déroulement du processus infectieux.

2.2. Composition et régulation de la synthèse du flagelle bactérien

2.2.1. Structure du flagelle bactérien

La motilité bactérienne est essentielle pour la bactérie que ce soit pour sa croissance ou sa pathogénicité (Page *et al.*, 2001). Même si différents systèmes de locomotion existent, la motilité par le flagelle est la plus répandue. Le nombre et la disposition des flagelles varient

d'une bactérie à une autre. Ils permettent à la bactérie de se diriger vers l'endroit souhaité notamment grâce aux chimioattracteurs et au phénomène de chimiotactisme (Rio-Alvarez *et al.*, 2015).

Cet organe de locomotion présent sur la paroi bactérienne est constitué de trois parties distinctes (Figure 6) :

- Le filament est la partie externe du flagelle. Mesurant entre 5 et 10 μm de long, il est responsable du mécanisme de propulsion. Le filament est constitué d'une seule protéine : la flagelline FliC. Toutefois, certaines espèces peuvent incorporer d'autres sous unités protéiques. Le filament est généralement terminé par un anneau composé d'une douzaine de protéines FliD formant la coiffe.
- Le crochet est une structure plus courte en forme de courbe. Il possède un diamètre un peu plus important que le filament et assure le relais entre celui-ci et le corps basal.
- Le corps basal constitue le moteur flagellaire. Il est composé d'environ 15 protéines réparties en plusieurs anneaux : l'anneau MS, l'anneau C, l'anneau P et l'anneau S. L'anneau C est constitué de plusieurs copies de FliG, de FliM et de FliN et constitue le rotor du moteur flagellaire. Les protéines MotA et MotB constituent la partie fixe : le stator (Pallen et Matzke, 2006).

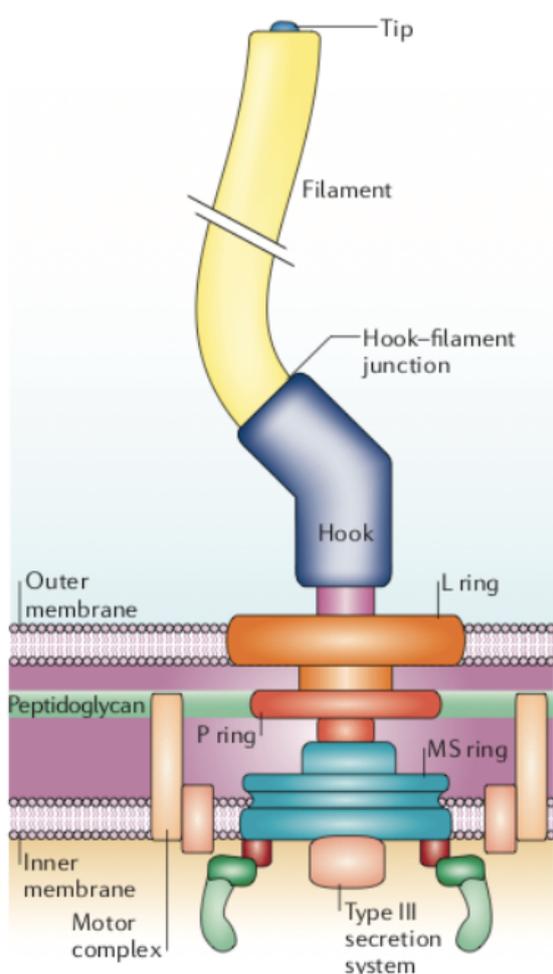


Figure 6 : Structure d'un flagelle bactérien.

Le flagelle est constitué de trois parties : le corps basal constitué de plusieurs anneaux (MS, L, P et C) et du complexe moteur, le crochet (hook) et le filament. (Pallen et Matzke, 2006)

2.2.2. Cascade de régulation de la synthèse du flagelle

Les gènes de synthèse du flagelle sont gouvernés par une cascade de régulation très ordonnée. Au sommet de cette cascade, on retrouve l'opéron maître *flhDC* qui code un activateur transcriptionnel FlhD2C2 (Komeda, 1986). Cet activateur déclenche la transcription d'une majorité de gènes de classe II et de quelques gènes de classe III intervenant notamment dans la mise en place du corps basal, du crochet et du système d'exportation flagellaire. Le gène *fliA*, également activé, code le facteur σ_{28} . Durant toute cette étape, un anti-sigma FlgM séquestre la protéine FliA (Ohnishi *et al.*, 1990 ; Ohnishi *et al.*, 1992 ; Hugues *et al.*, 1993). Une fois la structure correctement mise en place, FlgM est exportée et FliA libérée ce qui permet l'activation de la transcription de gènes de classe II et de classe III codant les composants du filament (la flagelline FliC), du moteur (MotA et MotB) et les gènes nécessaires au phénomène de chimiotactisme (Figure 7).

Cette cascade très ordonnée est régulée aussi bien par des régulateurs positifs tels que H-NS, CsrA ou AMPc-CAP que par des phosphorelais répondant à des modifications de l'environnement (température, pH, osmolarité) (Figure 7 ; Soutourina et Bertin, 2003). Une température élevée, une hausse de la concentration en NaCl ou un pH extrême vont moduler la cascade de régulation. Cette régulation se fait notamment par le biais de phosphorelais, variables selon l'espèce, tels UvrY/BarA, RcsCDB, CpxAR, QseCB ou encore EnvZ/OmpR (Suzuki *et al.*, 2002 ; Bouchart *et al.*, 2010 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2015 ; Prüb, 2017 ; Shin et Park, 1995).

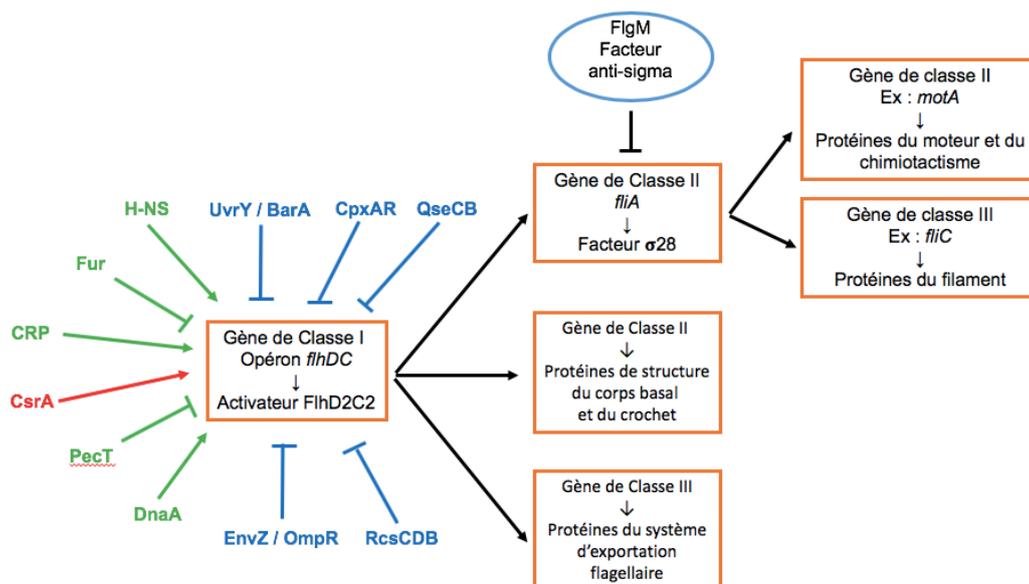


Figure 7 : Cascade de régulation du flagelle bactérien.

L'opéron maître *flhDC* code un activateur FlhD2C2 qui active la transcription de gènes de classe II et classe III. Le gène *fliA*, codant le facteur σ_{28} , est régulé négativement par FlgM. Une fois le système

formé, FlgM est exporté et FliA activé ce qui permet l'activation des derniers gènes de la cascade. Toute cette cascade est modulée par des régulateurs agissant soit au niveau transcriptionnel (flèche verte) ou post-transcriptionnel (flèche rouge) mais également par des phosphorelais (flèche bleue) permettant l'adaptation aux variations environnementales. Adapté de Soutourina et Bertin, 2003 et Prüb, 2017.

2.3. Rôle des exopolysaccharides dans la bactérie

Les exopolysaccharides entourent la bactérie et peuvent participer à l'élaboration de la capsule. Les exopolysaccharides sont souvent hydrophiles et anioniques en raison de la présence de groupements hydroxyles. Leur composition varie en fonction de l'espèce bactérienne. Alors que chez *D. dadantii*, ils sont composés de molécules de L-rhamnose, D-galactose et d'acides glucuroniques (Condemine *et al.*, 1999), les Psl et les Pel chez *Pseudomonas aeruginosa* sont composés de molécules de D-mannose, D-glucose et L-rhamnose (Wang *et al.*, 2014). La majorité des exopolysaccharides est produite dans le cytoplasme et est ensuite transloquée à travers la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Rehm, 2010).

Les exopolysaccharides ont différents rôles fonctionnels. Tout d'abord, ils protègent contre les variations de conditions environnementales. Par exemple, leur présence permet de résister à la dessiccation, à l'exposition aux UV, à la pression osmotique ou encore à des températures extrêmes (Sathiyarayanan *et al.*, 2017). Ils sont également très importants chez les bactéries pathogènes. En effet, les exopolysaccharides sont notablement antigéniques, induisant une réponse inflammatoire ciblée. Ils peuvent dans le même temps masquer les bactéries aux défenses de l'hôte. Par exemple, les bactéries d'*E. coli* riches en antigène K montrent une forte capacité d'échappement à la phagocytose (Howard et Glynn, 1971). Les exopolysaccharides jouent également un rôle important dans la formation du biofilm ainsi que dans l'adhérence (Danese *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2019) et peuvent aussi agir face aux défenses de l'hôte notamment en séquestrant certaines molécules toxiques comme les ROS (Bontemps-Gallo et Lacroix, 2015). Toutes ces données permettent de classer la sécrétion d'exopolysaccharides comme facteur de virulence. Condemine et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré qu'un mutant de *D. dadantii* dont la voie de biosynthèse des exopolysaccharides a été interrompue n'est plus capable d'infecter des plants de *Saintpaulia* (Condemine *et al.*, 1999). L'analyse du déroulement de l'infection a montré que les exopolysaccharides ne sont utiles que dans les premières étapes de colonisation (Bontemps-Gallo et Lacroix, 2015 ; Li *et al.*, 2019).

Comme pour les flagelles, la régulation de la synthèse des exopolysaccharides dépend à la fois de régulateurs comme PecT, déjà connu pour réguler la synthèse des flagelles et des pectinases, mais également des conditions environnementales (température, osmolarité).

Encore une fois, cette régulation dépendante de l'environnement passe notamment par les phosphorelais comme RcsCDB ou CpxAR (Bouchart *et al.*, 2010 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2015).

2.4. Structure, synthèse et régulation des Glucanes Périplasmiques Osmorégulés

Découvert à l'origine chez *Agrobacterium tumefaciens* comme une sous-classe d'exopolysaccharides (McIntire *et al.*, 1942), les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont présents chez presque toutes les protéobactéries α , β et γ (Bontemps-Gallo et Lacroix, 2015). En 1973, ces oligosaccharides solubles périplasmiques sont de nouveau observés lors du renouvellement du phosphatidylglycérol de la membrane cellulaire mais cette fois-ci chez *E. coli* (VanGolde *et al.*, 1973). Ces oligosaccharides périplasmiques prennent alors le nom de MDO (Membrane-Derived Oligosaccharides ou Oligosaccharides Dérivés de la Membrane) puis le nom d'OPG (Osmoregulated Periplasmic Glucans ou Glucanes Périplasmiques Osmorégulés) quand il fut montré que leur quantité variait en fonction de l'osmolarité (Kennedy, 1982 ; Miller *et al.*, 1986).

2.4.1. Structures et synthèse des OPG

Les OPG présentent des structures assez diverses selon l'espèce mais tous possèdent les caractéristiques suivantes : des oligosaccharides composés de 5 à 24 unités de D-glucose reliées entre elles par des liaisons β -glucosidiques (Bontemps-Gallo *et al.*, 2017). Les OPG sont répartis en quatre familles (Figure 8) :

- Les OPG de la première famille possèdent un squelette composé de 5 à 12 molécules de glucose. Ces molécules sont reliées linéairement entre elles par des liaisons β 1-2 et sont ramifiées par une molécule de glucose en β 1-6 de façon aléatoire. Les OPG d'*E. coli* et de *D. dadantii* appartiennent à cette famille.
- Les OPG de la deuxième famille possèdent un squelette cyclique composé de 17 à 25 unités de glucose reliés en β 1-2. On retrouve dans cette famille les OPG issus des genres *Agrobacterium* ou encore *Rhizobium*.
- Les OPG de la troisième famille sont composés d'un squelette cyclique de 10 à 13 glucoses reliées par liaison β 1-3, β 1-4 et β 1-6. Ils sont rencontrés notamment chez les *Bradyrhizobium spp.*
- Les OPG de la quatrième famille sont représentatifs entre autres des *Ralstonia solanacearum*. Ils possèdent un degré de polymérisation peu variable : 13, 16 et 18 résidus de glucose. Ils sont cycliques, reliés en β 1-2 et fermés en α 1-6.

En plus de la diversité structurale, il existe également une diversité dans la substitution des OPG. En effet, sur le squelette glucosidique vont se greffer d'autres molécules appelées substituants. Chez *E. coli*, la substitution se fait avec des phosphoglycérols, des phosphoéthanolamines ou encore des résidus succinyles (Kennedy *et al.*, 1976) alors que chez *D. dadantii*, les OPG sont substitués par des groupements acétyles ou succinyles (Cogez *et al.*, 2001).

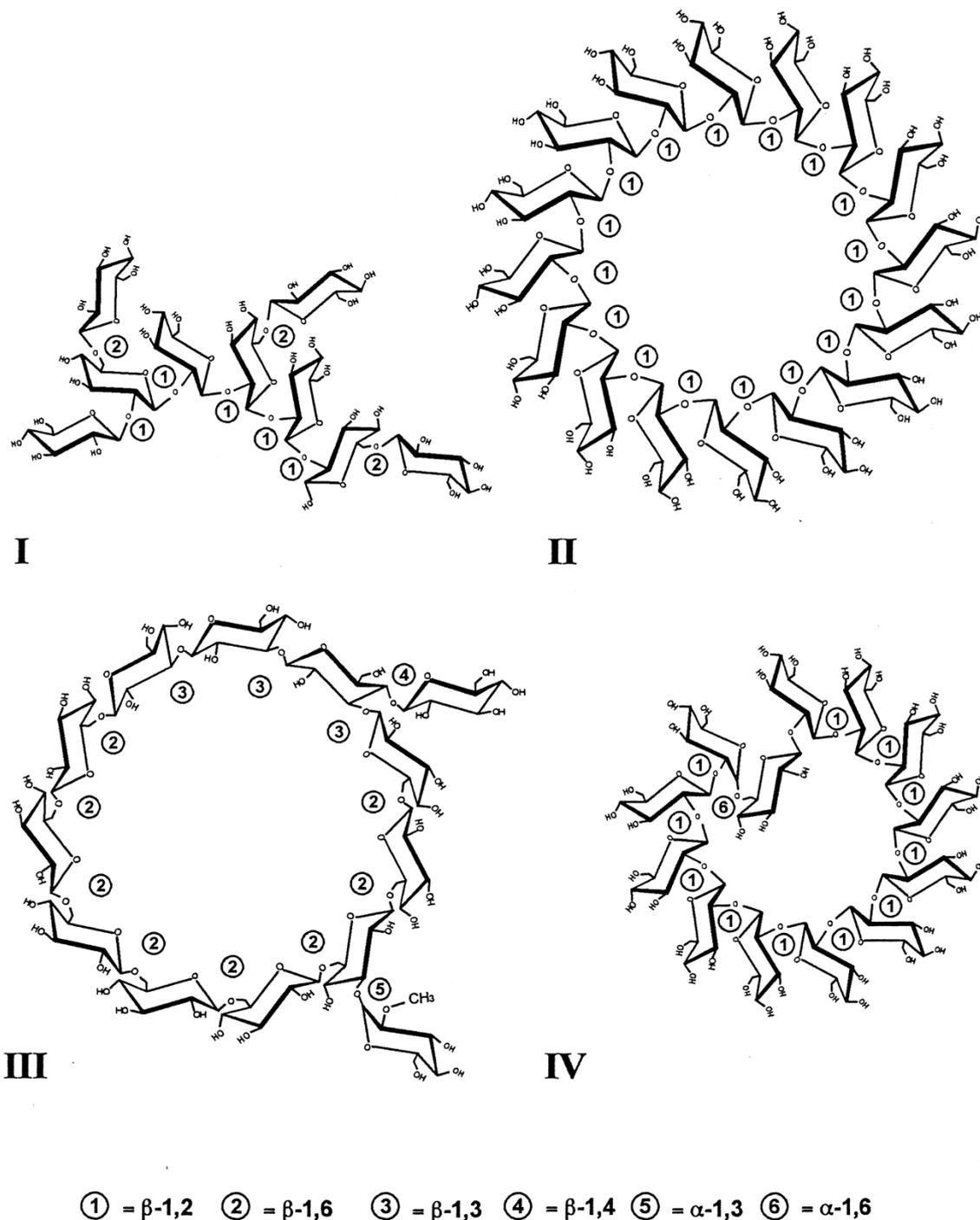


Figure 8 : Représentation structurale des quatre familles d'OPG

(Bohin, 2000)

D. dadantii étant notre modèle d'étude, seule la biosynthèse des OPG de la famille I sera détaillée. La biosynthèse a été mise en lumière grâce aux travaux effectués chez *E. coli*. Chez cette bactérie, six protéines au total sont impliquées dans la biosynthèse des OPG (Figure 9). Pour commencer, l'opéron *opgGH* code deux protéines : OpgG, qui est périplasmique, et OpgH, qui est transmembranaire. Ces deux protéines sont essentielles à la synthèse des OPG. En effet, l'inactivation de l'opéron entraîne une perte de leur synthèse (Bontemps-Gallo *et al.*, 2017).

La protéine OpgH, possédant une activité glucosyltransférase, permet la synthèse des chaînes linéaires β 1-2 à partir du précurseur UDP-Glucose (Weissborn et Kennedy, 1984). La protéine ACP (Acyl Carrier Protein ou Protéine porteuse d'acyl), connue pour son rôle dans la biosynthèse des acides gras, est nécessaire au bon transfert des résidus de glucose (Therisod *et al.*, 1986). La fonction d'OpgG n'a pas encore été trouvée. L'hypothèse posée est qu'OpgG permettrait le branchement en β 1-6 des molécules de glucose (Loubens *et al.*, 1993) et interagirait avec OpgH afin de transposer les molécules naissantes dans le périplasma. La protéine OpgD, elle, n'agit pas sur la synthèse du squelette mais est impliquée dans son contrôle organisationnel. En effet, en absence d'OpgD, le squelette OPG est plus long et présente moins de branchements (Lequette *et al.*, 2004). Pour finir, les protéines OpgB, OpgC et OpgE jouent toutes trois un rôle dans la substitution des OPG avec l'ajout des groupements phosphoglycérol, succinyles et phosphoéthanolamine respectivement (Jackson *et al.*, 1984 ; Lacroix *et al.*, 1999 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2013) (Figure 9).

Chez *D. dadantii*, seules trois des six protéines sont présentes : OpgG et OpgH, permettant comme chez *E. coli* la synthèse des glucanes, et OpgC permettant la succinylation des OPG (Page *et al.*, 2001 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2016). Le gène codant l'enzyme de substitution par des résidus acétyles est encore inconnu.

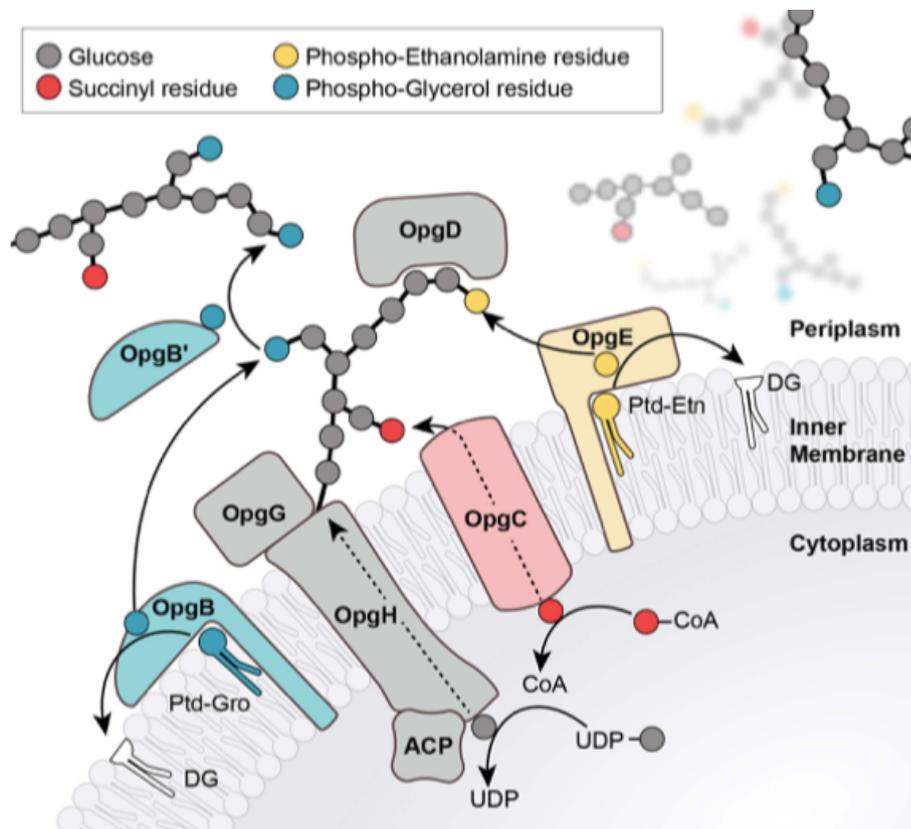


Figure 9 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *E. coli*.

(Bontemps-Gallo *et al.*, 2017)

2.4.2. Régulation de la synthèse des OPG

Comme mentionné précédemment, les OPG sont principalement régulés en fonction de l'osmolarité. Toutefois, cela dépend des espèces. En effet, même si la grande majorité des espèces (*D. dadantii*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ont une concentration d'OPG qui diminue lorsque l'osmolarité augmente (Cogez *et al.*, 2001 ; Kennedy, 1982), ce n'est pas le cas de toutes les bactéries. Certaines espèces présentent une régulation inverse comme *Pantoea alhagi*, chez qui les OPG augmentent en même temps que l'osmolarité (Li *et al.*, 2019). D'autres espèces encore ne présentent pas du tout de modifications selon l'osmolarité. C'est le cas par exemple de *Brucella abortus* (Briones *et al.*, 1997).

Les OPG sont plus précisément régulés à plusieurs niveaux. En effet, on peut tout d'abord observer chez *E. coli* une transcription d'*opgGH* modulée en fonction de l'osmolarité (Lacroix *et al.*, 1991). Cette adaptation se fait de façon lente avec parfois plusieurs générations de bactéries nécessaires pour ajuster la teneur en OPG (Bohin, 2000). Un rétrocontrôle négatif a également été mis en avant suggérant qu'OpgH perçoit directement les OPG (Bohin et Lacroix, 2006). De plus, il existe également une régulation enzymatique. En effet, il a été montré que l'activité d'OpgH était sensible à la force ionique (Bohin et Lacroix, 2006) ce qui

entraîne une baisse de synthèse d'OPG à une osmolarité élevée causée par l'accumulation d'ions. Cette régulation enzymatique se fait de façon rapide contrairement à la régulation transcriptionnelle.

2.4.3. L'absence d'OPG s'associe à un phénotype pléiotrope

Les mutants dépourvus d'OPG, quelle que soit l'espèce, présentent des phénotypes pléiotropes variables d'une espèce à une autre. Parmi ces phénotypes, on retrouve entre autres la surproduction d'exopolysaccharides, la perte de motilité causée par une baisse du nombre de flagelles, une baisse de la sécrétion d'exoenzymes, une hausse de la sensibilité aux antibiotiques ou aux sels biliaries ou encore la perte de la capacité à former un biofilm (Page *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2019 ; Fiedler et Rotering, 1988 ; Mah *et al.*, 2003).

Une perte totale ou partielle du phénomène de virulence est également fréquemment observée que ce soit chez les organismes phytopathogènes ou zoopathogènes. A titre d'exemple, *Pseudomonas aeruginosa*, qui est un zoopathogène, voit sa virulence sévèrement altérée sur *Caenorhabditis elegans* quand le gène *opgH* est interrompu (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). Si on prend le cas de *D. dadantii*, notre modèle phytopathogène, un mutant *opgG* est incapable d'infecter l'endive ou la pomme de terre (Page *et al.*, 2001). Toutefois, la virulence de certains organismes n'est pas impactée par la perte des OPG ; c'est notamment le cas pour *Yersinia pseudotuberculosis* (Quintard *et al.*, 2015).

Pour finir, une étude protéomique réalisée sur *D. dadantii* en 2007 a permis de mettre en avant une perturbation importante de divers processus cellulaires dans une souche dépourvue en OPG (Bouchart *et al.*, 2007). En effet, dans une souche *opgG*, de nombreuses voies sont modifiées comme celles dédiées au repliement et à la dégradation des protéines, au métabolisme des glucides ou encore des lipides, améliorant de ce fait le métabolisme énergétique ainsi que l'expression de protéines de réponse au stress. Cela suggère donc qu'une souche dépourvue en OPG est altérée dans la perception de son environnement, phénotype que l'on pourrait qualifier d'« autisme bactérien ».

3. Les systèmes à deux composants ou phosphorelais

3.1. Généralités

Afin de s'adapter à un environnement changeant, les micro-organismes ont développé des systèmes permettant une régulation précise de l'expression de leurs gènes. Les systèmes à deux composants, appelés aussi phosphorelais, ont un rôle prépondérant dans l'adaptation aux variations environnementales en modulant de très nombreux gènes tels que ceux intervenant dans le métabolisme ou la virulence. Cette adaptation génique permet à la bactérie de s'accomoder et de survivre aux nouvelles conditions environnementales qui l'entourent. Découverts à la fin des années 1980 chez les bactéries, les phosphorelais sont retrouvés chez de nombreux organismes comme les archées, les plantes ou les eucaryotes unicellulaires (Stock *et al.*, 2000). Le nombre de phosphorelais chez les bactéries varie selon l'espèce, dépendamment de leur environnement. En effet, le nombre de phosphorelais serait plus important chez des bactéries évoluant dans des milieux variés que chez des bactéries possédant un environnement stable. A titre d'exemple, *D. dadantii*, notre modèle, possède trente-deux phosphorelais alors que *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme, en possède seulement deux (Caimino *et al.*, 2011).

La dénomination de système à deux composants vient du fait qu'il est constitué de deux protéines : un capteur et un régulateur dont les gènes correspondants se trouvent généralement en opéron (Mizuno, 1997 ; Hoch, 2000). Le capteur histidine kinase (HK), le plus souvent situé dans la membrane interne, perçoit les signaux environnementaux alors que le régulateur de réponse cytoplasmique (RR) associé permet une réponse adaptée aux variations. La transduction du signal entre les deux protéines se fait par une réaction de phosphotransfert. Le capteur HK perçoit un stimulus et s'autophosphoryle sur un résidu histidine. Le phosphate est alors transmis à un résidu aspartate situé sur le régulateur (Figure 10). Ce dernier, phosphorylé, module un ensemble de gènes cibles appelé régulon (Stock *et al.*, 2000). Celui-ci est composé de gènes intervenant dans la mise en place de la réponse bactérienne face à l'environnement. Cette régulation fine et minutieusement contrôlée est possible grâce à un état d'équilibre entre les activités kinase et phosphatase du capteur. Certains phosphorelais possèdent un domaine supplémentaire voire une protéine supplémentaire dans le processus de phosphotransfert (Figure 10). Cependant, la transmission du phosphate se fera par une alternance histidine – aspartate, débutant toujours par un résidu histidine et se terminant toujours par un résidu aspartate (Figure 10) (Hoch, 2000).

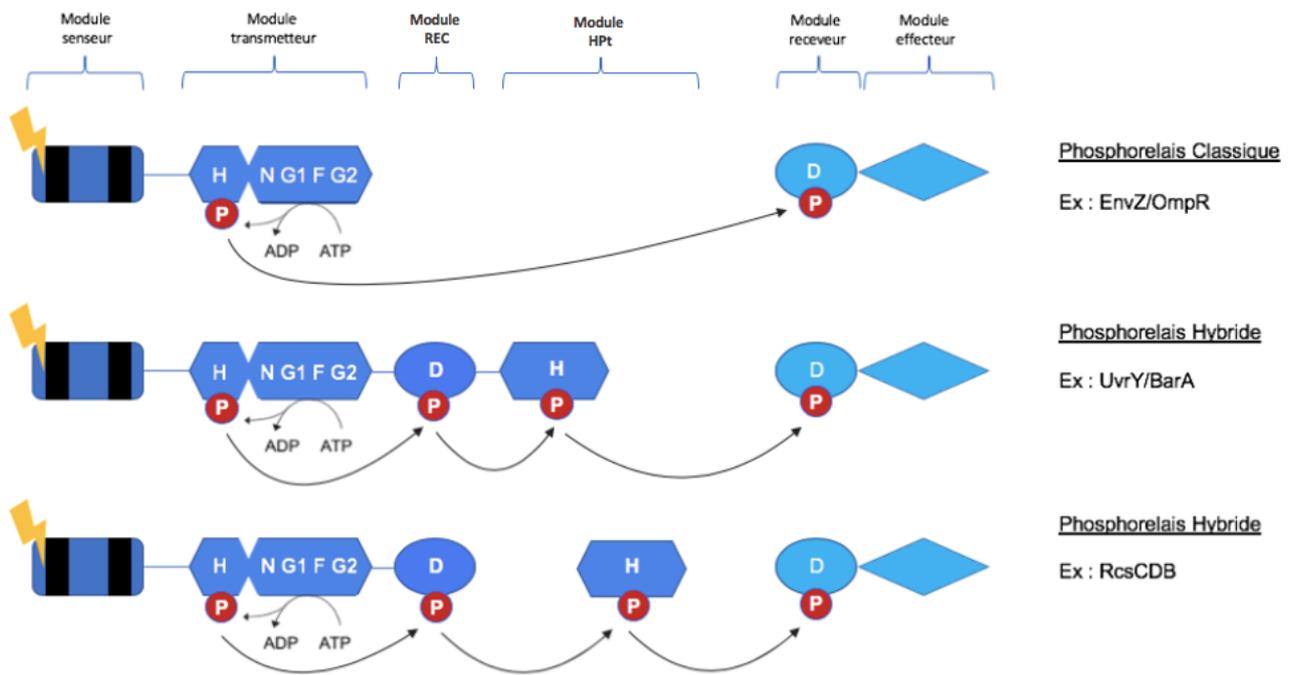


Figure 10 : Représentation schématique de la transduction du signal par les phosphorelais.

Le module senseur du capteur permet la perception des signaux environnementaux. Une autophosphorylation du capteur s'effectue sur le résidu histidine situé dans le module transmetteur. Le phosphate est alors transmis différemment selon que l'on soit dans un phosphorelais classique ou hybride. Dans le cas d'un système à deux composants ou phosphorelais classique, le phosphate est directement transmis au niveau d'un résidu aspartate localisé sur le module receveur. Dans le cas des phosphorelais hybrides, des étapes intermédiaires sont nécessaires car le capteur possède un domaine REC et un domaine HPT, ce dernier pouvant également se situer sur une protéine intermédiaire. Le phosphate est donc transmis sur un résidu aspartate du domaine REC, sur une histidine du domaine HPT et pour finir sur un résidu aspartate localisé sur le module receveur. Les transferts du groupement phosphate sont indiqués par des flèches.

3.1.1. Le capteur

Le capteur d'un phosphorelais permet la perception des variations environnementales. Les capteurs sont à 75% dits « classiques » ou « orthodoxes » et sont composés d'un module senseur et d'un module transmetteur (Figure 10) (Gao et Stock, 2009).

Le domaine senseur possède deux domaines transmembranaires délimitant une partie périplasmique. Cette dernière semble jouer un rôle sensoriel chez certains phosphorelais, permettant ainsi la perception de stimuli extracellulaires. D'autres domaines du capteur sont connus également pour percevoir les signaux à la place ou en complément du domaine périplasmique. Ils sont situés dans la partie cytoplasmique dans le cas du domaine HAMP (Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting chemotaxis protein, and Phosphatase)

ou peuvent être situés dans le périplasma ou dans le cytoplasme dans le cas du domaine PAS (Per Arnt Sim ; nom des trois protéines sur lesquelles le domaine a été identifié). Le domaine PAS, contenu dans 33% des HK comme PhoQ, peut lier de petits ligands et détecter entre autres des changements de la concentration en oxygène ou du potentiel redox (Zhulin *et al.*, 1997 ; Repik *et al.*, 2000 ; Gao et Stock, 2009). Le domaine HAMP, observé chez environ 31% des HK, se situe généralement entre le deuxième domaine transmembranaire et la partie cytoplasmique du capteur, comme chez le phosphorelais EnvZ/OmpR (Appleman *et al.*, 2003 ; Gao et Stock, 2009). Il joue un rôle dans la transmission du signal.

La partie cytoplasmique du capteur contient deux domaines majeurs : un domaine DHP (Dimerization and Histidine phosphorylation) et un domaine CA (Catalytic ATP binding). Le domaine DHP contient le résidu His, localisé dans une courte zone très conservée, qui reçoit le groupement phosphate. Le domaine CA contient l'activité catalytique du capteur permettant le transfert du phosphate de l'ATP à l'histidine. Plusieurs zones sur la partie cytoplasmique du capteur sont fortement conservées entre les espèces : les boîtes H, N, G1, F et G2 (Figure 10). La boîte H est la seule se situant sur le domaine DHP, les autres se localisant sur le domaine CA. La boîte H contient l'histidine phosphorylable. Une cavité permettant la liaison de l'ATP est définie par des résidus des boîtes N, G1, F et G2. L'autophosphorylation se fait grâce à une réaction dans l'homodimère où l'activité kinase du premier monomère catalyse la phosphorylation de l'histidine du second monomère (Stock *et al.*, 2000). De plus, la spécificité du phosphotransfert de l'histidine kinase est dictée presque uniquement par son domaine DHP, cette spécificité limitant le phénomène de diaphonie entre les différentes voies (Skerker *et al.*, 2008).

Comme précisé ci-dessus, 25% des phosphorelais possèdent un domaine supplémentaire comme le capteur BarA du phosphorelais BarA/UvrY, voire une protéine intermédiaire telle que RcsD dans le phosphorelais RcsCDB. Les capteurs avec un domaine complémentaire sont appelés capteurs « hybrides » ou « non orthodoxes » (Gao et Stock, 2009). Ces capteurs comportent, en plus des domaines classiques, un domaine receveur REC ainsi qu'un domaine HPt (Histidine containing Phosphotransfert domain), ce dernier pouvant également se trouver sur une protéine intermédiaire. Suite à l'autophosphorylation de l'histidine, le phosphate est transmis sur le domaine receveur puis sur le domaine HPt afin d'être transmis *in fine* sur l'aspartate du régulateur (Figure 10).

3.1.2. Le régulateur

Les régulateurs de réponse sont des protéines solubles cytoplasmiques composées de deux domaines distincts : un module receveur N-terminal qui reçoit le groupement phosphate

du capteur et un module effecteur C-terminal qui permet la fixation à l'ADN et ainsi la modulation génique face aux variations environnementales (Figure 10).

Le domaine receveur est fortement conservé alors que le domaine effecteur est très variable, ce qui permet à la bactérie de proposer une très large gamme de réponses face aux modifications de son environnement. Le régulateur catalyse le transfert du groupement phosphate du résidu histidine phosphorylé du capteur vers son résidu aspartate localisé dans le domaine receveur. Quand le régulateur reçoit le phosphate, un changement de conformation s'opère ce qui lui permet de passer d'une forme inactive à une forme active. Le domaine N-terminal receveur est composé d'environ 120 acides aminés et possède au niveau de la poche de phosphorylation, en plus de l'aspartate phosphorylable, deux résidus aspartate et glutamate qui se lient à un cation divalent Mg^{2+} essentiel ainsi qu'un résidu lysine, impliqué dans le transfert du phosphate.

63% des régulateurs ont un rôle de facteur de transcription et sont donc capables de se lier à l'ADN grâce à leur domaine C-terminal. Ce domaine, variable d'un phosphorelais à l'autre, présente de multiples structures. Ces différents types de domaines sont nommés d'après les membres chez qui ils ont été largement étudiés, la sous-famille OmpR/PhoB avec sa structure wHTH (*wingled-helix-turn-helix* ou Motif Hélice-Tour-Hélice ailé) étant la plus représentée (30% des RR) (Gao et Stock, 2009).

Si la phosphorylation par le capteur est la voie majeure pour les régulateurs, ces derniers peuvent être phosphorylés de façon indépendante de l'histidine kinase. En effet, il a été démontré que les régulateurs peuvent catalyser le transfert de phosphate grâce à des donneurs de phosphate tels que l'acétylphosphate, le phosphoramidate, le carbamylphosphate ou encore le phosphoimidazole (Lukat *et al.*, 1992 ; Laub et Goulian, 2007). De ce fait, une partie des analyses *in vitro* effectuées sur les régulateurs ces dernières années sont réalisées grâce à ces molécules. L'analyse de la phosphorylation *in vivo* est complexifiée par l'extrême labilité de la liaison du phosphate avec le résidu aspartate (Gao et Stock, 2009).

Ci-dessus sont présentés des cas simples de phosphorelais, répondant à des stimuli précis ce qui entraîne une cascade de phosphorylation qui permet de ce fait une régulation génique fine. Cependant, des aménagements plus complexes existent, par exemple par l'intervention de protéines auxiliaires agissant sur l'activation du phosphorelais. Ces protéines auxiliaires ou modulateurs peuvent être situées en différents points : au niveau cytoplasmique (Ex : PII pour NtrBC), au niveau périplasmique (Ex : CpxP pour CpxAR) ou au niveau des membranes externe (Ex : RcsF pour RcsCDB ; NlpE pour CpxAR) et interne (Ex : IgaA pour

RcsCDB, MzrA pour EnvZ/OmpR) (Jiang *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2011 ; Castanié-Cornet *et al.*, 2006 ; Vogt et Raivio, 2012 ; Cho *et al.*, 2014 ; Gerken *et al.*, 2009).

Dans la suite de ce manuscrit seront développés le phosphorelais EnvZ/OmpR, sujet principal de cette étude, ainsi que les phosphorelais CpxAR et RcsCDB, tous deux déjà étudiés chez *D. dadantii* et présentant des comportements différents comparativement aux phosphorelais « classiques ».

3.2. Quelques exemples de phosphorelais

3.2.1. Le phosphorelais EnvZ/OmpR

Le système EnvZ/OmpR est considéré comme le paradigme des systèmes à deux composants. Il a été mis en évidence lors d'études génétiques réalisées sur deux des porines majeures d'*E. coli* : OmpF et OmpC. L'expression de ces porines varie selon l'osmolarité du milieu. Alors que la porine OmpF est préférentiellement exprimée à basse osmolarité, la porine OmpC est présente à haute osmolarité (Kawaji *et al.*, 1979). Les études génétiques mettent en avant plusieurs mutants causant une altération de cette expression différenciée (Sarma et Reeves, 1977) et permettent ainsi la localisation des loci *ompC*, *ompF* mais également *ompB* (Sarma et Reeves, 1977 ; Hall et Silhavy, 1979). Les différents mutants obtenus d'*ompB* sont responsables de nombreux phénotypes (OmpF⁻ OmpC⁻, OmpF⁺ OmpC⁻ et OmpF⁻ OmpC⁺) posant l'hypothèse que ce locus comporte plus d'un gène et que le produit d'*ompB* joue un rôle de régulateur transcriptionnel sur *ompF* et *ompC* (Hall et Silhavy, 1981 [A]). Suite à des expériences de complémentations, les scientifiques déterminent que le locus *ompB* est en réalité composé de deux gènes : le gène *ompR*, dont les mutations entraînent les phénotypes OmpF⁻ OmpC⁻ et OmpF⁺ OmpC⁻ et le gène *envZ* dont les mutations causent un phénotype pléiotrope (Hall et Silhavy, 1981 [B]). Ces deux gènes sont groupés en opéron avec le gène *ompR* localisé en amont du gène *envZ* et codent les deux composants du phosphorelais : EnvZ, capteur transmembranaire, et OmpR, régulateur cytoplasmique (Mizuno *et al.*, 1982 ; Wurtzel *et al.*, 1982).

3.2.1.1. Composition du système EnvZ/OmpR

EnvZ/OmpR est un phosphorelais « classique » composé d'un capteur et d'un régulateur. EnvZ est un capteur histidine kinase transmembranaire composé de 450 acides aminés (AA) et peu présent dans la bactérie avec seulement une centaine d'exemplaires de monomères (Cai et Inouye, 2002 ; Motz et Jung, 2018). Plusieurs domaines sont distinguables dans la protéine EnvZ. Elle présente deux domaines transmembranaires s'étendant des

acides aminés 16 à 35 et 159 à 179 (Forst *et al.*, 1987 ; Kenney et Anand, 2020). Entre ces deux domaines se trouve une région périplasmique composée de 124 AA et présentant une forte diversité selon les espèces. Dans la large région cytoplasmique essentielle à l'activité d'EnvZ, on retrouve deux domaines fonctionnels : le domaine DHp (Dimerization and Histidine Phosphorylation ; AA 269 à 279) et le domaine CA (Catalytic ATP binding domain ; AA 290 à 450) (Park *et al.*, 1998). Le domaine DHp est relié au deuxième domaine transmembranaire par un linker HAMP. Ce linker joue le rôle de module dans la transduction du signal intramoléculaire (Appleman *et al.*, 2003). Le domaine DHp, composé de deux hélices α , intervient dans le processus de phosphorylation ainsi que dans le processus de dimérisation (Park *et al.*, 1998). C'est dans ce domaine que se situe la séquence très conservée HDLRTP au sein de laquelle se trouve l'histidine phosphorylable (Roberts *et al.*, 1994). Le domaine CA, région très conservée chez les histidines kinases (Tanaka *et al.*, 1998), est quant-à lui composé d'un feuillet β et de 5 hélices α . Ce domaine possède une certaine conformation permettant la création d'une poche de liaison à l'ATP. Cette poche est formée par quatre acides aminés Asp347-Asp373-Ile378-Phe387 (Kenney et Anand, 2020). La partie cytoplasmique composée des domaines DHp, CA et HAMP est montrée comme étant essentielle et indispensable à l'autophosphorylation et à la perception de l'osmolarité.

OmpR est un régulateur cytoplasmique de 239 AA qui, contrairement à EnvZ peu présent dans la cellule, compte près de 3500 copies dans la bactérie (Cai et Inouye, 2002). OmpR est composé d'un domaine récepteur en N-terminal (AA 1 à 124) et d'un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal (AA 137 à 239). Le domaine récepteur est un domaine très conservé constitué de cinq hélices α et des cinq feuillets β parallèles. Au niveau de l'hélice $\alpha 3$ et du feuillet $\beta 3$ est localisé l'aspartate 55, résidu recevant le phosphate d'EnvZ. Le domaine de liaison à l'ADN a été mis en évidence par des expérimentations d'empreintes à la DNase sur les régions promotrices des gènes *ompF* et *ompC* (Tate *et al.*, 1988). Il présente une structure wHTH essentielle pour la liaison à l'ADN.

En plus du capteur et du régulateur, un modulateur de ce système appelé MzrA (Modulator of EnvZ and OmpR A ou Modulateur d'EnvZ et OmpR A) a été mis en évidence à la fin des années 2000. En effet, en 2009, Gerken et ses collaborateurs découvrent une protéine de 127 acides aminés localisée dans la membrane interne et jouant un rôle dans l'activation du système EnvZ/OmpR. Ce modulateur MzrA est composé d'un domaine transmembranaire et d'une partie C-terminale exposée dans le périplasme (Gerken *et al.*, 2009). L'interaction avec EnvZ se fait grâce à leurs domaines périplasmiques respectifs (Gerken et Misra, 2010 ; Motz et Jung, 2018). Ils montrent que son effet ne varie pas ni en fonction de l'osmolarité ni en fonction du pH. Toutefois, MzrA appartient au régulon du phosphorelais CpxAR et est activé par le régulateur CpxR dans son état phosphorylé lors d'un stress de l'enveloppe (Vogt et Raivio, 2012). Gerken et ses collaborateurs établissent donc un modèle selon lequel MzrA et

EnvZ maintiennent une interaction constante dans des conditions normales de croissance et que ces interactions fluctuent lors d'un état de stress de l'enveloppe, et peut être par d'autres signaux environnementaux encore méconnus (Gerken et Misra, 2010).

3.2.1.2. Activité du système EnvZ/OmpR

Le système EnvZ/OmpR répond à de nombreux stimuli. L'osmolarité est le plus connu car le plus étudié à travers les porines OmpF et OmpC (Mizuno et Mizushima, 1990). Toutefois, d'autres stimuli ont été mis en évidence comme le pH acide ou la carence nutritionnelle. Comme pour l'osmolarité, ces deux stimuli ont été découverts grâce à une expression différenciée des porines. En effet, il est montré dans un milieu à pH acide que le gène *ompF* est réprimé par OmpR tandis que le gène *ompC* voit son expression légèrement augmentée (Heyde et Portalier, 1987 ; Sato *et al.*, 2000). De même, dans des conditions où la disponibilité en glucose est limitée, une activation de la transcription du gène *ompF* par OmpR est visible alors que l'expression de la porine OmpC ne varie pas (Liu et Ferenci, 1998).

Lors de la perception d'un de ces stimuli, EnvZ s'autophosphoryle sur le résidu His243 grâce à la présence d'ATP (Roberts *et al.*, 1994 ; Aiba *et al.*, 1989). Ce processus s'appelle une *trans*-phosphorylation (Park *et al.*, 1998). Le processus de dimérisation est essentiel pour cela et la phosphorylation s'effectue entre les monomères EnvZ. La molécule d'ATP se lie au niveau du domaine CA qui, par la conformation d'EnvZ, se retrouve proche des hélices α du domaine DHP. On a donc phosphorylation du premier monomère par le second monomère. Une fois le résidu histidine d'EnvZ phosphorylé, le groupement phosphate est transféré sur l'aspartate en position 55 d'OmpR (Delgado *et al.*, 1993 ; Aiba *et al.*, 1989). OmpR, selon son état de phosphorylation, peut moduler son régulon auquel appartiennent les gènes *ompF* et *ompC*.

L'état de phosphorylation d'OmpR dépend d'une balance équilibrée entre l'activité phosphatase, prédominante à basse osmolarité, et l'activité kinase, activée à haute osmolarité, du capteur EnvZ. En effet, ce dernier a la capacité de déphosphoryler le régulateur OmpR même si ce processus est encore assez mal compris à l'heure actuelle. L'hypothèse posée est que la déphosphorylation se ferait à l'inverse de la phosphorylation. Cependant, plusieurs scientifiques montrent que la réaction de déphosphorylation n'est pas l'inverse de la réaction de phosphotransfert et que le résidu histidine 243 n'est pas requis pour l'activité phosphatase (Skarphol *et al.*, 1996 ; Hsing et Silhavy, 1997).

Alors que le régulateur OmpR sous sa forme phosphorylée voit son affinité accrue pour l'ADN, il a été montré récemment que la régulation peut se faire aussi indépendamment de la phosphorylation. Ce mécanisme est appelé « activation non canionique ». OmpR, en

interagissant avec le capteur EnvZ peu phosphorylé, se dimérise. La dimérisation mime alors un état activé qui permet la modulation de certains gènes cibles (Chakraborty *et al.*, 2017 ; Kenney et Anand, 2020). Bien qu'OmpR sous sa forme non phosphorylée n'intervienne pas dans la régulation des porines, d'autres gènes cibles ont été mis en évidence comme l'opéron *cadBD* lors d'un stress acide (Chakraborty *et al.*, 2015 ; Chakraborty *et al.*, 2017).

3.2.1.3. Régulation des porines OmpF et OmpC par EnvZ/OmpR

Dans le régulon d'OmpR, les gènes *ompF* et *ompC* sont les plus connus et les plus étudiés car à l'origine de la découverte du phosphorelais. Les porines possèdent un rôle très important dans la bactérie, permettant la diffusion passive de petites molécules hydrophiles de moins de 600 Da au travers de la membrane (Decad et Nikaido, 1976). Auparavant considérée comme une seule et même porine, OmpF et OmpC diffèrent par la taille de leur pore. OmpF présente un pore plus large qu'OmpC (1,16 nm contre 1,09 nm) et génère donc un débit plus important.

Comme précisé précédemment, les porines OmpF et OmpC sont principalement osmorégulées par le système EnvZ/OmpR. Cette régulation est basée sur la variation de la quantité de protéines OmpR phosphorylée (OmpR-P) ainsi que sur la présence de sites de faible et forte affinité en amont des gènes *ompF* et *ompC* (Figure 11). Quatre sites de fixation ont été définis en amont d'*ompF* (F1, F2, F3 de forte affinité et F4 de faible affinité) contre trois dans la région régulatrice d'*ompC* (C1 à C3) (Harlocker *et al.*, 1995 ; Huang et Igo, 1996 ; Yoshida *et al.*, 2006).

Séquence Régulatrice d'*ompF* d'*E. coli*

```

CGATCATCCTGTTACGGAAATATTACATTGCAACATTACGCGCAAAAACTAATCCGCATTCTTATTGCGG
      F4
ATTAGTTTTTTCTTAGCTAATAGCACAAATTTTCATACTATTTTTTGGCATTCTGGATGTCTGAAAGAAGA
TTTTGTGCCAGGTCGATAAAGTTTCCATCAGAAACAAAATTTCCGTTTAGTTAATTTAAATATAAGGAAA
TCATATAAATAGATTAAAAATGCTGTAAATATCATCACGTCTCTATGGAAATATGACGGTGTTTACAAAAG
TTCCTTAAATTTTACPTTTGGTTACATATTTTCTTTTTGAAACCAAATCTTTATCTTTGTAGCACTT
      F1      F2      F3
TCACGGTAGCGAAACGTTAGTTTGAATGGAAAGATGCCTGCAGACACATAAAGACACCAAACCTCTCATCA
      +1
ATAGTTCCGTAAATTTTTATTGACAGAACTTATTGACGGCAGTGGCAGGTGTCATAAAAAAACCATGAG
GGTAATAAATAATG
  
```

Séquence Régulatrice d'*ompC* d'*E. coli*

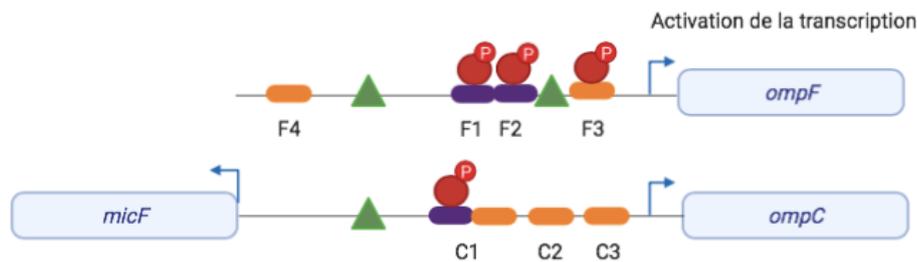
```

TTGTGAAATAGTTAACAAGCGTTATAGTTTTTCTGTGGTAGCACAGAATAATGAAAAGTGTGTAAAGAAG
GGTAAAAAACCGAATGCGAGGCATCCGGTTGAAATAGGGGTAAACAGACATTCAGAAATGAATGACGG
TAATAAATAAAGTTAATGATGATAGCGGGAGTTATTCTAGTTGCGAGTGAAGTTTTGTTTTGACATTCA
GTGCTGTCAAATACTTAAGAATAAGTTATTGATTTAACCTTGAATTATTATGCTTGATGTTAGGTGCT
      C1
TATTTGCCATTCCGCAATAATCTTAAAAAGTTCCCTTGCATTTACATTTTGAAACATCTATAGCGA
      C2      C3
TAAATGAAACATCTTAAAGTTTTAGTATCATATTCGTGTTGGATTATTCTGCATTTTTGGGGAGAATG
      +1
GACTTGCCGACTGATTAATGAGGGTTAATCAGTATGCAGTGGCATAAAAAAGCAAATAAAGGCATATAAC
AGAGGGTTAATAACATG
  
```

Figure 11 : Sites de fixation du régulateur OmpR en amont des gènes *ompF* et *ompC* chez *E. coli*. Les sites F1 à F4 pour *ompF* et C1 à C3 pour *ompC* sont indiqués et surlignés en gris.

Voici le modèle proposé : à basse osmolarité, EnvZ présente principalement une activité phosphatase ce qui entraîne une proportion d'OmpR phosphorylé très faible. De ce fait, OmpR-P, sous forme de dimère (Harlocker *et al.*, 1995), se fixe préférentiellement aux sites F1, F2, F3 et C1 ce qui entraîne la transcription du gène *ompF* mais pas du gène *ompC* (Huang et Igo, 1996). La bactérie présente donc un phénotype OmpF⁺ OmpC⁻ (Figure 12). Lors d'une hausse de l'osmolarité, le système est activé et OmpR est phosphorylé en quantité importante. OmpR-P se fixe alors sur tous les sites qu'ils soient de haute ou de basse affinité (Huang et Igo, 1996). La fixation sur les sites d'*ompC* permet alors la transcription du gène. La fixation sur le site F4 (-364 à -351) du gène *ompF* provoque une courbure de l'ADN au niveau d'un site IHF entraînant ainsi la répression du gène (Figure 12).

Basse Osmolarité



Haute Osmolarité

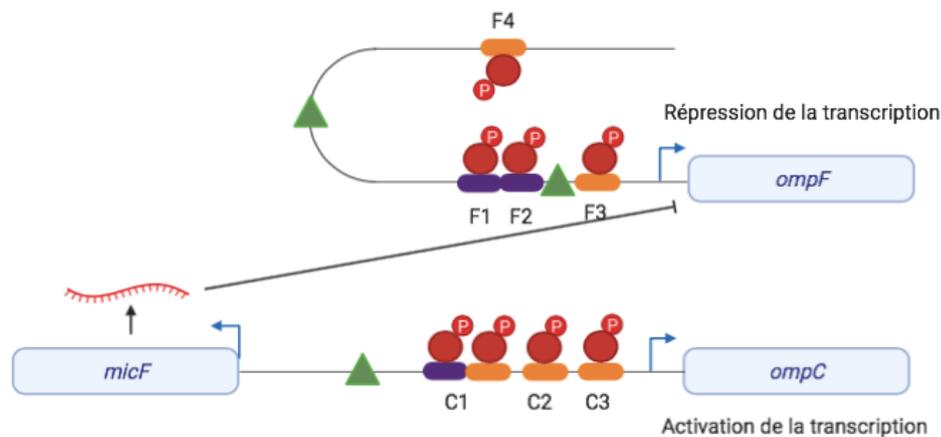


Figure 12 : Régulation de la transcription des gènes *ompF* et *ompC* par le régulateur OmpR.

A basse osmolarité, OmpR est faiblement phosphorylé. Les protéines OmpR-P se lient alors préférentiellement au niveau des sites de fixation de faible affinité ce qui entraîne la transcription du gène *ompF*. A haute osmolarité, OmpR est fortement phosphorylé ce qui permet une fixation de la protéine sur les sites de faible et forte affinité ce qui entraîne une transcription du gène *ompC* mais également la répression du gène *ompF* causée par la courbure de l'ADN formée au niveau du site IHF. Parallèlement à cela, l'ARN anti-sens MicF est exprimé et se fixe au niveau de l'ARNm OmpF, contribuant ainsi à sa répression.

En plus de la courbure de l'ADN, la répression se fait également de manière post-transcriptionnelle par l'ARN non-codant MicF (mRNA-interfering complementary RNA) (Figure 12). Le gène *micF*, situé en amont du gène *ompC*, est transcrit dans la direction opposée de ce dernier, partageant les sites de fixation d'OmpR (Pratt *et al.*, 1996 ; Delilhas et Forst, 2001). Il code un ARN de 93 nucléotides possédant la capacité de former un duplex au niveau du site de liaison ribosomique de l'ARN du gène *ompF* ce qui empêche sa traduction. Encore aujourd'hui, le rôle de MicF face aux variations de l'osmolarité est assez controversé (Pratt *et al.*, 1996).

Cette régulation OmpF/OmpC par le régulateur OmpR a été mise en évidence chez *E. coli*. Toutefois, les porines ne sont pas forcément présentes ni régulées de la même façon chez toutes les espèces bactériennes. En effet, chez *Salmonella enterica sv typhimurium*, la porine OmpF est bien régulée selon l'osmolarité comme chez *E. coli* mais ce n'est pas le cas pour la porine OmpC qui est exprimée à un niveau constant quelle que soit l'osmolarité (Martínez-Flores *et al.*, 1999). Chez *D. dadantii*, notre modèle d'étude, seule la porine OmpF est présente.

3.2.1.4. Le régulon d'OmpR

La régulation des porines est énormément mise en avant pour la compréhension du système EnvZ/OmpR. Néanmoins, le régulateur OmpR contrôle un régulon composé de plus d'une centaine de gènes (Oshima *et al.*, 2002). Parmi eux, on retrouve de nombreux gènes codant des composants de l'enveloppe bactérienne, notamment les systèmes intervenant dans le mécanisme de virulence (flagelle, curli, pili de type I ...).

L'opéron maître *flhDC*, première étape de la cascade de régulation de la motilité, est réprimé par OmpR-P qui se fixe sur deux sites dans la région promotrice (Shin et Park, 1995). Un site IHF entre les sites de fixation semble favoriser une répression comme pour le gène *ompF* avec une courbure de l'ADN (Kenney et Anand, 2020). OmpR est également connu pour réguler la synthèse des curli, structures jouant un rôle important dans la formation du biofilm. Ces curli sont codés par l'opéron *csgBA* lui-même régulé par un activateur transcriptionnel CsgD codé par l'opéron *csgDEFG*. Ce dernier est activé par OmpR (Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Tout comme *flhDC*, *ompF* ou *ompC*, des sites de fixation sont retrouvés en amont du gène (Gerstel *et al.*, 2003). En plus de réguler ces deux opérons essentiels au phénomène de virulence, la régulation d'OmpR sur d'autres gènes est mise en évidence. OmpR régule entre autres les gènes *vir* nécessaire à l'invasion de l'hôte par *Shigella flexneri*, la synthèse du polysaccharide Vi, élément de la capsule de *S. enterica sv typhimurium* ou encore la synthèse du système de type III en régulant un autre phosphorelais : SsrAB (Bernardini *et al.*, 1990 ; Perkins *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2000).

3.2.2. Le phosphorelais RcsCDB

3.2.2.1. Composition du système RcsCDB

Le système RcsCDB (Regulation of Capsular Synthesis ou Régulation de la synthèse de la capsule) fait exception à ce que l'on peut appeler les systèmes à deux composants « classiques ». Découvert chez *E. coli* en tant que régulateur des gènes *cps* codant les

exopolysaccharides de la capsule (Gottesman *et al.*, 1985), les scientifiques pensèrent tout d'abord qu'il était composé uniquement d'un capteur RcsC et d'un régulateur RcsB. Cependant, en 2001, Takeda et ses collaborateurs mettent en avant une troisième protéine dans cette voie de régulation : le phosphotransmetteur RcsD. RcsD présente des similitudes structurelles avec RcsC. Cependant, il ne possède pas de site histidine permettant l'autophosphorylation ni le motif HELRTP (Mizuno, 1997 ; Takeda *et al.*, 2001 ; Wall *et al.*, 2018). En réponse à des stimuli précis, le passage du résidu phosphate s'effectue dans l'ordre suivant : l'autophosphorylation se réalise sur le résidu histidine en position 479 de RcsC, le phosphate est alors transmis à l'aspartate 875 de RcsC, puis à l'histidine 842 de RcsD pour finir sur l'aspartate 56 de RcsB (Figure 13) (Majdalani et Gottesman, 2005).

En plus des trois protéines RcsCDB, il existe deux modulateurs, IgaA et DjlA ainsi qu'un transmetteur intermédiaire RcsF. RcsF est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe connue pour activer le système RcsCDB (Castanié-Cornet *et al.*, 2006). Formant un complexe avec les protéines BamA ou OmpA, RcsF est nécessaire à la détection des dommages de l'enveloppe bactérienne (Cho *et al.*, 2014 ; Asmar *et al.*, 2017). Découvert chez *S. enterica* sv *typhimurium*, IgaA est une protéine transmembranaire ayant un rôle d'atténuateur du système RcsCDB. Cette protéine est essentielle. En effet, un mutant *igaA* n'est pas viable chez *E. coli* (Cho *et al.*, 2014). Les modulations de RcsCDB par IgaA et RcsF sont étroitement liées. En effet, lors d'un stimulus, RcsF se désolidarise de la machinerie Bam et interagit directement avec le domaine périplasmique d'IgaA ce qui lève la répression exercée sur le système RcsCDB (Cho *et al.*, 2014 ; Hussein *et al.*, 2018) (Figure 13). En plus de cette voie régulatrice, DjlA, protéine membranaire, régule négativement le phosphorelais en intervenant sur le domaine périplasmique de RcsC ou RcsD (Shiba *et al.*, 2006). Cette régulation se fait indépendamment de la voie RcsF/IgaA (Majdalani et Gottesman, 2005).

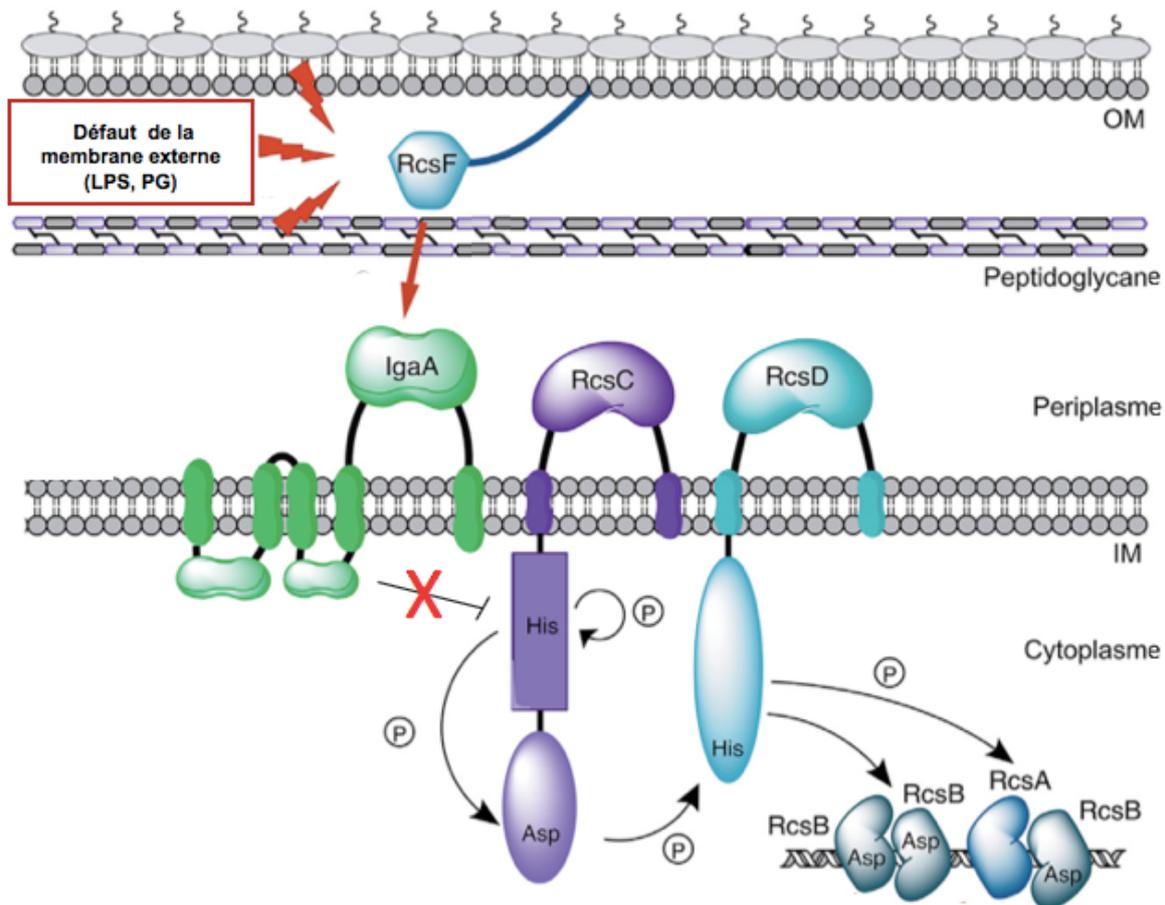


Figure 13 : Représentation du système RcsCDB.

Le système RcsCDB répond à de nombreux signaux. IgaA est une protéine transmembranaire régulant négativement le système RcsCDB. RcsF, lipoprotéine de la membrane externe, perçoit les défauts de la membrane externe ou du périplasmé comme des modifications au niveau des lipopolysaccharides ou du peptidoglycane. RcsF agit directement sur IgaA afin d'activer le phosphorelais RcsCDB. RcsC s'autophosphoryle sur son résidu histidine 479. Le phosphate est alors transmis sur son résidu aspartate en position 875, sur l'histidine 842 de RcsD puis pour finir sur l'aspartate 56 du régulateur RcsB. Ce dernier peut alors se dimériser avec lui-même ou avec la protéine co-régulatrice RcsA. (Adapté de Cho *et al.*, 2014).

3.2.2.2. La réponse de RcsCDB face aux stimuli

Comme tout phosphorelais, RcsCDB répond à un certain nombre de signaux. Parmi eux, on retrouve la variation d'osmolarité et de pH ainsi que la déstabilisation de la membrane causée par des modifications des lipoprotéines ou du peptidoglycane (Sledjesk et Gottesman, 1996 ; Wall *et al.*, 2018 ; Parker *et al.*, 1992 ; Majdalani et Gottesman, 2005). Face à ces stimuli, la cascade de phosphorylation RcsCDB est activée ce qui conduit à la régulation de plus de 150 gènes cibles chez *E. coli* (Ferrières et Clarke, 2003).

RcsB agit sur le régulon en tant que dimère. Il se retrouve sous forme homodimère ou sous forme hétérodimère. La forme hétérodimère la plus courante est RcsA-RcsB mais on retrouve aussi RcsB en couple avec GadE, BglJ et MatA (Wall *et al.*, 2018). RcsA est une protéine co-régulatrice qui se lie avec RcsB phosphorylé tandis que les trois autres agissent avec RcsB non phosphorylé (Figure 14). Chacun de ces couples répond à des stimuli différents. Parmi les gènes cibles de l'hétérodimère RcsA-RcsB, on retrouve les gènes *wza* codant les exopolysaccharides ou encore le gène *rcaA* lui-même (Ebel et Trempey, 1999) (Figure 14). L'homodimère RcsB régule lui aussi un ensemble de gènes dont font partie *osmC* codant une peroxydase périplasmique, *osmB* codant une lipoprotéine osmorégulée de fonction inconnue, *ftsZ* essentiel dans la division cellulaire, *bdm* important pour la formation du biofilm mais également le gène *rprA* codant un petit ARN activant la traduction de RpoS (Sturny *et al.*, 2003 ; Boulanger *et al.*, 2005 ; Madjalani et Gottesman, 2005). L'opéron *flhDC* présente une particularité. En effet, il peut être régulé à la fois par l'homodimère RcsB et par l'hétérodimère RcsA-RcsB car il possède les deux boîtes de fixation nécessaires en amont du site de transcription (Francez-Charlot *et al.*, 2004).

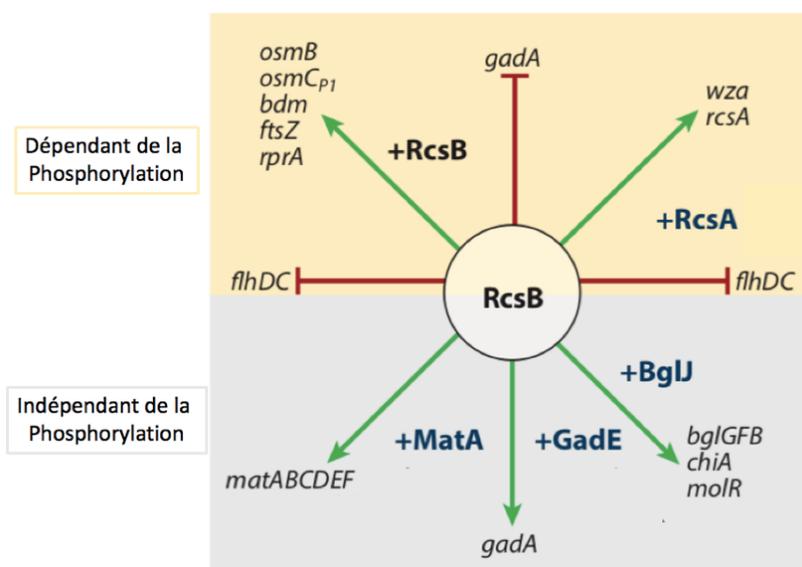


Figure 14 : Une partie du régulon de RcsB chez *E. coli*.

RcsB peut agir en homodimère ou en hétérodimère avec diverses protéines auxiliaires. RcsB phosphorylé se lie à lui-même (+RcsB) ou à RcsA pour réguler positivement (→) ou pour réprimer (-) l'expression des gènes cibles. Les protéines auxiliaires MatA, GadE et BglJ utilisent RcsB non phosphorylé pour activer ou réprimer l'expression des gènes cibles (Adapté de Wall *et al.*, 2018).

3.2.2.3. Le système RcsCDB chez *D. dadantii*

Chez *D. dadantii*, Bouchart et ses collaborateurs ont mis en avant une relation particulière entre les OPG et le phosphorelais RcsCDB. En effet, suite à une mutagenèse à la nitrosoguanidine, un mutant RcsC2 a été obtenu. Ce dernier présentait une substitution du résidu alanine en position 463 en résidu valine, la mutation se situant près de l'histidine phosphorylable en position 479. Cette mutation dominante entraîne un rétablissement de la motilité et de la virulence dans une souche dépourvue en OPG (Figure 15) (Bouchart *et al.*, 2010). Cette restauration phénotypique est causée par une activation constitutive du phosphorelais RcsCDB. Cette activation varie en fonction de la concentration d'OPG dans l'espace périplasmique (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013). Tout d'abord mis en avant par l'étude de gènes cibles comme *flhD* ou *ftsA*, l'activation constitutive de RcsB a été confirmée quelques années plus tard grâce à la technique du PhosTag permettant l'observation directe de l'état de phosphorylation du régulateur RcsB dans différents contextes géniques (Figure 15). Ils montrent alors que RcsB présente un taux de phosphorylation de 36% en absence d'OPG contre un niveau basal de 20% dans une souche sauvage (Madec *et al.*, 2014).

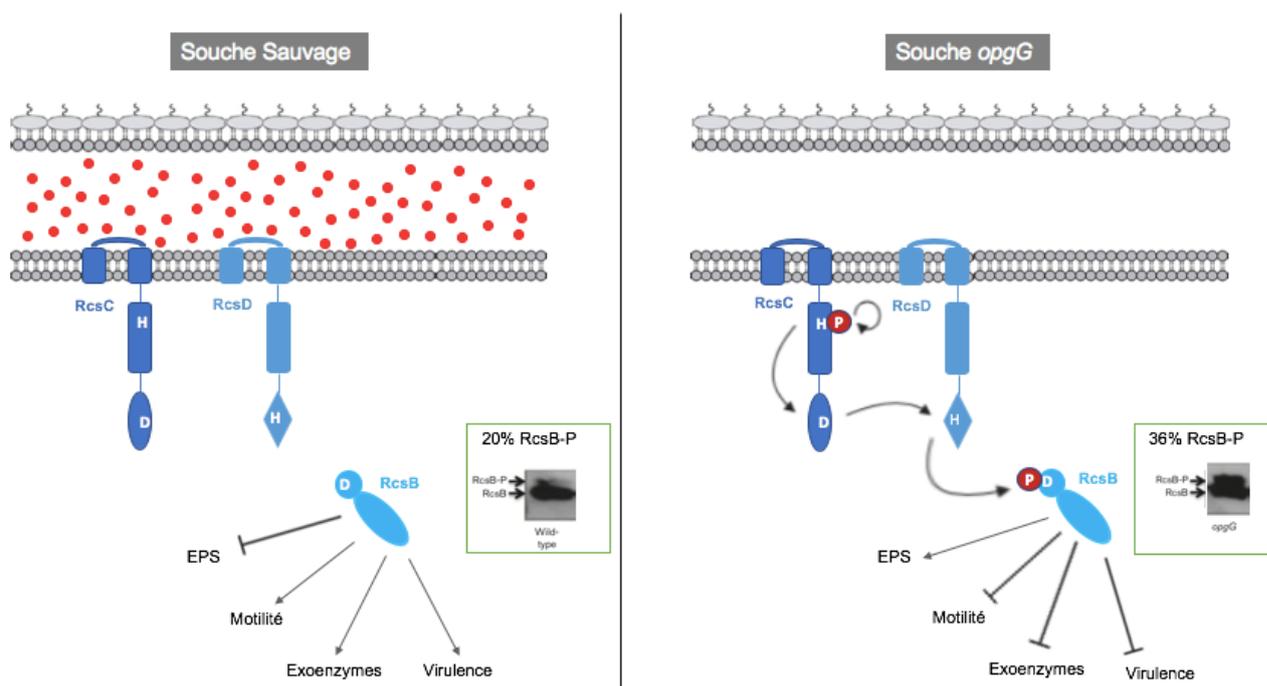


Figure 15 : Activation du système RcsCDB dans une souche dépourvue d'OPG.

L'absence d'OPG dans une souche de *D. dadantii* entraîne une activation constitutive du phosphorelais RcsCDB. RcsB, qui est phosphorylé à un taux de 36%, régule négativement les gènes de la motilité et d'exoenzymes causant de ce fait une perte de virulence et active les gènes de synthèse des exopolysaccharides.

3.2.3. Le phosphorelais CpxAR

3.2.3.1. Composition du système CpAR

Tout comme RcsCDB, CpxAR (Conjugative Pilus Expression ou Expression du pilus conjugatif) est un des phosphorelais les plus étudiés à l'heure actuelle. Le locus *cpxA**cpxR* a été découvert pour la première fois en 1980 chez un mutant d'*E. coli* K12 présentant une baisse d'expression du pilus conjugatif du plasmide F (McEwen et Silverman, 1980). CpxAR est un phosphorelais constitué d'un capteur CpxA et d'un régulateur CpxR. Lors d'un stimulus précis, CpxA s'autophosphoryle sur le résidu histidine en position 248 puis transmet le phosphate sur le résidu aspartate du régulateur en position 51 (Raivio et Silvahy, 1997) (Figure 16). Contrairement aux autres phosphorelais, le capteur CpxA possède non pas une activité kinase prédominante mais une activité principalement phosphatase que ce soit chez les bactéries zoopathogènes ou phytopathogènes (Raivio et Silvahy, 1997 ; Wolfe *et al.*, 2008 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2015).

3.2.3.2. La réponse du système CpxAR face aux stimuli

CpxAR répond à de multiples stimuli causant des stress de l'enveloppe tels que le pH alcalin, une concentration élevée en NaCl, le mauvais repliement des protéines, les défauts dans le transport des lipoprotéines ou encore l'attachement aux surfaces hydrophobes même si ce dernier stimulus a été remis en question récemment (Wolfe *et al.*, 2008 ; Tschauer *et al.*, 2014 ; Delhaye *et al.*, 2019 ; May *et al.* ; 2019 ; Vogt et Raivio, 2012). CpxAR possède un régulon très important composé de plusieurs centaines de gènes divers et variés (Figure 16). Toutefois, on peut regrouper certains gènes selon leurs rôles (Raivio *et al.*, 2013) :

- Les gènes codant les facteurs de repliement et de dégradation des protéines de l'enveloppe. Ex : *degP* codant une protéase, *dsbA* codant une enzyme catalysant les liaisons disulfures, *spy* codant une protéine chaperon ou *cpxP* codant une protéine adaptative de DegP (Danese *et al.*, 1995 ; Raivio et Silhavy, 1997 ; Vogt et Raivio, 2012).
- Les gènes impliqués dans le métabolisme et la structure des composants de l'enveloppe bactérienne. Ex : *ompF* codant une porine de la membrane externe, *amiA* et *amiC* codant des enzymes essentielles à la dégradation du peptidoglycane (Batchelor *et al.*, 2005 ; Vogt et Raivio, 2012)
- Les gènes nécessaires à l'adhérence, le biofilm et la pathogénèse. Ex : opéron *flhDC*, opéron *motABcheAW* codant des composants nécessaires à la motilité, *ydeH* jouant un rôle important dans la formation du biofilm (Raivio *et al.*, 2013 ; De Wulf *et al.*, 1999).

Une partie du régulon de CpxAR est commun aux deux autres voies intervenant dans la réponse au stress de l'enveloppe : le phosphorelais BaeSR et le facteur σE (Raffa et Raivio, 2002 ; Raivio *et al.*, 2013). Étonnamment, CpxAR réprime le facteur σE lorsqu'il est activé. Au contraire, il régule positivement son propre opéron (De Wulf *et al.*, 1999). L'hypothèse posée est que CpxAR est utile lors des premiers stades de l'infection (adhésion, invasion) alors que la voie σE joue plutôt un rôle dans la survie et le maintien post-invasion (Raivio, 2005).

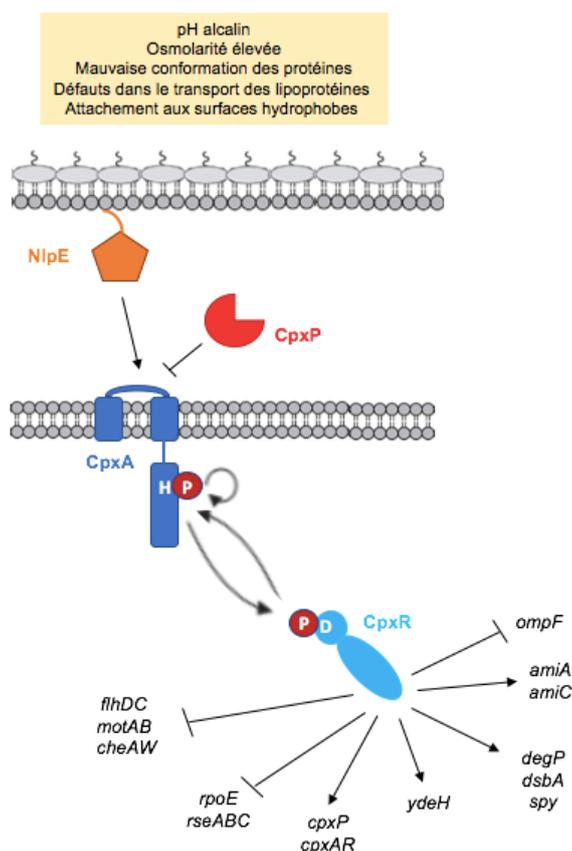


Figure 16 : Représentation du phosphorelais CpxAR.

CpxAR répond à de nombreux stimuli provoquant un stress de l'enveloppe. CpxP et NlpE sont des modulateurs de CpxAR, réprimant et activant respectivement le système. Lors de l'activation du système, CpxA s'autophosphoryle sur l'histidine 249 puis le phosphate est transféré sur l'aspartate 51 du régulateur. CpxR agit sur de nombreux gènes cibles intervenants entre autres dans la mise en place de l'enveloppe bactérienne et dans la pathogenèse.

En plus de CpxA et CpxR, le phosphorelais requiert deux modulateurs supplémentaires : NlpE et CpxP (Figure 16). NlpE joue un rôle d'activateur auprès de CpxAR alors que CpxP a un rôle répresseur. A l'origine utilisé en excès pour activer CpxAR, le rôle de NlpE, qui est une lipoprotéine de la membrane externe, a été défini plus précisément. En effet, il a été montré depuis que NlpE perçoit des stimuli multiples : l'adhésion aux surfaces hydrophobes, les protéines oxydatives mal conformées et les défauts du trafic des lipoprotéines vers la membrane externe réalisé grâce au système LolABCDE (Delhaye *et al.*,

2019 ; May *et al.* ; 2019 ; Vogt et Raivio, 2012). NlpE, par son domaine N-terminal, agit directement sur le domaine périplasmique du capteur CpxA afin d'activer le phosphorelais (Delhaye *et al.*, 2019) (Figure 17). CpxP, protéine périplasmique, a pour rôle de réprimer le phosphorelais CpxAR en interagissant avec CpxA. En effet, la surface concave chargée positivement de CpxP se fixe au niveau du domaine périplasmique de CpxA chargé négativement pour le réprimer (Zhou *et al.*, 2011 ; Tschauner *et al.*, 2014). CpxP, contrairement à NlpE, ne détecte pas les modifications de l'enveloppe bactérienne mais répond au pH alcalin, au NaCl et aux sous-unités du pilus PapE mal conformées (Tschauner *et al.*, 2014). Même si le mécanisme de réponse au pH alcalin et NaCl n'est pas encore connu, le processus en cas de mauvais repliement de PapE est bien décrit. En présence de protéine PapE mal conformée, CpxP se fixe à cette dernière afin de l'amener à DegP, une protéase périplasmique qui dégrade PapE et CpxP (Isaac *et al.*, 2005). CpxAR, n'étant plus réprimé par CpxP, peut s'activer (Figure 17).

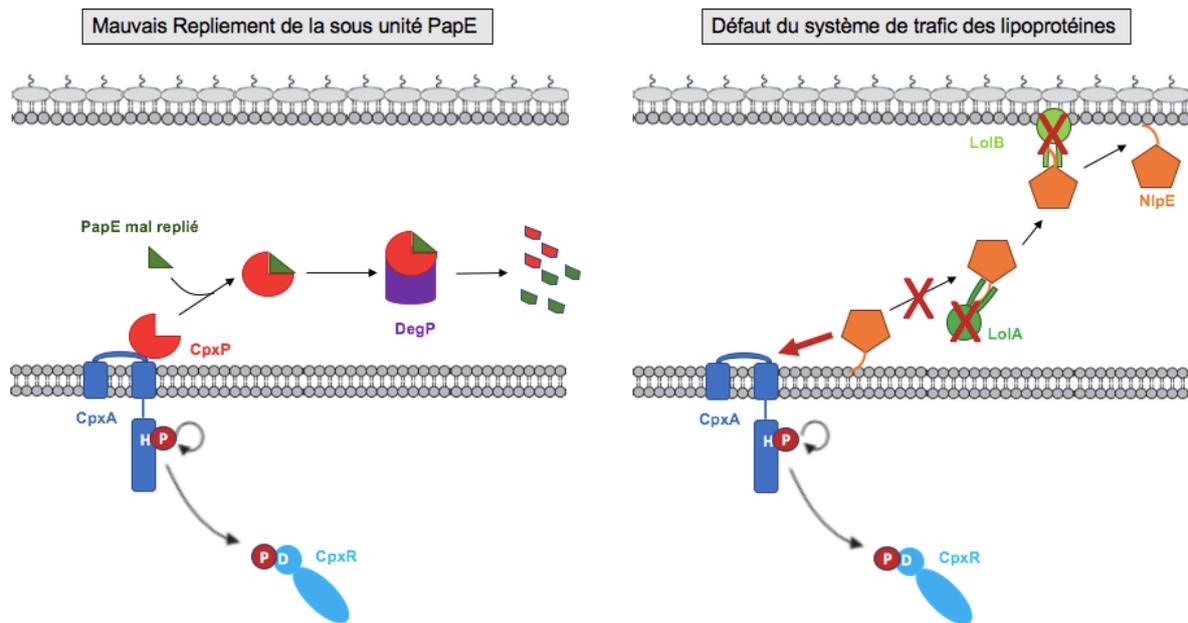


Figure 17 : Représentation des voies d'activation du phosphorelais CpxAR.

CpxP est un répresseur périplasmique de CpxA (gauche). Un de ces signaux d'activation est le mauvais repliement de la sous-unité du pilus PapE. Dans ce cas, CpxP se lie à PapE et l'emmène à DegP qui clive alors les deux protéines. CpxA est ainsi activée. NlpE, lipoprotéine de la membrane externe, est un activateur de CpxAR agissant entre autres lors d'un défaut du système de trafic des lipoprotéines (Droite). En cas de stress, NlpE, habituellement transféré dans la membrane externe par le système Lol, reste ancré dans la membrane interne. Elle interagit alors directement avec CpxA afin d'activer le système.

3.2.3.3. Le système CpxAR chez *D. dadantii*

Jusqu'en 2015, les études réalisées sur CpxAR portent uniquement sur les bactéries zoopathogènes. En 2015, Bontemps-Gallo et ses collaborateurs étudient le rôle de CpxAR dans la bactérie phytopathogène *D. dadantii*. Ils montrent qu'une bactérie présentant une phosphorylation constitutive de CpxR, causée par une délétion de *cpxA*, et une bactérie dépourvue du régulateur présentent toutes deux des phénotypes semblables. En effet, dans les deux cas sont observées une perte de motilité et une perte de sécrétion d'exoenzymes causant de ce fait une perte de virulence (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015). Ils mettent également en avant le rôle important de CpxAR dans la réponse aux défenses de la plante. CpxAR est donc impliqué durant les premières étapes de l'infection de l'hôte. Cela est confirmé par des analyses de PhosTag *in planta* présentant une hausse de la proportion de CpxR phosphorylé durant les deux premiers jours d'infections (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015).

4. Objectifs de la thèse

Les bactéries interagissent continuellement avec leur environnement ce qui nécessite de leur part une adaptation constante. Les phosphorelais, présents dans une très grande majorité de bactéries, sont les facteurs clés de la perception et de l'adaptation environnementale.

Ma thèse porte sur la compréhension du rôle biologique du phosphorelais EnvZ/OmpR chez notre bactérie modèle *D. dadantii*. Plusieurs problématiques ont été abordées. Pour commencer, je me suis intéressée aux relations entre le phosphorelais et les OPG, connus pour activer et moduler d'autres systèmes. Cette étude a débouché sur de nombreux questionnements concernant les stimuli activant le phosphorelais et le régulon d'OmpR ainsi que sur son implication dans la virulence. J'ai donc poursuivi mes travaux en étudiant l'activation du phosphorelais EnvZ/OmpR face aux variations de pH et de l'osmolarité, deux stress majeurs identifiés lors de l'infection, et en étudiant l'expression d'*ompF*, un des gènes cibles du régulon, face à ces différents stress. Pour finir, je me suis intéressée à la capacité de virulence de mutants du phosphorelais EnvZ/OmpR et plus globalement à son niveau d'activation lors du processus infectieux.

Résultats

1. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont nécessaires à l'activation du phosphorelais EnvZ/OmpR mais ne modulent pas son activité.

Les analyses en qRT-PCR ont été réalisées par le Dr Sébastien Bontemps-Gallo (UMR8204).

Précédemment, le laboratoire a pu mettre en avant une relation forte entre le phosphorelais RcsCDB et les OPG, notamment en établissant le contrôle du niveau d'activation du phosphorelais par la variation de la concentration d'OPG (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013). Sur les 32 phosphorelais de *D. dadantii*, nous nous sommes demandé si d'autres systèmes, connus pour répondre à l'osmolarité, pouvaient être modulés par les OPG. Nous avons choisi de nous concentrer sur le système EnvZ/OmpR. En effet, le laboratoire a montré que ce dernier, associé à RcsCDB, joue un rôle dans la régulation de la succinylation des OPG (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016). Cette régulation, associée au fait que les deux systèmes sont activés par l'osmolarité et que l'inactivation d'EnvZ/OmpR chez *E. coli* restaure la motilité dans une souche dépourvue d'OPG (Fiedler et Rotering, 1988), nous a conduit à nous intéresser à cette relation. En parallèle, nous nous sommes également intéressés à la relation du phosphorelais CpxAR avec les OPG car ce phosphorelais répond à l'osmolarité et aux stress causés par une modification de l'enveloppe bactérienne (Raivio *et al.*, 2013).

1.1. L'inactivation du système EnvZ/OmpR entraîne un rétablissement des pectinases dans une souche dépourvue d'OPG.

Afin de définir les interactions entre les OPG et le phosphorelais, les gènes *envZ* et *ompR* sont inactivés par insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine en contexte sauvage et en contexte *opgG*. L'interruption des gènes *cpxA* et *cpxR* étant déjà réalisée (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015), les mutations sont transférées dans une souche dépourvue d'OPG.

Une souche *opgG* présentant une altération de nombreux facteurs de virulence, nous avons cherché à savoir si l'inactivation du système EnvZ/OmpR entraîne une modification de ces phénotypes. Différents tests phénotypiques sont réalisés en commençant par l'observation de la sécrétion des différentes exoenzymes (cellulases, pectinases, protéases) et la mucosité. En effet, il est avéré qu'une souche dépourvue en OPG est altérée dans sa

production d'exoenzymes et possède un aspect muqueux causé par un excès de sécrétion d'exopolysaccharides (Page *et al.*, 2001). La sécrétion des différentes exoenzymes est évaluée sur boîtes de Petri CMC (qui contient du carboxyméthylcellulose), PGA (qui contient du polygalacturonate) et LB Lait afin d'observer la sécrétion de cellulases, pectinases et protéases respectivement. La sécrétion des exopolysaccharides est testée sur milieu minimum M63 complémenté avec du glycérol 0,2%.

Comme précédemment décrit dans la littérature, les mutants *cpxA* et *cpxR* présentent une altération de leur capacité à sécréter les cellulases et les pectinases (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015). En effet, on observe une baisse du diamètre du halo de dégradation du CMC et du PGA chez une souche *cpxA* et *cpxR* comparativement à une souche sauvage. Ce niveau de sécrétion est semblable que l'on soit en contexte sauvage ou en contexte *opgG* (Figure 18). Au contraire, aucune différence de phénotype n'est observée en ce qui concerne la production de protéases et la mucosité quand le phosphorelais CpxAR est inactivé quel soit le contexte génique (Tableau 1). Cette similarité phénotypique est visible également lors de l'inactivation du phosphorelais EnvZ/OmpR. Les mutants *envZ* et *ompR* présentent une sécrétion de protéases et un aspect non muqueux semblable à la souche sauvage tandis que les clones *envZ opgG* et *ompR opgG* ne sécrètent pas de protéases et ont un aspect muqueux semblable à une souche *opgG* (Tableau 1).

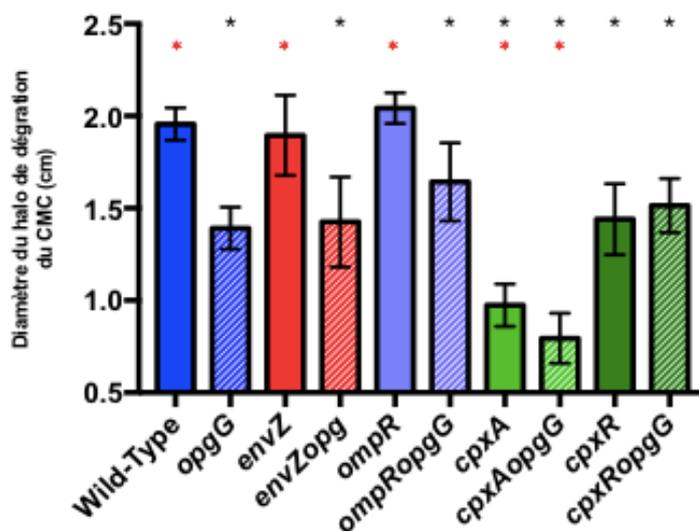
	Wild-Type	<i>opgG</i>	<i>envZ</i>	<i>envZ opgG</i>	<i>ompR</i>	<i>ompR opgG</i>	<i>cpxA</i>	<i>cpxA opgG</i>	<i>cpxR</i>	<i>cpxR opgG</i>
Protéases	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Mucosité	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Tableau 1 : Activité des protéases et aspect des colonies des différentes souches.

La capacité à sécréter des protéases ainsi que l'aspect muqueux ou non des colonies sont observés sur milieu LB Lait 10% et milieu M63 glycérol après 48H d'incubation à 30°C. La présence ou l'absence de ces phénotypes est représentée par le signe + ou -.

De même, en ce qui concerne la production des cellulases, les mutants *envZ* et *ompR* présentent un niveau similaire à la souche sauvage et les mutants *envZ opgG* et *ompR opgG* montrent une baisse de sécrétion semblable à ce qui est observable chez la souche *opgG*. En revanche, en ce qui concerne la sécrétion de pectinases, des différences sont visibles. Si l'inactivation d'EnvZ/OmpR n'entraîne pas de différences en contexte sauvage (WT : 2,55 cm ; *envZ* : 2,59 cm ; *ompR* : 2,79 cm), on observe un rétablissement de la production de pectinases en contexte *opgG* quand le phosphorelais EnvZ/OmpR est inactivé (Figure 18). En effet, les doubles mutants *envZ opgG* et *ompR opgG* montrent une restauration quasi-totale de la production avec un niveau similaire à celui observé dans la souche sauvage (WT : 2,55 cm, *opgG* : 1,55 cm, *envZ opgG* : 2,45 cm, *ompR opgG* : 2,61 cm ; Figure 18).

A/



B/

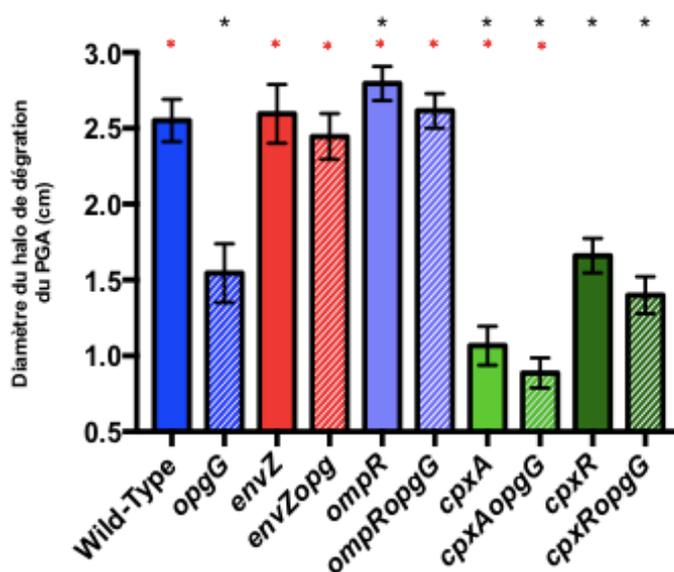


Figure 18 : Effet des mutations des phosphorelais EnvZ/OmpR et CpxAR sur l'activité des cellulases (A) et des pectinases (B).

La capacité à sécréter des cellulases et des pectinases a été observée sur milieu M63 complété avec du glycérol 0,2% ainsi que de carboxyméthylcellulose (CMC) ou polygalacturonate (PGA) après 48H d'incubation à 30°C. L'activité est estimée en mesurant le diamètre du halo de dégradation. Les données représentent la moyenne de vingt expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative avec la souche sauvage (*) et la souche *opgG* (*) respectivement (* $p < 0,0001$).

Prises ensemble, ces données nous montrent que le phosphorelais EnvZ/OmpR est impliqué que dans la régulation des pectinases. En effet, nous montrons qu'un défaut du phosphorelais permet la restauration de la sécrétion des pectinases dans un mutant dépourvu d'OPG. Pour rappel, les pectinases jouent un rôle majeur dans la dégradation de la paroi végétale et de ce fait dans le phénomène de virulence.

1.2. Le phosphorelais EnvZ/OmpR est impliqué dans la régulation de la motilité.

Une fois l'analyse de la sécrétion des exoenzymes et exopolysaccharides effectuée, l'étude est poursuivie par l'analyse de la motilité, facteur de virulence essentiel à la colonisation de l'hôte (Antúnez-Llamas *et al.*, 2009 [B]). Elle est évaluée sur milieu M63 faiblement gélosé (0,4% d'agar). Comme publié précédemment, les mutants *cpxR* et *cpxA* présentent une altération de la motilité en contexte sauvage (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015). Ce phénotype reste semblable en contexte *opgG* avec des halos de nage similaires pour les différents mutants *opgG*, *cpxA*, *cpxA opgG*, *cpxR* et *cpxR opgG* (0,97 cm +/- 0,1 cm ; Figure 19). Comme pour le phosphorelais CpxAR, l'inactivation du phosphorelais EnvZ/OmpR entraîne une réduction de la motilité (Figure 19). En effet, cette diminution représente une baisse d'environ 25% du diamètre du halo de nage par rapport à la souche sauvage. Alors qu'une restauration de la motilité dans une souche dépourvue d'OPG est observée chez *E. coli* (Fiedler et Rotering, 1988), ce n'est pas le cas chez *D. dadantii*. En effet, pour les mutants *envZ opgG* et *ompR opgG*, le diamètre du halo est semblable à celui observé dans une souche *opgG* (0,97 cm pour *opgG*, 1,06 cm pour *envZ opgG*, 0,99 cm pour *ompR opgG* ; Figure 19).

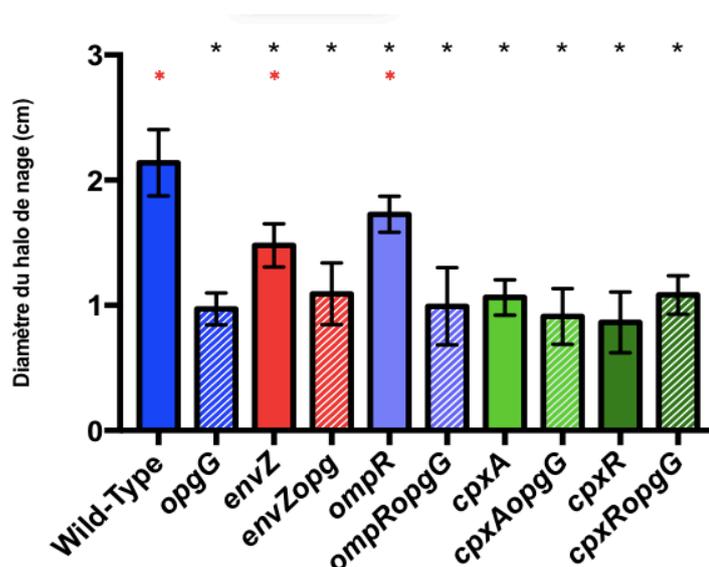


Figure 19 : Effet des différentes mutations des phosphorelais EnvZ/OmpR et CpxAR sur la motilité.

La motilité a été observée sur milieu M63 complémenté avec du glycérol 0,2% et 0,4% d'agar après 48H d'incubation à 30°C. La motilité est estimée en mesurant le diamètre du halo de nage. Les données représentent la moyenne de vingt expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative avec la souche sauvage (*) et la souche *opgG* (*) respectivement (*p < 0,0001).

Afin de confirmer ces données, une qRT-PCR est réalisée sur deux gènes impliqués dans la cascade de régulation de la motilité : le gène *flhD* appartenant à l'opéron maître *flhDC* se situant à la base de la régulation et le gène *fliC* codant la flagelline, constituant du filament

du flagelle. La souche sauvage, la souche *opgG* et les différents mutants du phosphorelais EnvZ/OmpR sont cultivés en milieu M63 complété avec du glycérol 0,2% à différentes osmolarités (M63 dilué au 1/2, M63, M63 + 0,1M NaCl et M63 + 0,2M de NaCl correspondant respectivement à 170, 330, 500 et 700 mOsm). Pour commencer, on peut observer qu'une inactivation du système EnvZ/OmpR entraîne une diminution de 20 à 30% de l'expression du gène *flhD* et par conséquent du gène *fliC* (Figure 20). Cela correspond aux données obtenues lors des tests semi-solides. Les résultats obtenus aux différentes osmolarités montrent également une variation de l'expression des gènes *flhD* et *fliC*. En effet, plus l'osmolarité augmente, plus l'expression des gènes diminue dans les souches sauvage, *ompR* et *envZ* (Figure 20).

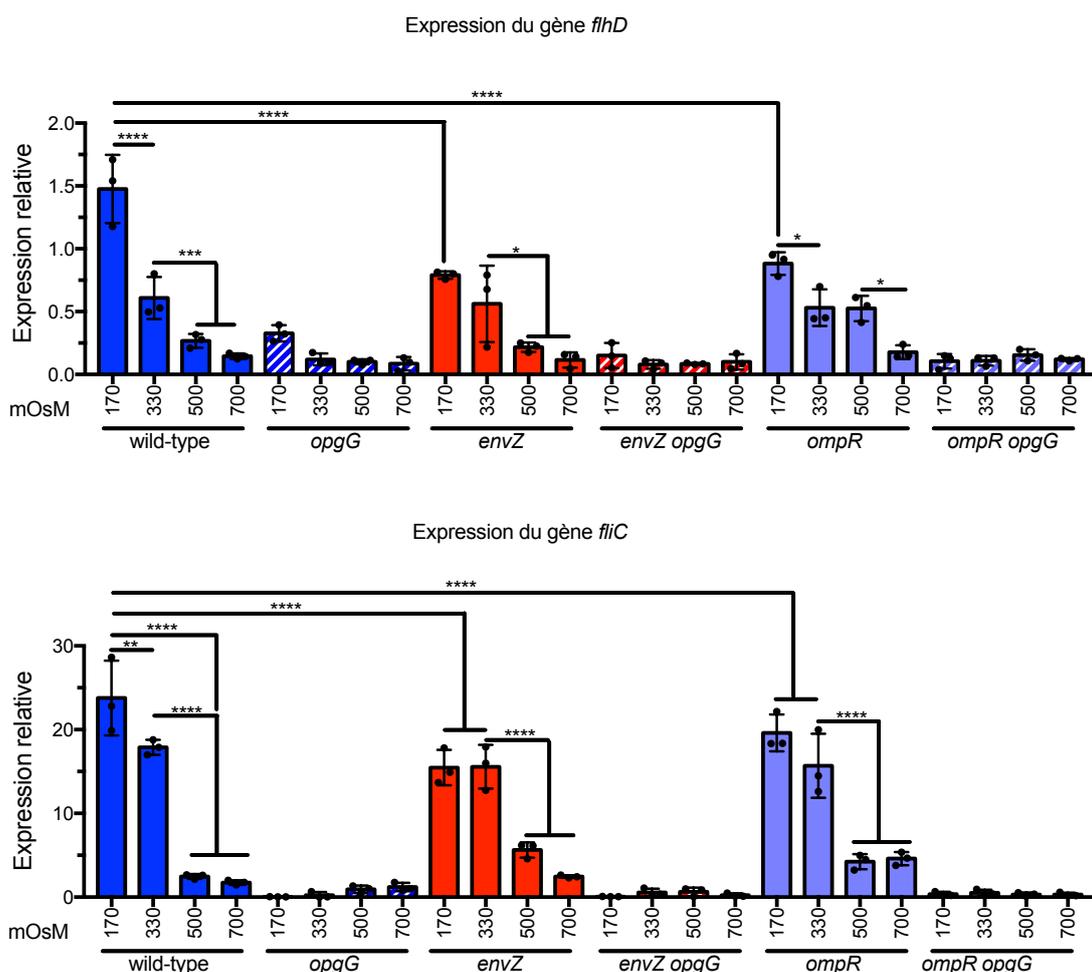


Figure 20 : Expression des gènes *flhD* et *fliC* à différentes osmolarités.

Les bactéries sauvage, *opgG*, *envZ*, *envZ opgG*, *ompR* et *ompR opgG* sont cultivées à 170, 330, 500 et 700 mOsm. L'expression des gènes *flhD* et *fliC* est analysée par qRT-PCR. L'expression relative des gènes est calculée en utilisant le gène *ipxC* comme gène de référence (Hommais *et al.*, 2011). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (****p < 0,0001 ; ***p < 0,001 ; **p < 0,01 ; *p < 0,05).

Ces résultats nous montrent donc que le régulateur OmpR joue un rôle d'activateur dans la régulation de l'opéron maître *flhDC*, entraînant une baisse visible de la capacité de nage des bactéries. La variation des gènes observée selon l'osmolarité peut dépendre en partie de l'état de phosphorylation d'OmpR, l'osmolarité étant un stimulus du phosphorelais chez *E. coli*.

1.3. L'inactivation du phosphorelais EnvZ/OmpR dans une souche dépourvue d'OPG rétablit une virulence partielle en pomme de terre.

L'inactivation du phosphorelais entraînant une baisse de la motilité en contexte sauvage (Figure 20) et une restauration des pectinases en contexte *opgG* (Figure 18B), nous nous sommes interrogés sur la virulence des différentes souches. Des tests de virulence sont donc réalisés sur deux modèles d'étude distincts connus comme cible de *D. dadantii* : l'endive (*Cichorium intybus*) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Pour commencer, l'inactivation du phosphorelais en endive entraîne des phénotypes semblables soit à la souche sauvage (pour *envZ* et *ompR*) soit à la souche *opgG* (pour *envZ opgG* et *ompR opgG*) (Figure 21). En revanche, lorsqu'on infecte la pomme de terre, on observe des phénotypes différents. Si l'infection est similaire pour EC3937, *ompR* et *envZ*, ce n'est pas le cas en contexte *opgG*. En effet, alors qu'une absence de virulence est observable dans une souche *opgG*, un rétablissement de macération est visible pour les mutants *envZ opgG* et *ompR opgG*. Afin d'observer la sévérité de la maladie, la macération est prélevée et pesée pour toutes les souches. Bien qu'un rétablissement de la macération soit observé dans les souches *envZ opgG* et *ompR opgG*, la quantité de macération obtenue est significativement différente de la souche sauvage (Figure 22). Ce rétablissement est donc partiel.



Figure 21 : Pathogénicité de la souche sauvage et des mutants *opgG*, *ompR*, *ompR opgG*, *envZ* et *envZ opgG* sur feuilles d'endive.

Les feuilles d'endive sont inoculées avec 10^7 bactéries. L'apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 72H.

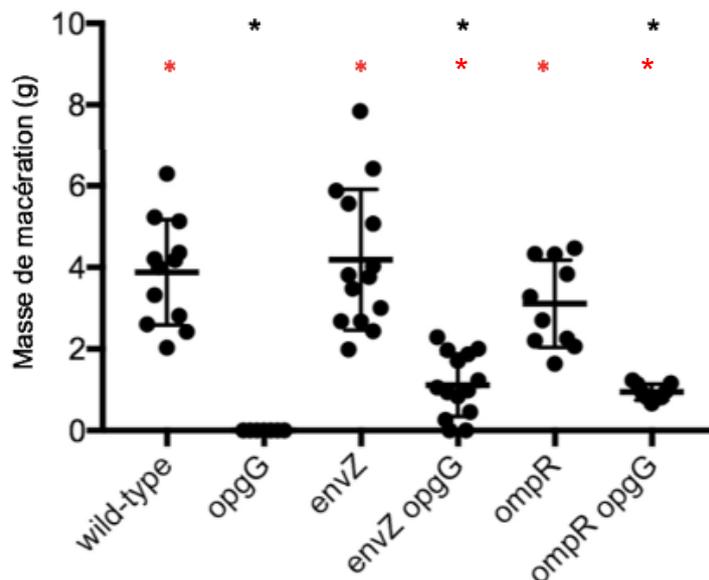


Figure 22 : Masse de la macération obtenue sur tubercule de pomme de terre suite à l'infection de la souche sauvage et des mutants *opgG*, *ompR*, *ompR opgG*, *envZ* et *envZ opgG*.

Les tubercules de pomme de terre sont inoculés avec 10^7 bactéries. L'apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 72H. La pomme de terre est coupée en deux afin d'observer le phénomène de macération. La pourriture molle est récupérée et pesée (g). Les données représentent la moyenne d'au moins dix expériences indépendantes. Les symboles astérisque* et * indiquent une différence significative avec la souche sauvage et la souche *opgG* respectivement (* $p < 0,0001$).

Ces données montrent que le phosphorelais EnvZ/OmpR n'est pas impliqué dans la virulence chez *D. dadantii*. La restauration partielle observée dans les tubercules de pomme de terre peut être corrélée avec la restauration de la production de pectinases comme cela a déjà été démontré au laboratoire (Bontemps-Gallo *et al.*, 2014).

1.4. L'activation du système CpxAR ne dépend pas des OPG contrairement au phosphorelais EnvZ/OmpR.

Afin de voir si l'activation du système EnvZ/OmpR dépend de la présence des OPG comme cela a été montré pour RcsCDB, nous avons choisi d'observer deux gènes appartenant à son régulon. Notre choix s'est porté sur les gènes *ompF* et *kdgN* codant tous deux des porines. La porine OmpF permet le transport de molécules hydrophiles de moins de 600 Da (Decad et Nikaido, 1976) tandis que KdgN intervient dans le transport

d'oligogalacturonates à travers la membrane externe suite à la dégradation de la pectine (Condemine et Ghazi, 2007). L'expression de ces gènes est analysée par qRT-PCR après culture des différentes souches à diverses osmolarités : 170, 330, 500 et 700 mOsm.

L'analyse des résultats montre que l'expression des gènes *ompF* et *kdgM* est minimale en absence d'un des deux membres du système confirmant bien le rôle activateur du régulateur OmpR dans l'expression des porines. Dans la souche sauvage, on observe des données semblables pour les deux gènes avec une courbe en cloche en fonction de l'osmolarité. Cette courbe est semblable à celle déjà observé chez *E. coli* (Lan et Igo, 1998). A 170 mOsm, le niveau d'expression approche celui qui est observé dans une souche dépourvue du capteur ou du régulateur. L'expression est multipliée 16 fois pour *ompF* et 22 fois pour *kdgM* quand on passe de 170 mOsm à 330 mOsm pour ensuite diminuer de moitié lorsque l'osmolarité passe de 330 mOsm à 500 mOsm puis de nouveau de moitié quand l'osmolarité atteint 700 mOsm (Figure 23). Les gènes *ompF* et *kdgN* semblent donc bien régulés par EnvZ/OmpR en fonction de l'osmolarité. De plus, on peut observer dans un mutant *opgG* une perte de régulation de ces deux gènes avec une expression semblable quelle que soit l'osmolarité (Figure 23). Cette expression est similaire à celle observée à 700 mOsm dans une souche sauvage ce qui semble indiquer que les OPG sont requis pour l'activation du système EnvZ/OmpR.

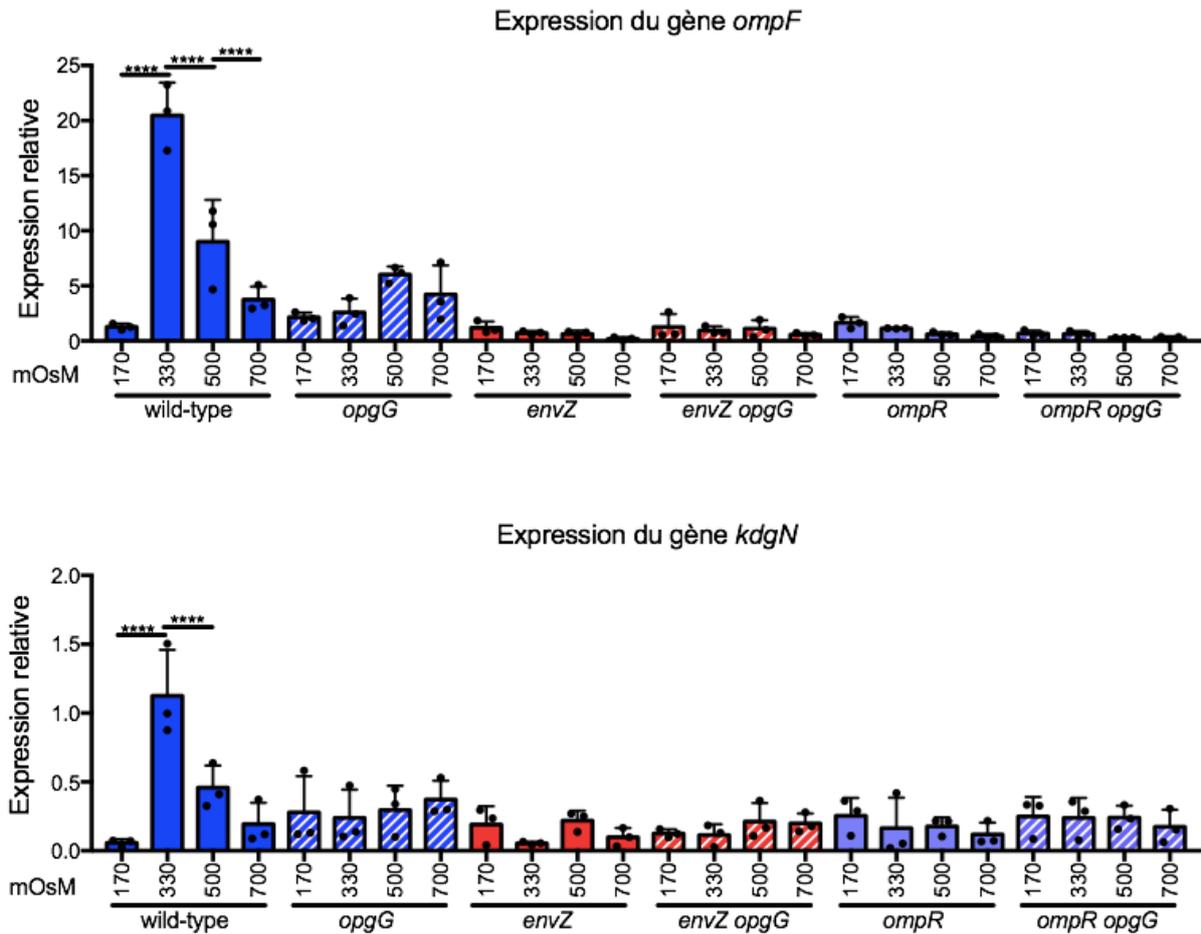


Figure 23 : Expression des gènes *ompF* et *kdgN* à différentes osmolarités.

Les bactéries sauvage, *opgG*, *envZ*, *envZ opgG*, *ompR* et *ompR opgG* sont cultivées à 170, 330, 500 et 700 mOsM. L'expression des gènes *ompF* et *kdgN* est analysée par qRT-PCR. L'expression relative des gènes est calculée en utilisant le gène *ipxC* comme gène de référence (Hommais *et al.*, 2011). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage ($p^{****} < 0,0001$).

Afin de voir si le dysfonctionnement des phosphorelais causé par la perte d'OPG est une généralité ou un cas particulier, la même expérience est réalisée sur le phosphorelais CpxAR. Les gènes choisis pour l'expérience sont *spy* et *degP* codant respectivement une protéine chaperon et une protéase périplasmique (Vogt et Raivio, 2012). Tout d'abord, nous pouvons observer une surexpression de ces deux gènes dans le mutant *cpxA*, causée par la phosphorylation constitutive de CpxR (Figure 24). Dans une souche dépourvue du régulateur CpxR, *spy* est régulé à la baisse tandis que *degP* présente un niveau semblable à la souche sauvage. Si on se concentre sur la souche sauvage, on peut observer une expression semblable des gènes *spy* et *degP* quelle que soit l'osmolarité (Figure 24). On peut également remarquer que cette expression est semblable à celle observée dans une souche *opgG* (Figure 24). Nous pouvons donc conclure que l'activation du phosphorelais CpxAR se fait indépendamment de la présence des OPG.

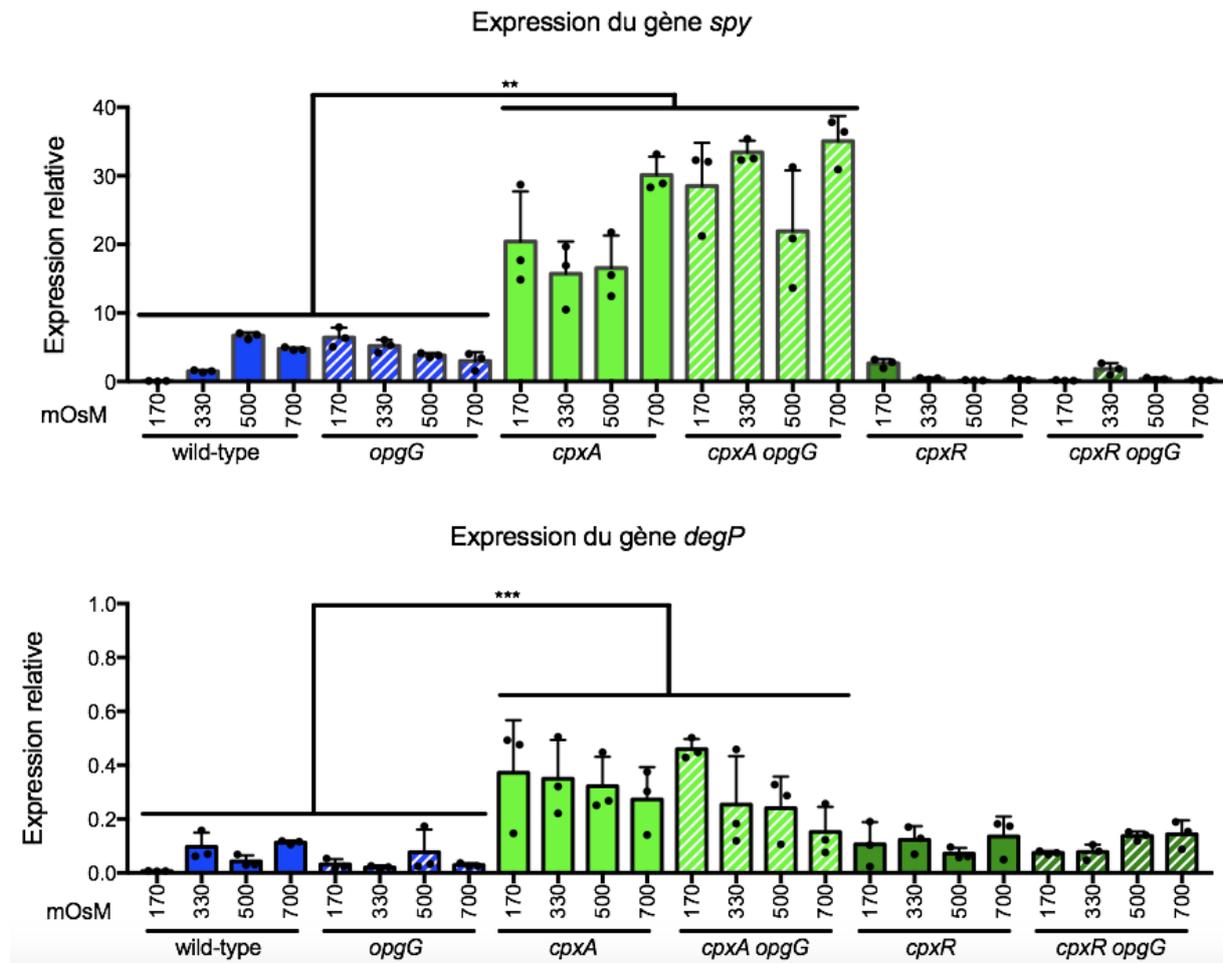


Figure 24 : Expression des gènes *spy* et *degP* à différentes osmolarités.

Les bactéries sauvage, *opgG*, *cpxA*, *cpxA opgG*, *cpxR* et *cpxR opgG* sont cultivées à 170, 330, 500 et 700 mOsm. L'expression des gènes *spy* et *degP* est analysée par qRT-PCR. L'expression relative des gènes est calculée en utilisant le gène *ipxC* comme gène de référence (Hommais *et al.*, 2011). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

L'ensemble de ces données nous permet donc d'affirmer que les OPG possèdent une relation spécifique avec un nombre limité de phosphorelais (RcsCDB, EnvZ/OmpR).

1.5. Le niveau d'activation d'EnvZ/OmpR ne dépend pas de la concentration en OPG.

Les OPG étant nécessaires au phosphorelais EnvZ/OmpR pour son activation, nous nous sommes demandé si son activité varie en fonction de leur concentration comme cela est le cas pour le système RcsCDB (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013). Afin de répondre à cette question, une souche comportant l'opéron *opgGH* sous le contrôle du promoteur de l'opéron

araABD est utilisée. En effet, chez *E. coli*, il est montré que ce dernier est finement régulé par la concentration en L-arabinose présent dans le milieu (Guzman *et al.*, 1995). Les mutants *envZ* P_{BAD} -*opgGH* et *ompR* P_{BAD} -*opgGH* sont construits et toutes ces souches ainsi que les souches sauvage et *opgG* sont mises en culture dans du milieu M63 complété avec des concentrations croissantes d'arabinose (0 à 1 g/L). Les ARN sont alors extraits pour observer l'expression des gènes *ompF* et *kdgN*.

Dans un premier temps, l'efficacité de la construction est vérifiée en suivant l'expression des gènes *opgG* et *opgH*. Comme attendu, l'expression des deux gènes est constante dans une souche sauvage et nulle dans une souche *opgG*. On observe également une expression croissante des gènes *opgG* et *opgH* dépendante de la concentration d'arabinose (Figure 25). En effet, plus la concentration en arabinose dans le milieu augmente, plus le gène est induit jusqu'à l'obtention d'un niveau similaire à la souche sauvage à 1 g/L d'arabinose (Figure 25).

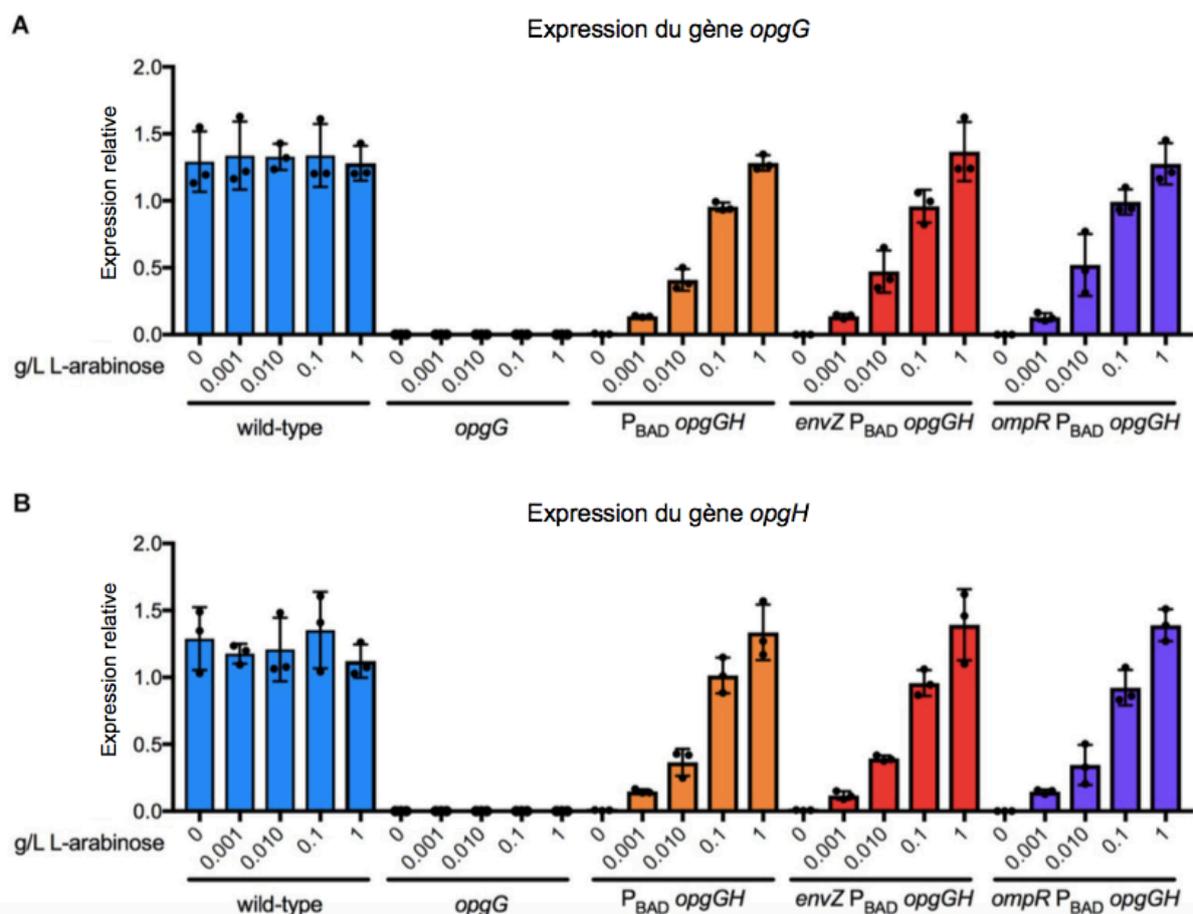


Figure 25 : Expression des gènes *opgG* et *opgH* à différentes concentrations de L-arabinose.

Les bactéries sauvage, *opgG*, P_{BAD} -*opgGH*, *envZ* P_{BAD} -*opgGH* et *ompR* P_{BAD} -*opgGH* sont cultivées en M63 (330 mOsm) complété avec des concentrations de L-arabinose croissantes (0 à 1 g/L). L'expression des gènes *opgG* (A) et *opgH* (B) est analysée par qRT-PCR. L'expression relative des

gènes est mesurée en utilisant le gène *ipxC* comme gène de référence (Hommais *et al.*, 2011). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Une fois le système vérifié, l'expression des gènes *ompF* et *kdgN*, tous deux rapporteurs du système EnvZ/OmpR, est analysée dans ces mêmes conditions. Sans ajout d'arabinose dans le milieu de culture, on observe une expression semblable à celle d'une souche dépourvue en OPG. Dans la souche $P_{BAD}\text{-}opgGH$, le niveau d'expression génique est constant quelle que soit la concentration (de 0,1 à 1 g/L) (Figure 26). Lorsque le phosphorelais EnvZ/OmpR est inactivé dans une souche $P_{BAD}\text{-}opgGH$, l'expression des gènes *ompF* et *kdgN* est minimale et une nouvelle fois indépendante de la concentration en arabinose (Figure 26).

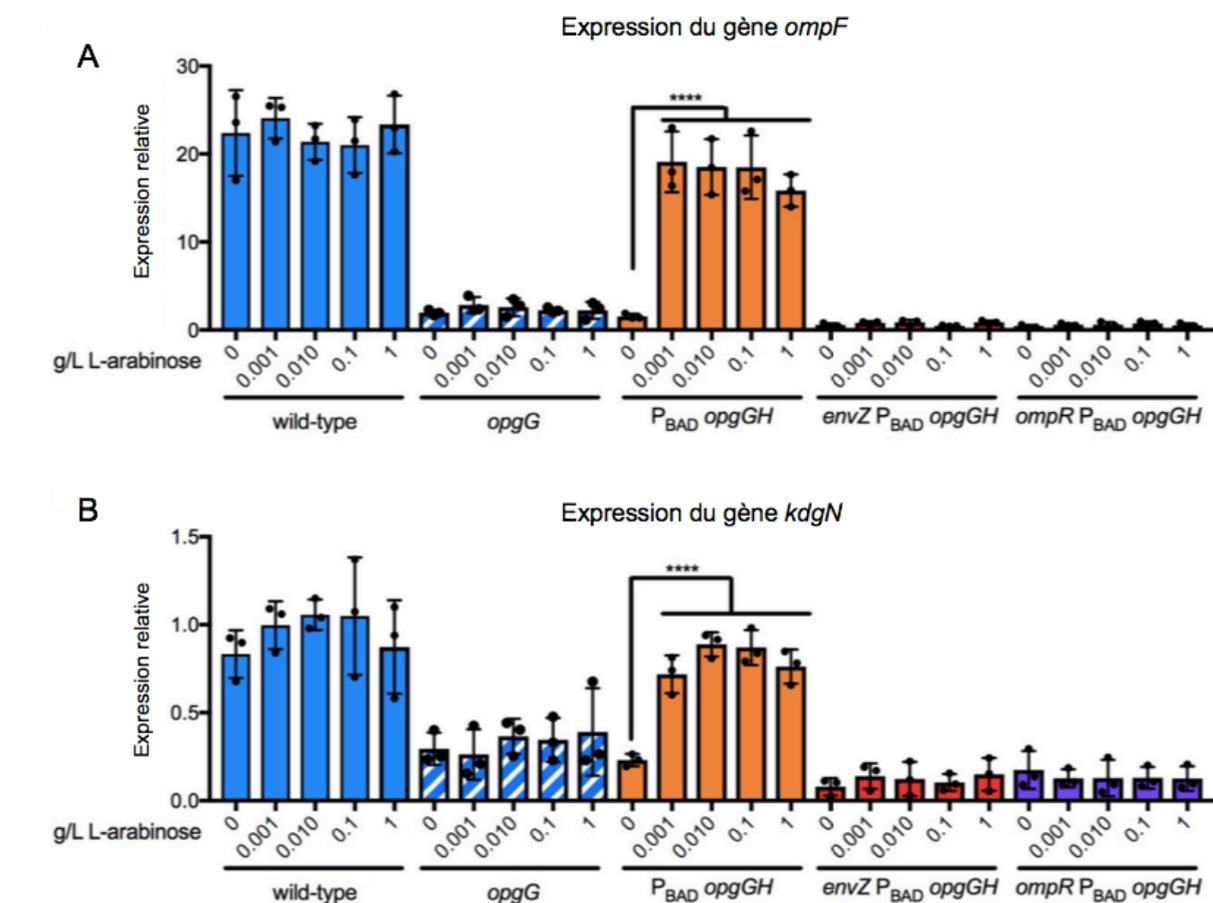


Figure 26 : Expression des gènes *ompF* et *kdgN* à différentes concentrations de L-arabinose.

Les bactéries sauvage, *opgG*, $P_{BAD}\text{-}opgGH$, $envZ\ P_{BAD}\text{-}opgGH$ et $ompR\ P_{BAD}\text{-}opgGH$ sont cultivées en M63 (330 mOsm) complémenté avec des concentrations de L-arabinose croissantes (0 à 1 g/L). L'expression des gènes *ompF* (A) et *opgH* (B) est analysée par qRT-PCR. L'expression relative des gènes est mesurée en utilisant le gène *ipxC* comme gène de référence (Hommais *et al.*, 2011). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche $P_{BAD}\text{-}opgGH$ cultivée sans arabinose (**** $p < 0,0001$).

Ces résultats semblent donc indiquer que les OPG sont uniquement nécessaires à l'activation du système sans avoir un quelconque impact sur son niveau d'activation. On peut donc penser que les OPG jouent un rôle dans la transmission du signal.

1.6. Discussion

Il y a quelques années, le laboratoire avait mis en avant une relation forte entre le système RcsCDB et les OPG en montrant que ces glucanes étaient essentiels à l'activation et à la modulation du phosphorelais (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013). Le phosphorelais EnvZ/OmpR présentant des stimuli et des régulateurs communs avec RcsCDB, nous nous étions demandé si ce système pouvait également être associé aux OPG. C'est ce qui nous a amené à réaliser une étude sur le phosphorelais EnvZ/OmpR.

Dans ces travaux, nous avons d'abord pu montrer que l'inactivation du système EnvZ/OmpR n'a pas d'effet sur la virulence de *D. dadantii* que ce soit en pomme de terre ou en endive (Figures 21, 22). La production d'exoenzymes et d'exopolysaccharides d'un mutant *envZ* ou *ompR* est semblable à celle d'une souche sauvage EC3937 alors qu'une baisse de motilité causée par une baisse de l'expression de l'opéron maître *flhDC* est visible quand le phosphorelais est inactivé (Figures 18, 19 ; Tableau 1). On a également pu observer des différences lorsque la mutation est réalisée dans une souche dépourvue d'OPG. En effet, quand le système est inactivé dans une souche *opgG*, une restauration de la sécrétion des pectinases et de la virulence en pomme de terre est visible (Figures 18, 22). Cette restauration de macération est partielle et n'est pas visible dans le second modèle qu'est l'endive. On peut toutefois remarquer que la restauration partielle en pomme de terre coïncide avec la restauration des pectinases, événement que le laboratoire avait déjà pu mettre en avant lors d'études antérieures (Bontemps-Gallo *et al.*, 2014). On peut imaginer que l'activation des mécanismes de défenses face à la bactérie pathogène est l'une des différences entre la feuille d'endive et les tubercules de pomme de terre. On peut également penser que la différence de composition entre le tubercule de pomme de terre et la feuille d'endive joue un rôle dans la restauration de la virulence.

Cette étude nous a également permis de mettre en avant la relation spécifique entre le phosphorelais EnvZ/OmpR et les OPG, facteurs de virulence essentiels de *D. dadantii*. Le laboratoire avait déjà mis en avant la relation de ces derniers avec le phosphorelais RcsCDB. De la même façon, nous montrons ici qu'EnvZ/OmpR requiert la présence des OPG pour son activation (Figure 23). En revanche, contrairement à RcsCDB, leur concentration ne module pas le niveau d'activation du système (Figure 26). En 2017, Asmar et ses collaborateurs mettent en évidence une activation du système RcsCDB dépendante de la taille du périplasma d'*E. coli*, montrant alors qu'un espace périplasmique plus restreint permet le rapprochement

du modulateur RcsF du capteur RcsC et ainsi l'activation du phosphorelais. Les OPG étant des composants majeurs du périplasme, nous nous sommes demandé si leur absence pouvait modifier la taille périplasmique et ainsi inactiver le phosphorelais EnvZ/OmpR. Toutefois, en se basant sur des analyses de microscopie électronique effectuées précédemment par le laboratoire sur les souches sauvage et *opgG*, cette hypothèse est réfutée. En effet, aucune différence de taille du périplasme n'est visible en absence d'OPG (Bontemps-Gallo, 2013). L'activation du phosphorelais se fait donc indépendamment de la taille du périplasme.

Cette étude a amené de nouveaux questionnements notamment sur la régulation du gène *ompF*. En effet, chez *E. coli*, l'expression du gène *ompF* varie en fonction de la quantité de régulateur phosphorylé qui lui-même varie selon l'osmolarité du milieu dans lequel se situent les bactéries. A basse osmolarité, OmpR, peu phosphorylé, active le gène *ompF* alors qu'à haute osmolarité OmpR fortement phosphorylé réprime ce gène. Chez *E. coli*, dans une souche dépourvue du capteur EnvZ, OmpR est peu phosphorylé ce qui active la transcription du gène *ompF* et donc un profil protéique de type OmpF^C OmpC⁻. Chez *D. dadantii*, ce n'est pas le cas. En effet, on peut remarquer une faible expression du gène *ompF* dans une souche *envZ*. Il semble donc qu'*ompF* soit régulé différemment de ce qui est établi chez *E. coli*.

Cette étude nous a également amenés à nous questionner sur le rôle d'EnvZ/OmpR dans le phénomène de virulence. Cela semble très étonnant que la délétion d'EnvZ/OmpR n'affecte pas le phénomène de virulence que cela soit au niveau de l'apparition de la pourriture molle ou au niveau de la chronologie de la maladie. En effet, EnvZ/OmpR est le phosphorelais essentiel dans la perception de l'osmolarité qui est l'un des paramètres les plus variables durant l'infection. Pour rappel, durant l'étape d'infection, la bactérie se retrouve confrontée à un changement important de l'osmolarité provoqué notamment par la lyse des cellules végétales et le déversement de leur contenu cellulaire. On pourrait donc penser que l'inactivation du système provoque des modifications importantes dans l'adaptation de la bactérie à son hôte influençant de ce fait la virulence.

2. L'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est modulée en fonction du pH, affectant de ce fait l'expression des porines OmpF.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées par le Dr Michael Marceau (UMR8204). La spectrométrie de masse a été effectuée par Valérian Hausard de l'équipe du Pr Jérôme Lemoine (UMR5280, Lyon 1).

Comme déjà énoncé précédemment, chez *E. coli*, le régulateur OmpR se comporte à la fois comme un activateur et un répresseur de l'expression du gène *ompF*, l'activant à basse osmolarité et le réprimant à haute osmolarité alors qu'il ne fait qu'activer l'expression du gène *ompC* (Huang et Igo, 1996). Cette régulation dépend de l'état de phosphorylation du régulateur OmpR. Suite aux études effectuées, nous avons pu remarquer que le gène *ompF* ne semble pas être régulé de la même manière chez notre bactérie modèle *D. dadantii*. En effet, le régulateur OmpR semble agir uniquement en tant qu'activateur. Nous posons donc l'hypothèse suivante : OmpR fortement phosphorylé à basse osmolarité active la transcription du gène *ompF* chez *D. dadantii*. J'ai donc entrepris l'étude de la régulation du gène *ompF* par le système EnvZ/OmpR chez *D. dadantii*.

2.1. Le gène *ompF* de *D. dadantii* présente des boîtes de fixation similaires à celles observées pour le gène *ompC* d'*E. coli*.

La régulation différente des gènes *ompF* et *ompC* chez *E. coli* est causée par la présence de boîtes de fixation d'OmpR distinctes de basse et haute affinité en amont de ces gènes. Pour rappel, chez *E. coli*, le gène *ompF* possède quatre boîtes de fixation : deux à haute affinité (F1 et F2) pour le régulateur OmpR et deux à faible affinité (F3 et F4) dont une est située beaucoup plus en amont du gène que les trois autres (-364 à -351) (Harlocker *et al.*, 1995 ; Huang et Igo, 1996). Afin de comprendre la régulation du gène *ompF* chez *D. dadantii*, j'ai entrepris une comparaison des séquences régulatrices en amont de ces différents gènes. Pour commencer, aucune séquence ressemblante aux boîtes de fixation d'OmpR chez *E. coli* n'est visible dans la région régulatrice de *D. dadantii*. Le site IHF favorisant la courbure de l'ADN et la répression d'*ompF* chez *E. coli* n'est pas non plus retrouvé (Figure 27).

Chez *E. coli*, le gène *ompC* possède pour sa part trois boîtes de fixation d'OmpR situées en amont du gène *ompC* : une de forte affinité (C1) et deux de faible affinité (C2 et C3) (Huang et Igo, 1996). En comparant avec *D. dadantii*, deux sites semblables sont identifiés

dans la région régulatrice du gène *ompF* : le site C1 qui présente 83,4% d'identité avec le site d'*E. coli* et le site C3, qui lui montre 73,4% d'identité (Figure 27). Additionné à cela, on peut remarquer que la distance séparant les sites C1 et C3 est équivalente chez *D. dadantii* et *E. coli* avec 30 et 31 nucléotides respectivement (Figure 27). En revanche, aucun site semblable au site C2 du gène *ompC* n'a été localisé entre les sites C1 et C3 de *D. dadantii*.

E. coli, région 500 pB en amont du gène *ompF*

CGATCATCCTGTTACGGAAATATTACATTGCAACATTTACGCGCAAAAACTAATCCGCATTCTTATTGCGGATTAG
 TTTTTTCTTAGCTAATAGCACAAATTTTCATACTATTTTTTGGCATTCTGGATGTCTGAAAGAAGATTTTGTGCCA
 GGTCGATAAAAGTTCCATCAGAAACAAAATTTCCGTTTAGTTAATTTAAATATAAGGAAATCATATAAATAGATT
 AAAATTGCTGTAAATATCATCACGTCTCTATGGAATATGACGGTGTTCACAAAGTTCCTTAAATTTTACTTTTG
GTTACATATTTTCTTTTTGAAACCAAATCTTTATCTTTGTAGCACTTTACGGTAGCGAAACGTTAGTTTGA
 F1 F2 F3
 ATGGAAAGATGCCTGCAGACACATAAAGACACCAAACCTCTCATCAATAGTTCCGTAAATTTTATTGACAGAACT
 TATTGACGGCAGTGGCAGGTGTCATAAAAAAACCATGAGGGTAATAAATAATG

E. coli, région 500 pB en amont du gène *ompC*

TTGTGAAATAGTTAACAAGCGTTATAGTTTTTCTGTGGTAGCACAGAATAATGAAAAGTGTGTAAAGAAGGGTAA
 AAAAAACCGAATGCGAGGCATCCGGTTGAAATAGGGGTAAACAGACATTCAGAAATGAATGACGGTAATAAATAA
 AGTTAATGATGATAGCGGGAGTTATCTAGTTGCGAGTGAAGTTTTGTTTTGACATTGAGTCTGTCAAATACT
 TAAGAATAAGTTATTGATTTTAACTTGAATTATTATTGCTTGATGTTAGGTGCTTATTTCCGCATTCCGCAATA
 ATCTTAAAAAGTTCCTTGCATTTACATTTTGAAACATCTATAGCGATAAAATGAAACATCTTAAAAAGTTTTAGT
 ATCATATTCGTGTTGGATTATTCTGCATTTTGGGGAGAAATGGACTTGCCGACTGATTAATGAGGGTTAATCAGA
 TGCAGTGGCATAAAAAAGCAAATAAAGGCATATAACAGAGGGTTAATAACATG

D. dadantii, région 500 pB en amont du gène *ompF*

GTCTGGAACAGTTGGATATCCGCCTGGAAGAAATGGGACTCAGTAAGGAAGATTACTGGTGGTACCGTGATCTGC
 GTCGTTATGGCACCATTCCCTCACTCTGGTTTCGGTCTTGGTTTTGAACGTTTGATTGCTTATGTAACCGGTGTAC
 AAAATGTGCGGATGTCATTCCGTTCCCGCGCACACCGCGCAGCGCCACCTTCTAAGCGAAAAATAACATAAGAA
 AAACAGATATATGTAATAAGAAGGGCACCTTATGGGTGCCCTTCTTTTTTATTTTAGAGTTTGCTCACAAAGTT
 CCGTAAATTTACAATTTGAAACACATATTTTCCAATGGTTACTCGAATTAGAAATTAGTATCATTTAAAGAGT
 AGATTAACGGGCGGGTGAATGGAAACTGCGTTCAGACACAGGAAGACAACCTGGATTACATTAAAGTTCCGTCA
 GAATCTTTTACTGTGATCCAGCTGTCTTAATAACACCAATGAGGGTAATAATG

Figure 27 : Comparaison et localisation des boîtes de fixation d'OmpR dans les régions régulatrices d'*ompF* et *ompC* d'*E. coli* et d'*ompF* de *D. dadantii*.

Les boîtes connues et avérées chez *E. coli* sont surlignées en gris et annotées. Les boîtes suspectées chez *D. dadantii* sont surlignées en jaune. Les bases soulignées sont identiques entre *E. coli* et *D. dadantii*.

Afin de confirmer ces observations, des retards sur gel de la protéine OmpR sur les régions régulatrices d'*ompF* et *ompC* d'*E. coli* ainsi que sur la région régulatrice d'*ompF* de *D. dadantii* sont effectués. Les régulateurs OmpR des deux espèces, présentant une homologie de 100%, sont purifiés grâce à l'ajout d'une queue poly-histidine en Nter. Ces protéines sont utilisées pour cette expérience et la région codante du gène *opgC* est choisie en tant que témoin négatif (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016). Des expériences de retards sur gel avec les deux protéines à différentes concentrations ont permis de déterminer qu'une concentration de 400 ng de protéines est nécessaire pour observer un retard. Cette concentration est donc utilisée par la suite (Données non présentées).

400 ng de protéines OmpR de *D. dadantii* sont mis en contact avec les différentes régions régulatrices des deux espèces. La protéine OmpR entraîne un retard de migration quelle que soit la région régulatrice alors qu'aucune bande retardée n'est visible au niveau du témoin négatif *opgC*. Le retard observé est le même quelle que soit la région régulatrice testée (Figure 28). La même expérience est effectuée avec la protéine OmpR d'*E. coli*. Une nouvelle fois, des bandes retardées sont observables pour toutes les régions régulatrices que ce soit celles d'*E. coli* ou celle de *D. dadantii*. Toutefois, on remarque cette fois-ci une différence selon les régions. En effet, on observe pour la région régulatrice d'*ompF* d'*E. coli* deux bandes retardées alors que les régions régulatrices d'*ompC* d'*E. coli* et d'*ompF* de *D. dadantii* n'en présentent qu'une seule (Figure 28).

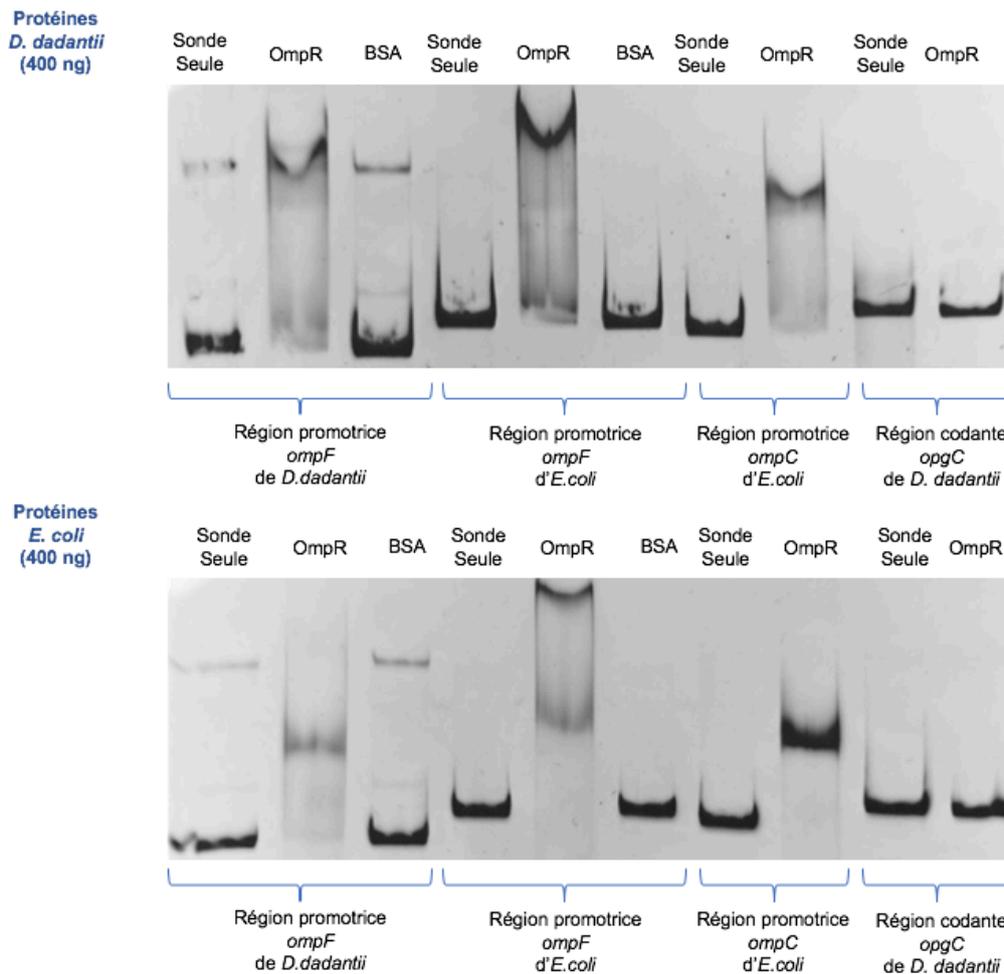


Figure 28 : Retard sur gel des protéines OmpR d'*E. coli* et de *D. dadantii* sur les différentes régions promotrices *ompF* et *ompC* des deux espèces.

400 ng de protéines OmpR de *D. dadantii*, d'*E. coli* ou de BSA sont incubés avec 100 ng d'ADN durant 30 min. La suspension est déposée sur gel acrylamide 6%. La région codante *opgC* de *D. dadantii* est utilisée en tant que témoin négatif (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016).

La présence de deux bandes retardées pour la région régulatrice d'*ompF* d'*E. coli* est probablement due à la fixation d'OmpR sur un nombre de sites plus important que pour les deux autres régions régulatrices. Le fait que les régions d'*ompC* d'*E. coli* et d'*ompF* de *D. dadantii* présentent le même retard semble indiquer une fixation de la protéine OmpR similaire dans les deux cas.

2.2. Phosphorylé, le régulateur OmpR se fixe plus efficacement à la région régulatrice d'*ompF*.

Les comparaisons de séquences couplées aux données obtenues lors des différents retards sur gel semblent nous indiquer une régulation du gène *ompF* plus proche de celle d'*ompC* que d'*ompF* d'*E. coli*. La différence de régulation de ces deux gènes chez *E. coli* est

corrélée à l'état de phosphorylation du régulateur OmpR. Nous nous sommes donc demandé si la fixation d'OmpR sur la séquence régulatrice du gène *ompF* varie en fonction de l'osmolarité. Afin de répondre à cette question, nous avons choisi de réaliser des retards sur gel comprenant la région régulatrice *ompF* de *D. dadantii* et la protéine OmpR phosphorylée (OmpR-P) ou non (OmpR). La protéine OmpR est phosphorylée *in vitro* grâce au donneur de phosphate : le phosphoramidate. L'efficacité de cette phosphorylation a été testée auparavant grâce à la technique du PhosTag *in vitro*. Les données obtenues nous montrent une très bonne capacité de phosphorylation par la phosphoramidate avec un pourcentage de protéines phosphorylées aux alentours de 37 % (Données non présentées).

Une fois le traitement au phosphoramidate effectué, les protéines OmpR, OmpR-P ainsi que le témoin BSA sont mis au contact de la région régulatrice d'*ompF* (*promompF*) et de la région codante d'*opgC* (*opgCmil*). Cette expérience est réalisée avec des quantités de protéines allant de 100 ng à 400 ng, cette dernière étant considéré comme quantité idéale (Figure 29). L'analyse des gels permet d'observer une absence de retard dans le puits contenant le témoin BSA ainsi que sur la région codante *opgC*. Une très nette différence est visible dans les puits comportant OmpR phosphorylée et non phosphorylée. En effet, le gel montre un retard beaucoup plus important lorsque la protéine est phosphorylée et cela dès 100 ng d'OmpR-P (Figure 29).

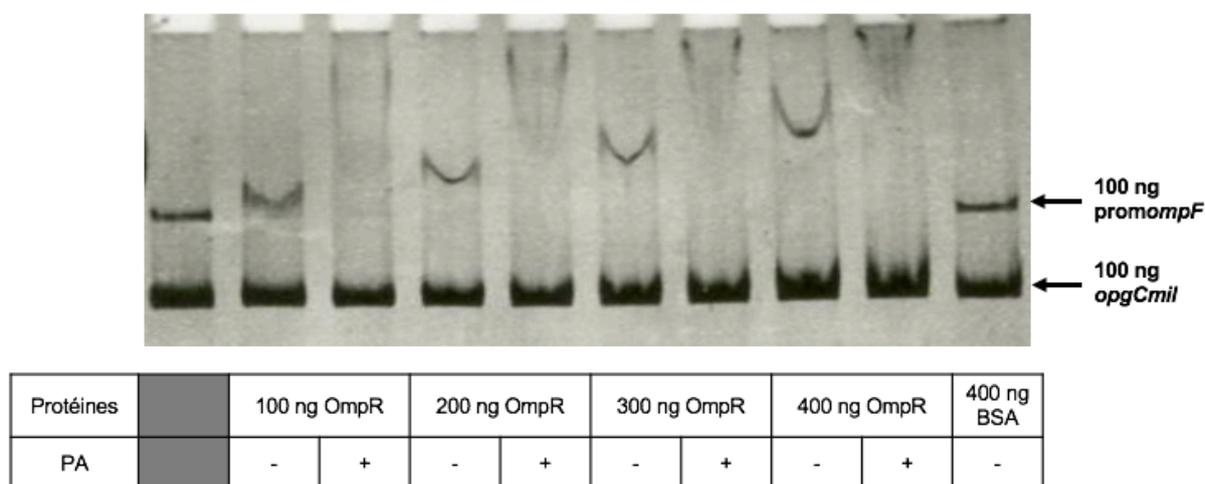


Figure 29 : Retard sur gel des protéines OmpR et OmpR-P sur la région promotrice d'*ompF*. 100 à 400 ng de protéines OmpR (-), OmpR phosphorylée (+) par le phosphoramidate (PA) ou de BSA sont incubés avec 100 ng d'ADN durant 30 min. La suspension est déposée sur gel acrylamide 6%. La région codante *opgC* de *D. dadantii* est utilisée en tant que témoin négatif (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016).

Ces résultats semblent donc indiquer que le régulateur OmpR sous sa forme phosphorylée se fixe plus efficacement au niveau des sites de fixation du gène *ompF*. En

couplant ces résultats aux données de qRT-PCR, nous pouvons donc penser que OmpR-P active la transcription du gène *ompF* et que cette phosphorylation a bien lieu à basse osmolarité.

2.3. OmpR est nécessaire pour la transcription du gène *ompF* mais n'intervient pas dans sa modulation lors d'une variation d'osmolarité.

Une fois les sites de fixation déterminés, l'analyse du niveau de phosphorylation du régulateur OmpR à basse et haute osmolarité est réalisée *in vivo*. Jusqu'à encore récemment, l'étude du niveau d'activation d'un phosphorelais se faisait de façon indirecte par l'analyse des gènes de son régulon et non par l'analyse *in vivo* du ratio régulateur phosphorylé *versus* régulateur non phosphorylé. En effet, cette dernière se révèle être très compliquée à cause de l'extrême labilité de la liaison phosphoester. En 2008, Barbieri et Stock développent la technique du PhosTag afin d'observer directement la phosphorylation des régulateurs bactériens. Cette technique repose sur un gel polyacrylamide sur lequel une partie des molécules d'acrylamide sont greffées à des molécules de PhosTag™. Lors de la migration, les protéines phosphorylées sont retenues par les molécules de PhosTag™ entraînant un retard de migration par rapport à la même protéine non phosphorylée.

Afin de réaliser le PhosTag *in vivo*, la souche sauvage est cultivée en milieu M63 complété avec du glycérol 0,2% aux différentes osmolarités choisies précédemment pour la qRT-PCR (170, 330, 500 et 700 mOsm). Les souches *ompR* et *envZ* sont toutes deux choisies en tant que témoins. Les suspensions en phase exponentielle sont lysées par sonication et 100 µg de lysats cellulaires sont déposés par puits. Pour la détection, un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR est utilisé. Tout d'abord, le profil de migration du mutant *envZ* présente une unique bande correspondant à la protéine OmpR non phosphorylée tandis qu'aucune bande n'est observable chez le mutant *ompR*. Dans la souche sauvage, quelle que soit l'osmolarité, on observe la présence de la protéine OmpR phosphorylée. Toutefois, le Western blot montre un ratio OmpR-P / OmpR similaire quelle que soit l'osmolarité du milieu (Figure 30). Plus précisément, le taux de phosphorylation passe de 10,9% à 170 mOsm à 7,4% à 700 mOsm. Cette légère différence n'est pas considérée comme significative d'après le test statistique ANOVA utilisé. Ce résultat est inattendu, le phosphorelais s'activant à haute osmolarité chez *E. coli*.

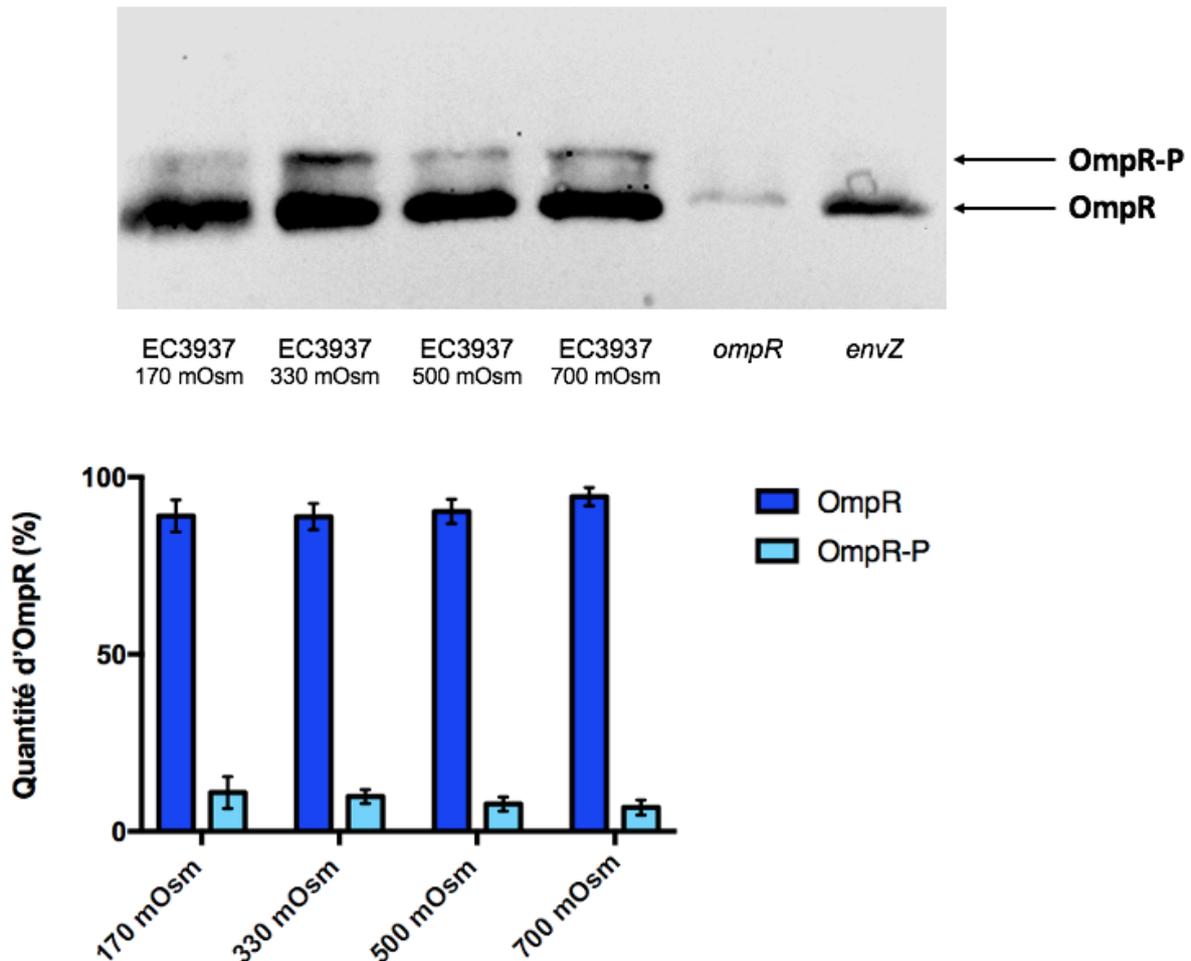


Figure 30 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag *in vivo* de la souche sauvage à différentes osmolarités.

100 µg des lysats cellulaires des souches *ompR*, *envZ* et EC3937 cultivées à différentes osmolarités (170, 330, 500 et 700 mOsm) sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Le Western blot est effectué grâce à un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR. Les proportions d'OmpR et OmpR-P sont déterminées à l'aide du logiciel Fusion. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Ces données indiquent donc que le phosphorelais EnvZ/OmpR ne répond pas à la variation de l'osmolarité chez *D. dadantii*. La variation d'*ompF* en fonction de l'osmolarité ne semble donc pas être due à une modification de l'activité de ce phosphorelais. EnvZ/OmpR est donc essentiel à l'activation de la transcription du gène *ompF* mais n'intervient pas dans sa régulation face aux variations d'osmolarité.

2.4. Le régulateur RcsB est capable de se fixer en amont du gène *ompF*.

Le fait que le phosphorelais EnvZ/OmpR ne soit pas modulé en fonction de l'osmolarité est très étonnant car la qRT-PCR présentait bien une variation du gène *ompF* en fonction de l'osmolarité (Figure 23). Cependant, comme cette expérience est réalisée à partir d'ARN

totaux extraits de la souche sauvage EC3937 en phase exponentielle, cette variation peut être causée par un autre phosphorelais que le système EnvZ/OmpR. En effet, les données de qRT-PCR nous montrent juste que ce dernier est nécessaire à l'activation. On peut donc se demander si d'autres phosphorelais tels que CpxAR ou RcsCDB, connus tous deux comme répondant à l'osmolarité, possèdent la capacité de moduler l'expression d'*ompF*.

Dans un premier temps, je me suis intéressée au phosphorelais CpxAR. En effet, en 2005, Batchelor et ses collaborateurs mettent en avant chez *E. coli* l'implication du phosphorelais CpxAR dans la régulation des gènes *ompF* et *ompC*. Ils montrent notamment que CpxR phosphorylé (CpxR-P) active la transcription du gène *ompC* et réprime le gène *ompF* en se fixant sur la région régulatrice de ces gènes au niveau des sites de fixation d'OmpR.

Afin de voir si on retrouve une régulation similaire chez *D. dadantii*, j'ai réalisé des retards sur gel avec les protéines CpxR, CpxR phosphorylée au phosphoramidate et le témoin BSA sur la région régulatrice du gène *ompF* ainsi que sur la région codante du gène *opgC* qui nous sert de témoin négatif. Aucune fixation de la protéine, qu'elle soit phosphorylée ou non, n'est visible sur le gel retard (Figure 31A). Cela semble étonnant car le laboratoire a montré en 2015 que le gène *ompF* est quatre fois plus exprimé dans un mutant *cpxA* (CpxR fortement phosphorylé) que dans la souche sauvage (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015). Le phosphorelais CpxAR semble donc agir indirectement sur l'expression de la porine. Bien qu'indirecte, on peut se demander si cette régulation dépend de l'osmolarité environnante. Afin de vérifier cela, un gel PhosTag *in vivo* est réalisé avec un anticorps dirigé contre le régulateur CpxR. Les souches EC3937, *cpxR* et *cpxA* sont cultivées à basse et haute osmolarité (330 et 700 mOsm), lysées par sonication et 100 µg de lysats cellulaires sont déposés sur gel. Le Western Blot nous montre un taux de phosphorylation semblable que l'on soit à basse (5,6%) ou à haute osmolarité (6,4%) (Figure 32A).

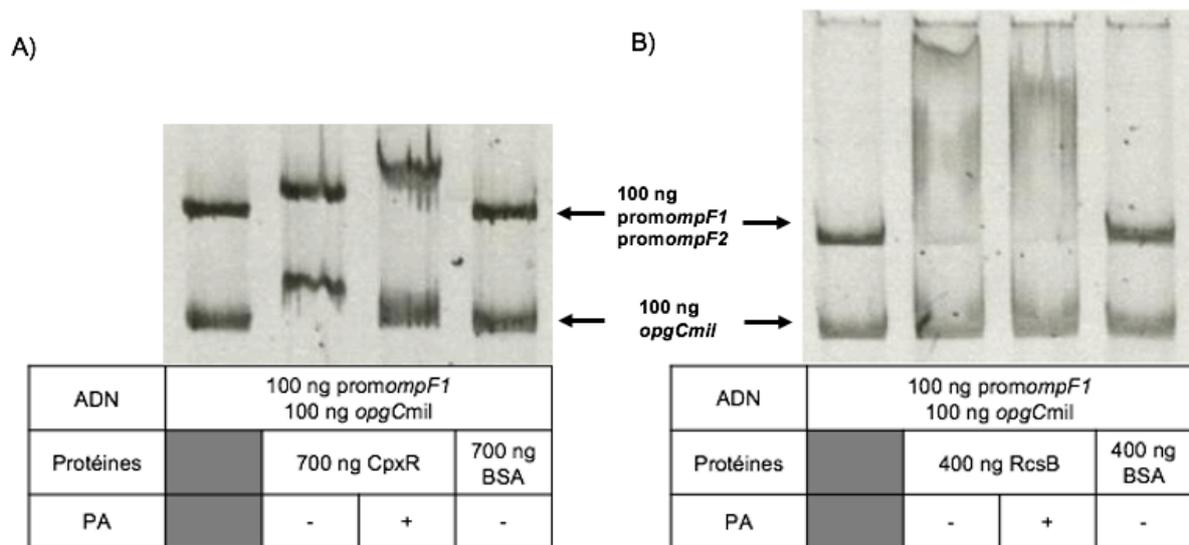


Figure 31 : Retard sur gel des protéines RcsB, RcsB-P, CpxR, CpxR-P sur la région promotrice d'*ompF*.

100 à 400 ng de protéines RcsB (-), RcsB-P (+), CpxR (-), CpxR-P(+) BSA sont incubées avec 100 ng d'ADN durant 30 min. La suspension est déposée sur gel acrylamide 6%. La région codante *opgC* de *D. dadantii* est utilisée en tant que témoin négatif (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016).

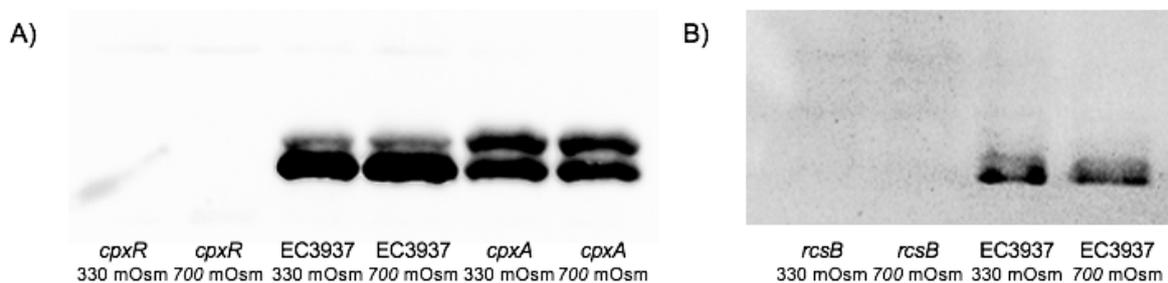


Figure 32 : PhosTag *in vivo* de la souche sauvage à 330 et 700 mOsm

100 µg des lysats cellulaires des souches *cpxR*, *cpxA*, *rcsB* et EC3937 cultivées à 330 et 700 mOsm sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Les Western blot sont effectués grâce à des anticorps dirigés contre les régulateurs CpxR (A) et RcsB (B). Les proportions de régulateurs phosphorylés ou non sont déterminées à l'aide du logiciel Fusion. Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

Dans un second temps, je me suis demandé si le phosphorelais RcsCDB pouvait jouer un rôle dans la régulation d'*ompF*. En effet, le système réagit à des stimuli semblables à EnvZ/OmpR et les deux phosphorelais partagent une partie de leur régulon. Tout d'abord, le retard sur gel de la région promotrice d'*ompF* avec les protéines RcsB et RcsB phosphorylée au phosphoramidate est réalisé. Alors qu'aucun retard n'était visible avec la protéine CpxR, on voit ici un retard important avec 400 ng de RcsB. Ce retard est semblable que la protéine

soit phosphorylée ou non (Figure 31B). Le régulateur semble donc se fixer en amont du gène *ompF* indépendamment de son état de phosphorylation. RcsCDB répondant à l'osmolarité chez *E. coli*, nous avons choisi d'observer son activité aux différentes osmolarités précédemment utilisées. Un PhosTag *in vivo* est effectué avec un anticorps dirigé contre le régulateur RcsB. Les souches sauvage et *rcsB* sont cultivées à 330 et 700 mOsm, lysées par sonication et 100 ng de lysat sont déposées sur gel. Une faible hausse du taux de phosphorylation est observée lorsque l'osmolarité augmente. En effet, le taux passe de 5,2% à 330 mOsm à 9,5% à 700 mOsm (Figure 32B, Données non présentées). Toutefois, cette faible variation n'est pas jugée comme significativement différente par le test statistique ANOVA utilisé.

Prises ensemble, ces données semblent donc indiquer que le phosphorelais RcsCDB régule le gène *ompF*. En effet, le régulateur est capable de se fixer au niveau de la zone régulatrice d'*ompF*. De même, en recoupant avec les études effectuées en 2015 au laboratoire, on montre que le régulateur CpxR est capable de moduler l'expression d'*ompF*. Toutefois, cette régulation semble être indirecte. On a également pu observer que le taux de phosphorylation du régulateur RcsB varie très peu entre 330 et 700 mOsm comme pour le phosphorelais EnvZ/OmpR. Le taux de phosphorylation de CpxR, lui, ne varie pas en fonction de l'osmolarité. On peut donc penser que cette modulation du gène *ompF* observée lors de la qRT-PCR n'est pas provoquée par ces deux phosphorelais seuls. Des analyses complémentaires telles que de la qRT-PCR dans les souches *rcsB* et *rscC* seront nécessaires afin de valider ces hypothèses.

2.5. La transcription du gène *ompF* varie selon l'osmolarité mais pas la quantité de porines OmpF.

Précédemment, nous avons donc montré que la transcription du gène *ompF* varie selon l'osmolarité mais que cette variation n'est pas due au phosphorelais EnvZ/OmpR, bien que celui-ci soit essentiel pour l'activation, ni aux phosphorelais CpxAR et RcsCDB. La porine ayant un rôle important dans l'adaptation à l'environnement bactérien, il était intéressant de voir si la production de la porine OmpF était en adéquation avec son expression génique et, de ce fait, si la quantité d'OmpF varie en fonction de l'osmolarité.

Pour cela, les protéines membranaires sont extraites de cultures bactériennes en phase stationnaire. La souche EC3937 est choisie et incubée à différentes osmolarités (170, 330, 500 et 700 mOsm). Le mutant *ompR* est également utilisé comme témoin car dont on sait que l'expression génique d'*ompF* dans cette souche est minimale (Figure 23). 150 µg de protéines sont déposés sur un gel acrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie. Alors que

l'on observe une courbe en cloche pour la régulation génique avec un pic d'expression à 330 mOsm et une expression faible à 170 et 700 mOsm (Figure 23), le gel montre au contraire une expression protéique d'OmpF similaire quelle que soit l'osmolarité (Figure 33). En revanche, le mutant *ompR* exprime très faiblement OmpF (1/20^{ème} de la quantité de la souche sauvage). La présence d'une nouvelle protéine, migrant un peu plus haut qu'OmpF, est visible sur le gel de porine. Cette protéine est absente dans la souche sauvage qui présente une pleine expression de la porine OmpF (Figure 33).

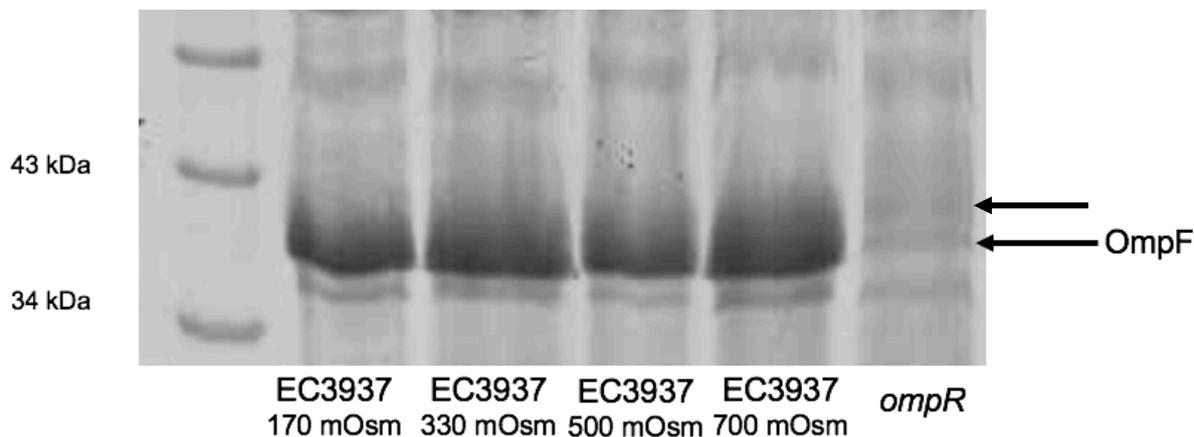


Figure 33 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 à différentes osmolarités.

150 µg de protéines membranaires des souches *ompR* et EC3937 cultivées à différents osmolarités (170, 330, 500 et 700 mOsm) sont déposés sur gel polyacrylamide 12%. Les profils protéiques sont révélés par coloration au bleu de Coomassie. Cette expérience a été réalisée en triplicata.

Ces données nous indiquent donc que la porine OmpF est exprimée de façon constante quelle que soit l'osmolarité, bien que le gène *ompF* soit régulé différemment. L'émergence d'une nouvelle protéine quand OmpF diminue laisse supposer que la perte de cette dernière est compensée par une autre porine.

2.6. Le génome de *D. dadantii* code deux autres porines.

Suite à cette observation, nous nous sommes interrogés sur la différence observée entre les profils transcriptomique et protéique d'OmpF. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Parmi celles-ci, nous avons émis la possibilité de l'existence d'autres porines possédant une régulation inverse d'OmpF et migrant au même endroit sur les gels polyacrylamides. Pour rappel, il est connu que *D. dadantii* possède une porine majeure OmpF mais ne possède aucune protéine homologue d'OmpC.

Pour répondre à cette question, nous avons collaboré avec le Dr Michael Marceau (UMR8204) qui, grâce au logiciel Magda, a réalisé une recherche d'orthologues sur les gènes *ompF* et *ompC* d'*E. coli*. Cette recherche est réalisée sur le genre *Dickeya* mais également

sur *Pantoea*, *Erwinia* et *Pectobacterium*, qui sont des genres proches de *Dickeya*. Tout d'abord, l'analyse montre que le gène *ompC* ne possède pas d'orthologues chez *Dickeya*. Ce dernier est également absent chez *Pantoea* et *Pectobacterium* mais est présent chez le genre *Erwinia* (Tableau 2). En revanche, le gène *ompF* est retrouvé chez toutes les espèces étudiées (Dda3937_03660). Chez toutes les espèces du genre *Dickeya*, il existe un second orthologue *ompF* (Dda3937_03661) qui est absent chez les *Pantoea*, *Erwinia* et *Pectobacterium*. Pour finir, une troisième porine semblable à OmpF (Dda3937_03657) est présente chez les espèces *D. dadantii* subsp *dadantii*, *D. solani*, *D. zea* et *D. dadantii* subsp *dieffenbachiae* (Tableau 2).

Genres	Espèces	<i>ompC</i>	<i>ompF1</i>	<i>ompF2</i>	<i>ompF3</i>
<i>Dickeya</i>	<i>dadantii</i> subsp <i>dadantii</i>		✓	✓	✓
	<i>dadantii</i> subsp <i>dieffenbachiae</i>		✓	✓	✓
	<i>zea</i>		✓	✓	✓
	<i>chrysanthemi</i>		✓	✓	
	<i>dianthicola</i>		✓	✓	
	<i>paradisiaca</i>		✓	✓	
	<i>solani</i>		✓	✓	✓
	<i>aquatica</i>		✓	✓	
<i>Erwinia</i>		✓	✓		
<i>Pectobacterium</i>			✓		
<i>Pantoea</i>			✓		

Tableau 2 : Récapitulatif de la présence d'orthologues des gènes *ompC* et *ompF* chez les genres *Dickeya*, *Erwinia*, *Pectobacterium* et *Pantoea*.

La présence d'un orthologue est indiquée par le symbole ✓.

Cette analyse se basant sur le BLAST, les gènes environnants et le respect de la syntonie a mis en évidence non pas un mais trois gènes *ompF* (Tableau 2). Lorsque nous avons cherché à localiser ces gènes sur le génome de *D. dadantii*, nous avons pu observer que ces trois gènes se situent les uns à la suite des autres sans pour autant être sous forme d'opéron. Le gène *ompF* a, semble-t-il, été dupliqué chez *D. dadantii*. Pour la suite de cette étude, les différents gènes sont donc renommés : *ompF1* (Dda3937_03661 ; gène étudié depuis le début de cette étude), *ompF2* (Dda3937_03660) et *ompF3* (Dda3937_03657). Les deux porines OmpF2 et OmpF3 présentent respectivement 82% et 68% d'homologies avec la porine OmpF1.

Afin de vérifier que les différentes copies du gène *ompF* produisent des porines, l'interruption des trois gènes *ompF* par insertion de cassette de résistance à la gentamycine

ou à la kanamycine est entreprise. Des délétions au niveau de ces gènes pour obtenir les doubles mutants *ompF1F2*, *ompF1F3*, *ompF2F3* et le triple mutant *ompF1F2F3* sont également réalisées.

Les différents mutants sont cultivés en milieu M63 à 330 et 700 mOsm afin d'en extraire les protéines membranaires et ainsi se faire une idée des différents profils protéiques. Tout d'abord, on peut voir que, quelle que soit la souche étudiée, le profil protéique est identique à 330 et 700 mOsm. Il n'y a donc pas de variations causées par l'osmolarité. Si on regarde maintenant les profils des différents mutants, on observe une disparition de la bande majoritaire au niveau des souches *ompF1*, *ompF1F2*, *ompF1F3* et *ompF1F2F3*. En revanche, les mutants *ompF2*, *ompF3* et *ompF2F3* présentent un profil semblable à celui de la souche EC3937 (Figure 34). Ces données nous permettent donc d'identifier la protéine majeure comme étant la porine OmpF1. En absence de cette dernière, il est observé une nouvelle fois une expression plus importante d'une autre protéine localisée un peu plus haut dans le gel polyacrylamide, ce qui pourrait suggérer l'induction d'une porine de substitution pour pallier l'absence d'OmpF (Figure 34).

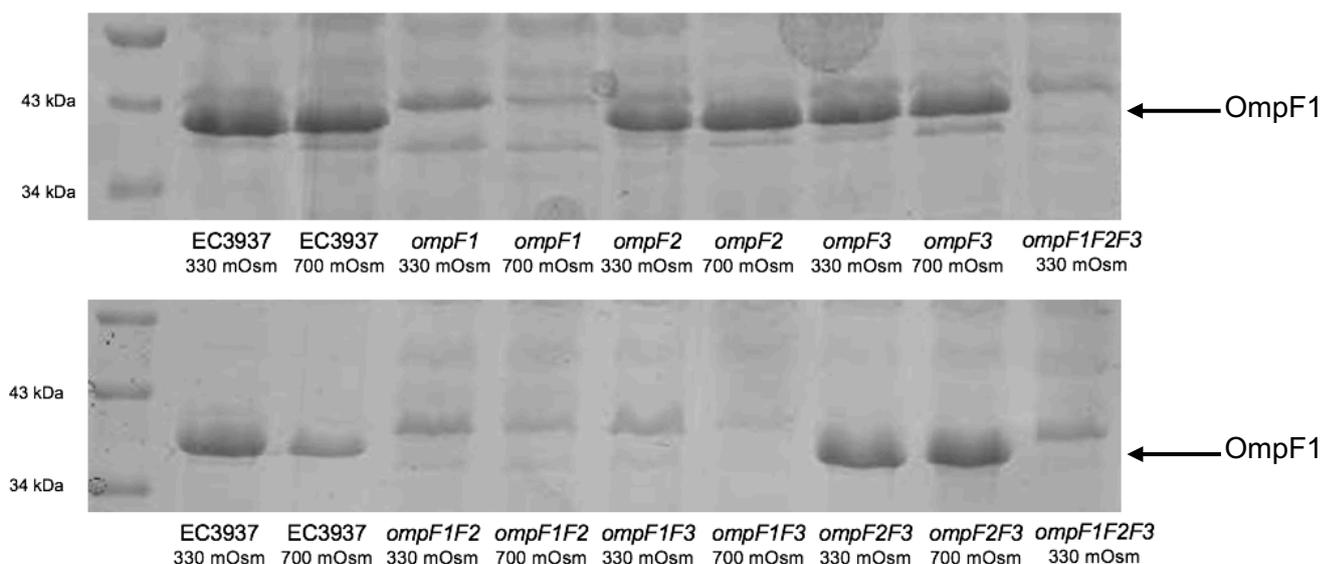


Figure 34 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 et des divers mutants de porines à 330 et 700 mOsm.

150 µg de protéines membranaires des souches EC3937, *ompF1*, *ompF2*, *ompF3*, *ompF1F2*, *ompF1F3*, *ompF2F3* et *ompF1F2F3* cultivées à différentes osmolarités (330 et 700 mOsm) sont déposés sur gel polyacrylamide 12%. Les profils protéiques sont révélés par coloration au bleu de Coomassie. Cette expérience a été réalisée en triplicata.

Ces données semblent donc contredire l'hypothèse posée qui était qu'une des porines OmpF2 ou OmpF3 était régulée à l'inverse de OmpF1 lors d'une variation d'osmolarité et migrerait au même endroit sur un gel polyacrylamide. Les conditions expérimentales testées ne

permettent pas de localiser ces deux porines qui, pourtant, possèdent une poids moléculaire proche de la porine OmpF1 (40 kDa). On peut donc penser que soit les gènes ne sont pas exprimés, soit les conditions expérimentales ne sont pas favorables à leur expression.

2.7. L'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est modulée lors de la variation du pH.

Les données rassemblées lors de cette étude semblent bien indiquer que le phosphorelais EnvZ/OmpR chez *D. dadantii* ne répond pas au changement d'osmolarité contrairement à ce qui est montré chez de nombreuses espèces. On peut penser qu'il répond à un autre stimulus lui permettant ainsi de participer à l'adaptation bactérienne. Outre l'osmolarité chez *E. coli*, deux autres stimuli sont connus pour l'activer : le pH et la carence nutritionnelle (Heyde et Portalier, 1987 ; Liu et Ferenci, 1998 ; Sato *et al.*, 2000). Nous avons choisi d'observer l'effet du pH sur le système EnvZ/OmpR, le pH étant l'un des paramètres les plus variables lors de l'infection de l'hôte. En effet, il est décrit que la bactérie passe d'un milieu à pH 4,5/6 à l'entrée de l'apoplaste à un pH8 en fin d'infection (Jiang *et al.*, 2016).

Pour cela, la technique du PhosTag *in vivo* est utilisée. La souche sauvage est cultivée en milieu M63 complété avec 0,2% de glycérol adapté à différents pH (pH 5, 6, 7 et 8). Les souches *ompR* et *envZ* sont utilisées en tant que témoin afin de localiser la protéine phosphorylée et non phosphorylée. Les suspensions en phase exponentielle sont lysées par sonication et déposées sur gel. Alors qu'aucune variation d'activité n'était visible à différentes osmolarités (Figure 30), on observe ici une modulation du profil de phosphorylation du régulateur dépendante du pH. Tout d'abord, le gel montre aux pH7 et pH8 un profil de phosphorylation similaire avec une proportion d'OmpR-P aux alentours de 10,5% (Figure 35). Ce taux de phosphorylation augmente avec l'acidité du pH. En effet, à pH6, 27% des régulateurs OmpR sont phosphorylés contre 49% à pH5 (Figure 35). Le Western-Blot montre également une hausse de la quantité globale de régulateurs OmpR dans les bactéries à pH acide.

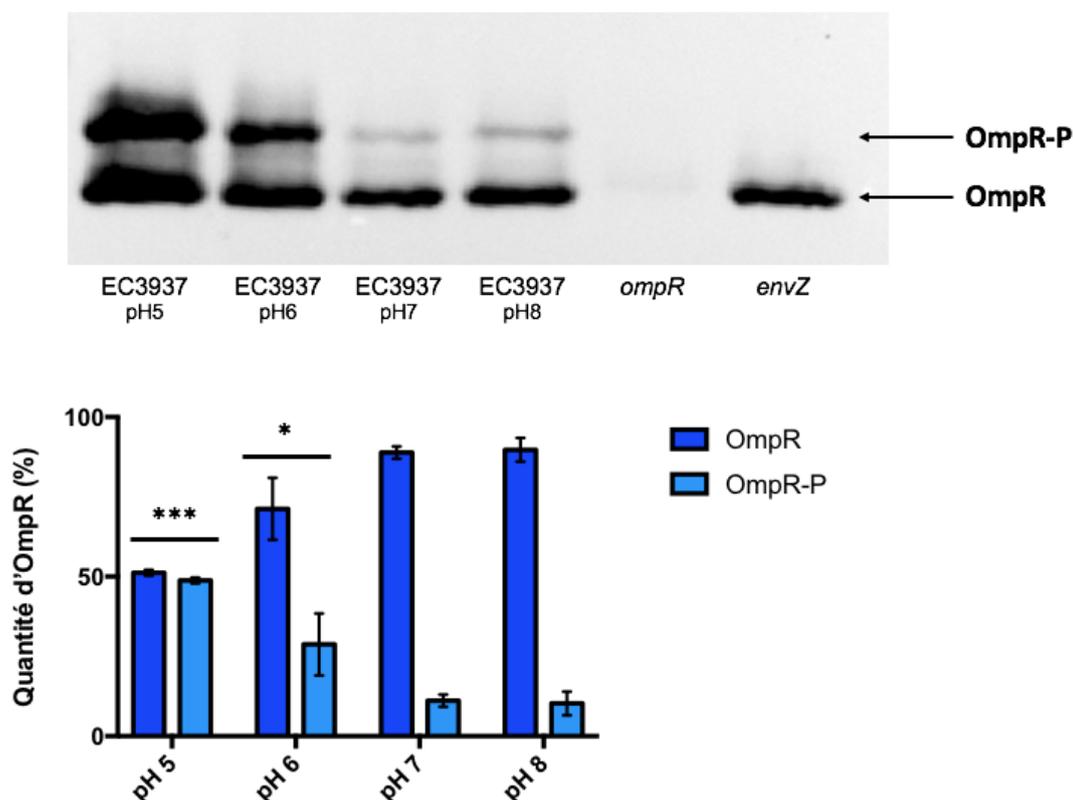


Figure 35 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag *in vivo* de la souche sauvage à différents pH.

100 µg des lysats cellulaires des souches *ompR*, *envZ* et EC3937 cultivées à différents pH (pH5 à pH8) sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Le Western blot est effectué grâce à un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR. Les proportions d'OmpR et OmpR-P sont déterminées à l'aide du logiciel Fusion. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage à pH7 (* p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Ces données indiquent donc que le phosphorelais EnvZ/OmpR répond au stimulus pH avec une activation importante du système dans un milieu à pH acide. Cette activation du phosphorelais entraîne une hausse du nombre de monomères d'OmpR dans la bactérie ce qui suggère un rétrocontrôle du système sur lui-même. Le phosphorelais régulant la porine OmpF et s'activant à pH5 et 6, nous nous sommes donc demandé si cette modulation affecte l'expression de la porine OmpF1 mais également si les porines OmpF2 et OmpF3, non exprimées à pH7, sont exprimées dans l'une de ces conditions.

2.8. L'expression des porines OmpF1 et OmpF2 dépend du pH.

Afin de savoir si la variation de pH affecte l'expression de la porine OmpF1, les protéines de membranes sont de nouveau extraites de la souche sauvage mais cette fois ci à différents pH (pH 5, 6, 7 et 8). 150 µg de protéines extraites sont déposées sur un gel

acrylamide 12%. Alors qu'aucune différence en quantité de protéines OmpF n'était visible lorsque l'on faisait varier l'osmolarité (Figure 33), on observe, à l'instar des résultats du PhosTag, des profils divergents selon le pH du milieu de culture. On observe à pH7 et pH8 le même type de profil protéique avec une expression majoritaire de la porine OmpF1 (Figure 36). Ce profil avait été déjà observé lors des variations d'osmolarité qui avaient été effectuées à pH7 (Figure 33). En revanche, à pH5 et pH6 apparait une seconde protéine majoritaire inconnue. Cette protéine, migrant plus bas que la porine OmpF1, prendra ici le nom de porine X (Figure 36). Le gel nous montre également une régulation inverse des porines OmpF1 et X en fonction du paramètre pH. En effet, plus le pH est acide, moins la porine OmpF1 est exprimée à l'inverse de la porine X (Figure 36).

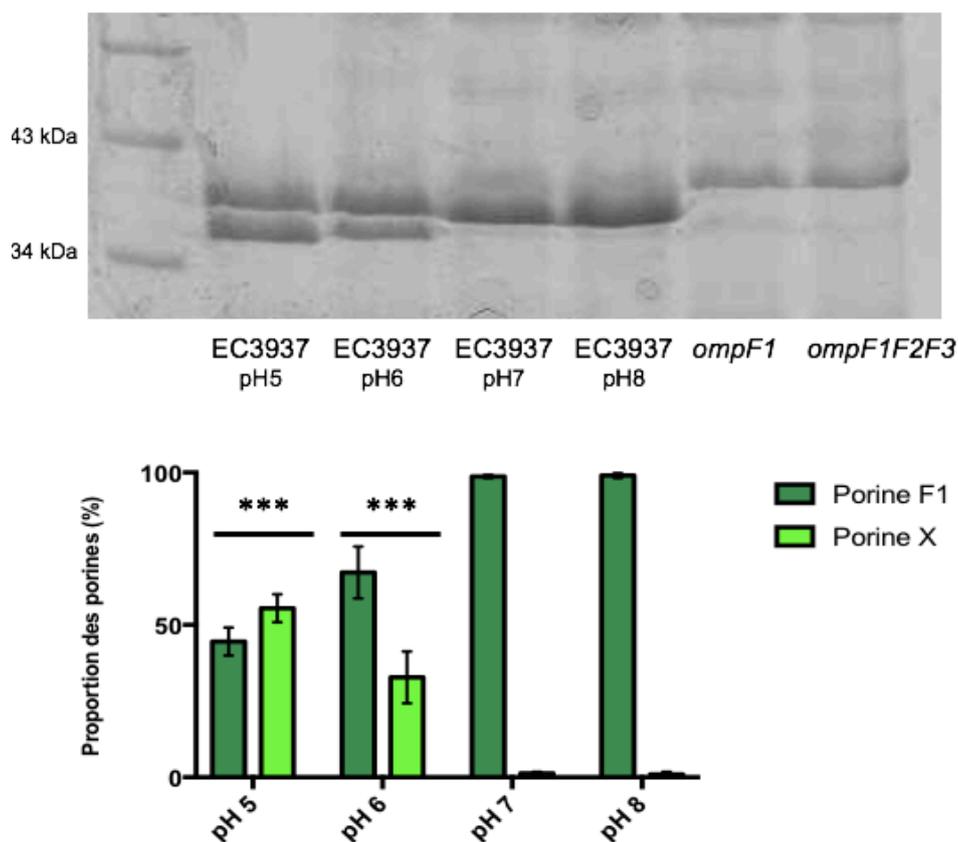


Figure 36 : Profils protéiques des membranes de la souche EC3937 à différents pH.

150 µg de protéines membranaires des souches *ompF1*, *ompF1F2F3* et EC3937 cultivées à différents pH (pH5 à pH8) sont déposés sur gel polyacrylamide 12%. Les profils protéiques sont révélés par coloration au bleu de Coomassie. Les proportions de protéines sont déterminées à l'aide du logiciel ImageJ. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage à pH7 (***) ($p < 0,001$).

Suite à ces résultats, nous nous sommes questionnés sur l'identité de la porine X. Cette dernière peut-elle être OmpF2 ou OmpF3 ? Afin de répondre à cette question, les bandes du gel sont extraites, traitées à la trypsine et analysées en spectrométrie de masse. La

spectrométrie de masse a été réalisée par Valérian Hausard de l'équipe du Pr Jérôme Lemoine (UMR 5280, Lyon 1). Plusieurs bandes extraites du gel de porines sont testées (Figure 37) : la bande établie comme étant OmpF1, celle représentant la porine X, la bande apparaissant lors de l'absence d'OmpF1 ainsi que la bande localisée au même niveau que la porine X dans un mutant dépourvu des trois porines OmpF1, OmpF2 et OmpF3. Tout d'abord, les résultats obtenus lors de la spectrométrie de masse confirment la présence d'OmpF1, porine dont la concentration diminue lorsque le pH s'acidifie. Ces données permettent également d'identifier la porine X qui est la porine OmpF2. Cette porine est exprimée uniquement à pH5 et pH6. La fine bande visible à pH7 et pH8 que l'on retrouve également dans un mutant *ompF1F2F3* se trouve être une toute autre protéine : la protéine OmpA, protéine majeure de la membrane externe chez *E. coli*. Pour finir, nous avons remarqué qu'en absence de la porine OmpF1, une autre protéine était exprimée. Cette dernière a été identifiée comme étant GanL, une porine spécifique au passage des molécules de galactane (Delangle *et al.*, 2007).

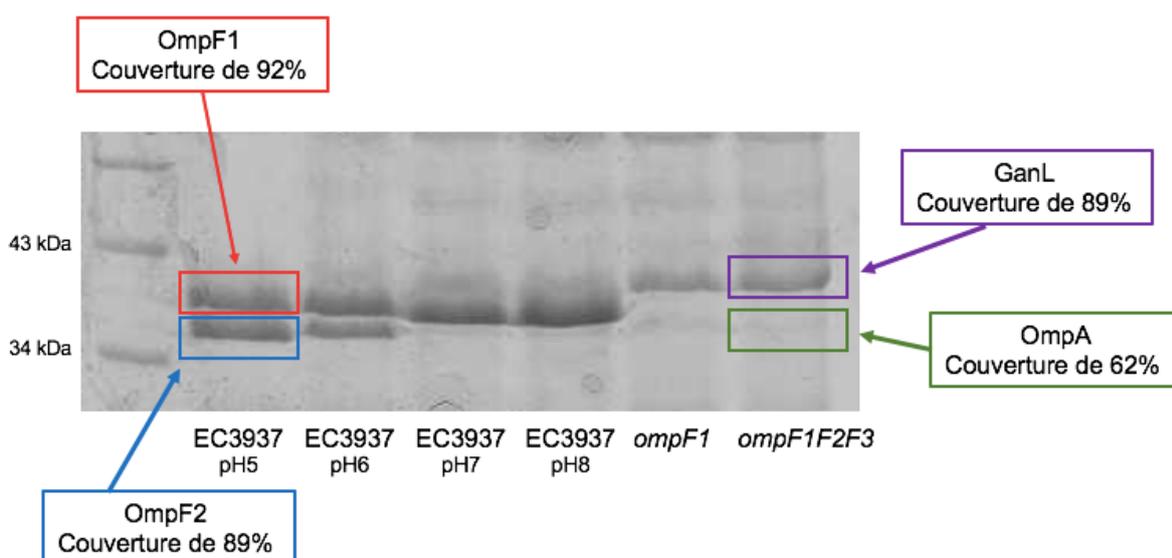


Figure 37 : Bandes du gel de porines analysées en spectrométrie de masse.

Le gel est découpé au niveau des bandes, les protéines sont traitées à la trypsine et les peptides obtenus sont analysés en spectrométrie de masse. La couverture représente le pourcentage de la protéine qui est couvert par les peptides identifiés.

L'ensemble de ces données mettent en avant un profil membranaire variable dépendant du pH environnant avec l'apparition de la porine OmpF2 lorsque la porine OmpF1 diminue. Grâce aux données du PhosTag, on peut en déduire que cette variation protéique est corrélée à l'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR. Tout d'abord, on observe bien un profil semblable que ce soit au niveau des porines ou du taux de phosphorylation à pH7 comme à pH8. Les résultats nous montrent également que plus le phosphorelais EnvZ/OmpR est activé,

plus la porine OmpF2 est exprimée et OmpF1 réprimée. Alors que nous pensions que la transcription d'*ompF1* était activée par une phosphorylation importante d'OmpR, nous montrons ici que nous sommes dans une répression du gène par OmpR-P.

2.9. Phosphorylée, OmpR se fixe plus efficacement à la région régulatrice d'*ompF2*.

Les données obtenues suggèrent une régulation des porines OmpF1 et OmpF2 similaire au mécanisme OmpF/OmpC chez *E. coli*. Afin de vérifier que le régulateur OmpR régule directement le gène *ompF2*, un retard sur gel est effectué sur la région régulatrice d'*ompF2* (prom*ompF2*) et de la région codante d'*opgC* (*opgC*_{mil}) avec 100 à 400 ng protéines OmpR, OmpR-P et le témoin BSA. Comme pour le gène *ompF1*, la protéine OmpR entraîne un retard de migration de l'ADN prom*ompF2* ce qui annonce une fixation de la protéine sur la zone régulatrice de ce gène. On remarque aussi une différence de retard lorsque l'on met au contact de l'ADN OmpR ou OmpR-P avec une fixation plus efficace de la protéine phosphorylée (Figure 38).

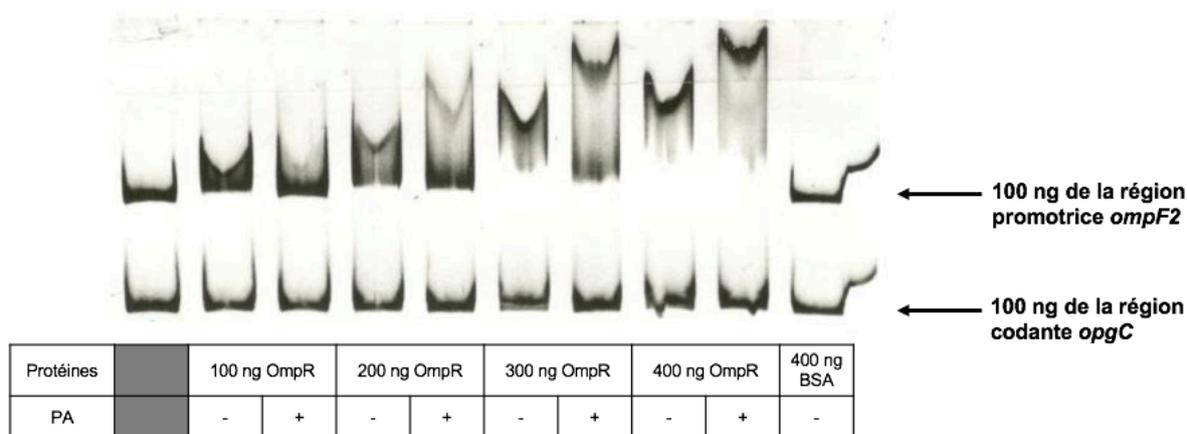


Figure 38 : Retard sur gel des protéines OmpR et OmpR-P sur la région promotrice d'*ompF2*.

100 à 400 ng de protéines OmpR, OmpR phosphorylée par le phosphoramidate (PA) ou de BSA sont incubées avec 100 ng d'ADN durant 30 min. Le mélange est déposé sur gel acrylamide 6%. La région codante *opgC* de *D. dadantii* est utilisée en tant que témoin négatif (Bontemps-Gallo *et al.*, 2016).

Ces données semblent bien indiquer une intervention du régulateur OmpR dans la régulation du gène *ompF2*. OmpR sous sa forme phosphorylée semble se fixer plus efficacement au niveau de la zone régulatrice du gène *ompF2*. Afin de compléter ces résultats, une qRT-PCR devra être effectuée à différents pH sur les deux gènes *ompF1* et *ompF2*.

2.10. Discussion

Lors de l'étude de la relation entre le phosphorelais EnvZ/OmpR et les OPG, nous avons pu observer que l'expression du gène *ompF*, codant la porine majeure de *D. dadantii*, varie en fonction de l'osmolarité du milieu environnant avec une expression génique plus forte à 330 mOsm. Un mutant *envZ* présentant une faible expression du gène *ompF*, nous avons émis l'hypothèse que, chez *D. dadantii*, OmpR est fortement phosphorylé à basse osmolarité entraînant de ce fait une activation de la transcription du gène *ompF*.

Notre hypothèse reposant sur l'état de phosphorylation du régulateur OmpR, l'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est une des premières données que nous avons cherché à obtenir. Pour cela, la technique du PhosTag *in vivo* permettant l'analyse du ratio régulateur phosphorylé *versus* régulateur non phosphorylé est utilisé. Alors que l'on s'attendait à observer une baisse de la phosphorylation à 700 mOsm comparée à 330 mOsm, ce n'est pas le cas. En effet, une très faible variation de la phosphorylation est visible (environ 4% de différence entre 170 et 700 mOsm) (Figure 30). Cette différence n'est pas considérée comme significative selon le test ANOVA utilisé. Nous avons donc conclu de ces expérimentations que le phosphorelais EnvZ/OmpR ne répond pas à l'osmolarité et que, de ce fait, l'expression différentielle d'*ompF* en fonction de l'osmolarité n'est pas due à ce système. Toutefois, on peut se questionner sur ce résultat. En effet, même si le pourcentage de différence est très faible, on observe tout de même une baisse de la phosphorylation lorsque l'osmolarité augmente. La régulation de gènes cibles par les phosphorelais étant minutieusement contrôlée, on peut donc penser que cette légère différence dans le ratio de phosphorylation est suffisante pour réguler le gène *ompF*. On peut également supposer qu'un autre phosphorelais travaille en coopération ou en compétition avec EnvZ/OmpR pour réguler *ompF* en réponse à des stimuli comme l'osmolarité. Chez *E. coli*, trois autres phosphorelais sont connus pour activer ou réprimer les gènes *ompF* et *ompC* : RstBA, PhoBR et CpxAR (Futai, 2014 ; Meyer *et al.*, 1990 ; Batchelor *et al.*, 2005). Nous nous sommes focalisés sur deux phosphorelais : CpxAR ainsi que RcsCDB pour son lien étroit avec EnvZ/OmpR.

Nous montrons ici que le régulateur RcsB du phosphorelais RcsCDB est capable de se fixer au niveau de la région promotrice du gène *ompF1* qu'il soit sous sa forme phosphorylée ou non phosphorylée. Alors que chez *E. coli* RcsCDB répond comme EnvZ/OmpR à l'osmolarité (Sledjesk et Gottesman, 1996), aucune différence significative de phosphorylation n'est visible à basse et haute osmolarité chez *D. dadantii*. Encore une fois, la variation de phosphorylation est très faible avec une différence d'environ 4% entre 330 et 700 mOsm (Figure 32A). Ce pourcentage est très proche de ce qui est observé pour le phosphorelais EnvZ/OmpR. Dans la littérature, les relations entre ces deux phosphorelais sont souvent mises en évidence notamment en ce qui concerne leur régulon (Bontemps-Gallo

et al., 2016). Ces données peuvent donc nous amener à penser que ces derniers vont travailler de concert pour réguler le gène *ompF* en réponse à l'osmolarité. Des analyses plus approfondies seront nécessaires afin de répondre à cette hypothèse.

Parallèlement au système RcsCDB, le phosphorelais CpxAR a également été étudié. En 2005, le laboratoire montrait qu'une surphosphorylation du régulateur CpxR entraînait une hausse de l'expression d'*ompF* (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015). Or, chez *E. coli*, CpxR sous sa forme phosphorylée est connu comme réprimant *ompF* et activant *ompC* (Batchelor *et al.*, 2005). Ces données vont dans le sens d'une régulation inverse d'*ompF* chez *D. dadantii* par rapport à *E. coli*. Ensuite, alors que CpxR-P se fixe au niveau de sites en amont du gène chez *E. coli*, nous montrons ici que cette régulation ne semble pas se faire de façon directe chez *D. dadantii*. En effet, CpxR est incapable de se fixer en amont d'*ompF* quel que soit son état de phosphorylation (Figure 31B). On peut donc penser qu'un régulateur ou une protéine intermédiaire est nécessaire pour permettre à CpxAR de jouer un rôle dans l'expression de la porine. Dans les années 2010, la protéine auxiliaire MzrA a été mise en évidence chez *E. coli*. Elle appartient au régulon du phosphorelais CpxAR et permet de contrôler le niveau d'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR, notamment suite à des stress de l'enveloppe bactérienne (Vogt et Raivio, 2012). Cette protéine est également retrouvée chez *D. dadantii* avec une partie périplasmique, permettant la liaison à EnvZ, qui présente une forte homologie (63%) avec la protéine d'*E. coli*. Il est possible que l'effet de CpxAR sur *ompF* passe par la modulation d'EnvZ/OmpR par MzrA.

La variation de l'osmolarité n'étant pas le seul paramètre environnemental entraînant une activation du système EnvZ/OmpR chez d'autres espèces bactériennes comme *E. coli* ou *S. enterica* sv *typhimurium*, nous nous sommes intéressés à un autre de ces paramètres : le pH. Lors de l'infection, le pH est décrit comme passant de 4,5 à 6 à l'entrée dans l'hôte à un pH de 8 en fin d'infection (Jiang *et al.*, 2016). Alors qu'aucun changement de l'activité du phosphorelais n'est visible lorsque l'osmolarité varie, un changement drastique du taux de phosphorylation est observé quand le pH varie. En effet, à pH 5, près de la moitié des régulateurs OmpR sont phosphorylés contre approximativement 10% à pH 7/8 (Figure 35). Nous montrons donc ici que le pH acide est bien un des stimulus activant le phosphorelais EnvZ/OmpR chez *D. dadantii* ce qui n'est pas le cas de l'osmolarité. Afin de compléter cette étude, un autre stimulus connu d'EnvZ/OmpR pourrait être intéressant à étudier : la carence nutritionnelle. Chez les zoopathogènes comme *E. coli* ou *Yersinia pestis* (Liu et Ferenci, 1998 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2019), il a été montré que le système EnvZ/OmpR est activé suite à une limitation des nutriments de l'environnement. Dans des circonstances où la concentration en nutriment est limitée, les bactéries doivent piéger les molécules dans la cellule afin de garantir leur croissance ce qui va jouer sur la perméabilité membranaire. Dans

la plante, on peut déceimment penser que la concentration de nutriments est différente en tout début et en toute fin d'infection avec la lyse des cellules végétales.

Parallèlement à l'étude de l'activité du phosphorelais en réponse aux divers stimuli, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique des différentes porines de *D. dadantii*. Alors que nous nous attendions à observer une quantité protéique d'OmpF1 variant en fonction de l'osmolarité, nous avons constaté que cela n'était pas le cas avec une quantité constante de la porine de 170 à 700 mOsm. Comment expliquer cette différence ? Chez les entérobactéries, il est connu que de nombreux ARN non codants permettent un affinage de la composition de la membrane externe au niveau post-transcriptionnel (Vogel et Papenfort, 2006). Parmi ces ARN, MicF et MicC sont les plus connus car régulant les porines OmpF et OmpC chez *E. coli* en se fixant au niveau de la région d'initiation de la traduction (Delihias et Forst, 2001). L'expression de ces ARN dépend également de facteurs environnementaux comme la température ou l'osmolarité (De la Cruz et Calva, 2010). En plus de MicF et MicC, deux autres ARN non codants sont connus pour réguler les porines OmpF et OmpC : RybB, activé lors des stress de l'enveloppe, et IpeX. On peut donc tout à fait penser que l'un ou plusieurs de ces ARN non codant existent également chez *D. dadantii* et entraînent de ce fait une variation entre l'expression génique et l'expression protéique observée.

De façon surprenante, ce travail a également permis d'identifier une seconde porine induite dans un milieu à pH acide. Dans la littérature, il était annoncé chez *D. dadantii* la présence d'une seule porine OmpF, OmpC ne possédant aucun homologue chez cette espèce. Les analyses phylogénétiques, réalisées par le Dr Michael Marceau, ont mises en évidence l'existence de deux porines supplémentaires, OmpF2 et OmpF3, proches d'OmpF1. Parmi ces dernières, la porine OmpF2 est exprimée à pH acide et régulée à l'inverse d'OmpF1. En effet, quand le pH s'acidifie, l'expression d'OmpF1 est réprimée tandis que l'expression d'OmpF2 est activée. Cette régulation semble corrélée à l'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR. Le régulateur OmpR-P semble réprimer *ompF1* à pH acide et au contraire activer le gène *ompF2*. Pour confirmer ces résultats, des analyses de qRT-PCR aux différents pH pour les gènes *ompF1* et *ompF2* seront nécessaires.

Ce type de régulation n'est pas sans rappeler celle observée pour les porines OmpC et OmpF chez *E. coli* (Heyde et Portalier, 1987 ; Sato *et al.*, 2000). Il serait donc intéressant pour la suite de ce projet de se focaliser sur les porines OmpF1 et OmpF2 afin de comprendre leurs rôles chez *D. dadantii*. Ces porines permettent-elles le passage de petites molécules solubles ? Le diamètre de leur pore varie-t-il ? On peut se demander également si la porine OmpF2 est présente dans un milieu à pH acide afin de compenser l'absence d'OmpF1 et ainsi maintenir le *fitness* de la bactérie. On a aussi pu remarquer la présence d'une autre porine subsidiaire GanL, spécifique au passage des galactanes (Delangle *et al.*, 2007), en absence

de la porine OmpF1. Cette porine joue un rôle important en permettant le passage dans la membrane externe de chaînes de galactanes issus de la dégradation de la pectine. Son rôle est semblable à celui des porines KdgM et KdgN. On peut donc se demander si la hausse d'expression de la porine GanL n'est pas due également à une perte de l'expression de KdgN, son gène étant régulé de la même manière qu'OmpF.

3. Le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important lors des premières étapes de l'infection.

Les mutants ponctuels ont été réalisés par Clémence Cochard (Master 2, UGSF). Les mesures de pH dans la plante hôte ont été effectuées par le Dr Sébastien Bontemps-Gallo (UMR8204).

Les phosphorelais, facteurs clefs dans l'adaptation de la bactérie à son environnement, sont en nombre variable chez différentes espèces bactériennes. Notre modèle, *D. dadantii*, possède vingt-huit capteurs et trente-deux régulateurs, quatre de ces derniers étant considérés comme orphelins c'est-à-dire que ces régulateurs ne possèdent pas de capteurs affiliés. Sur ces trente-deux régulateurs, seuls quatre sont montrés comme essentiel au phénomène de virulence. Il s'agit des phosphorelais RcsCDB, CpxAR, GacAS et PhoPQ (Bouchart *et al.*, 2010 ; Bontemps-Gallo *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2008 ; Llama-Palacios *et al.*, 2003). Dans la littérature, on observe en moyenne sur les différentes espèces étudiées 10% de phosphorelais impliqués dans la virulence (Jean-Marie Lacroix Communication Personnelle). Ce chiffre semble faible lorsque l'on connaît la complexité et le nombre de stress rencontrés par les bactéries pathogènes durant le processus infectieux. Cette constatation ne semble pas en accord avec la faible quantité de phosphorelais connus comme participant activement à la virulence. Dans la grande majorité des laboratoires, les tests de pathogénicité sont réalisés à fort inoculum bactérien (10^7 bactéries) avec des souches dont les gènes du capteur et/ou du régulateur sont délétés. Cette forte concentration bactérienne permet d'obtenir, pour une souche sauvage, un taux d'infection réussie de 100%. En effet, la plante est submergée par la bactérie ce qui l'empêche de se défendre efficacement. De ce fait, lorsque l'on mute un gène essentiel au phénomène de virulence, on observe une disparition des symptômes (macération). Ces tests nous permettent donc uniquement de prévoir les gènes absolument nécessaires à la virulence et non les gènes dont l'absence entraîne des effets trop subtils pour être remarqués.

Dans la première partie de cette étude, je m'étais intéressée à la conséquence d'une inactivation du phosphorelais EnvZ/OmpR sur la virulence de *D. dadantii*. Aucune différence n'était visible entre les souches sauvage, *envZ* et *ompR* (Figure 21). On en avait déduit que le phosphorelais EnvZ/OmpR n'intervenait pas dans le phénomène de virulence. Toutefois, cela semble extrêmement étonnant. En effet, nous avons montré que le phosphorelais est activé différemment selon le pH. Or, durant l'infection, la bactérie se retrouve confrontée à un stress acide au début de l'infection pour ensuite se trouver face à un pH 7/8 en fin de

processus. J'ai donc choisi d'étudier dans cette troisième partie le rôle du phosphorelais EnvZ/OmpR de *D. dadantii* lors de l'infection de son hôte.

3.1. Le phosphorelais EnvZ/OmpR participe au phénomène de virulence.

Au laboratoire, nous avons pour habitude d'effectuer les tests de pathogénicité à fort inoculum bactérien (10^7 bactéries) afin de combattre les défenses de la plante et ainsi déterminer les gènes essentiels à une pleine virulence. Cette technique nous empêche toutefois de prédire les gènes ayant un rôle plus subtil dans l'établissement de la virulence. Il serait plus intéressant de réaliser ces mêmes expériences à faible inoculum bactérien afin de voir si l'infection est abortive ou non. Afin de déterminer la concentration bactérienne idéale pour ces expérimentations, des tests de pathogénicité avec 10^3 à 10^7 bactéries sont réalisées sur feuilles d'endives. Le nombre d'endives macérées ainsi que l'expansion de la macération sont observés au bout de cinq jours. Tout d'abord, une diminution du taux d'infection est observée aux concentrations bactériennes 10^3 , 10^4 et 10^5 comparativement aux concentrations 10^6 et 10^7 qui présentent toutes deux un taux parfait de 100% d'endives macérées. 42,5% des endives infectées à 10^3 sont macérées contre 53,75% à 10^4 et 83,33% à 10^5 (Figure 39). Les phénotypes observés à 120H ne varient plus par la suite. En effet, les endives sont observées dix jours supplémentaires et l'aspect des feuilles d'endives n'est pas modifié (Données non présentées).

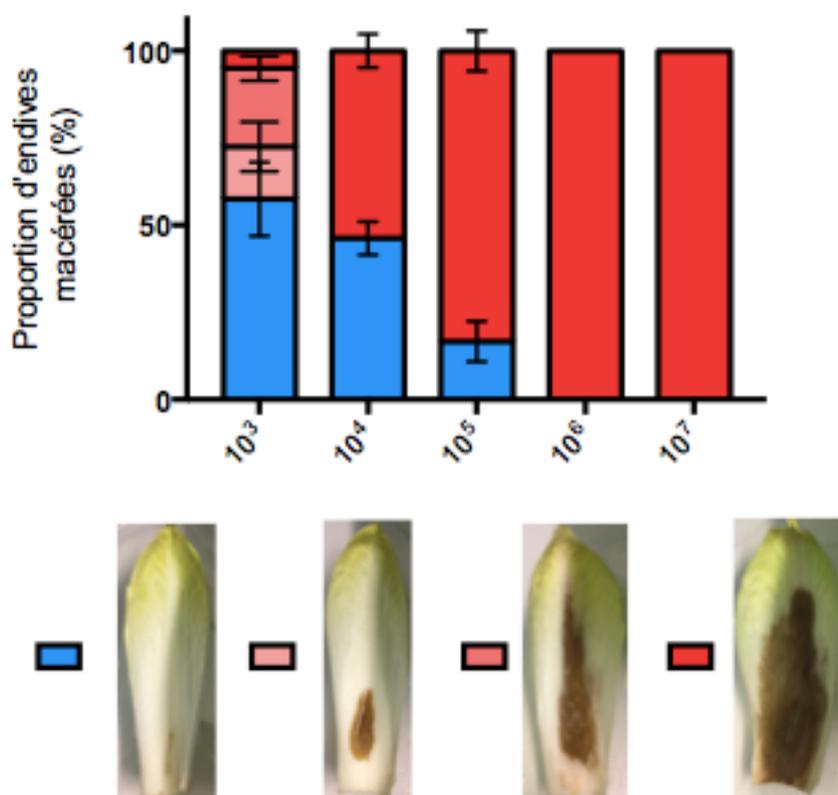


Figure 39 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à différents inocula.

Les feuilles d'endives sont inoculées avec 10^3 à 10^7 bactéries. L'apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 120H. Plusieurs phénotypes sont observables, ces phénotypes dépendant de l'avancée de la macération.

Pour la suite des expérimentations, nous avons donc choisi de nous baser sur la dose létale 50 (DL50). Cette DL50 est atteinte à 10^4 bactéries. Si on observe les profils de macération obtenus, on observe une forte hétérogénéité au niveau des feuilles d'endives à 10^3 bactéries avec des macérations localisées au niveau du lieu d'incision, des macérations recouvrant la totalité de la feuille mais également des profils intermédiaires (Figure 39). Cette hétérogénéité n'est pas visible à partir de 10^4 bactéries. En effet au bout de 5 jours, la feuille est soit totalement macérée soit dépourvue de macération. Les tests d'infection à 10^4 bactéries sont donc choisis pour la suite pour son pourcentage d'endives macérées et pour ce type de réponse « tout ou rien ».

Une fois cette concentration déterminée, les tests de pathogénicité sont effectués sur les mutants *envZ* et *ompR* qui, à une concentration de 10^7 bactéries, présentaient un phénotype semblable à la souche sauvage. Le mutant *ompF1*, gène codant une des porines principales, est également testé. Alors qu'aucune différence n'était observée à 10^7 bactéries (Figure 21), on peut voir à 10^4 une baisse du taux d'endives macérées pour les différents

mutants comparativement à la souche sauvage. En effet, on a un taux de 18,33% d'endives macérées pour l'entièreté des mutants contre 48,33% dans une souche sauvage (Figure 40).

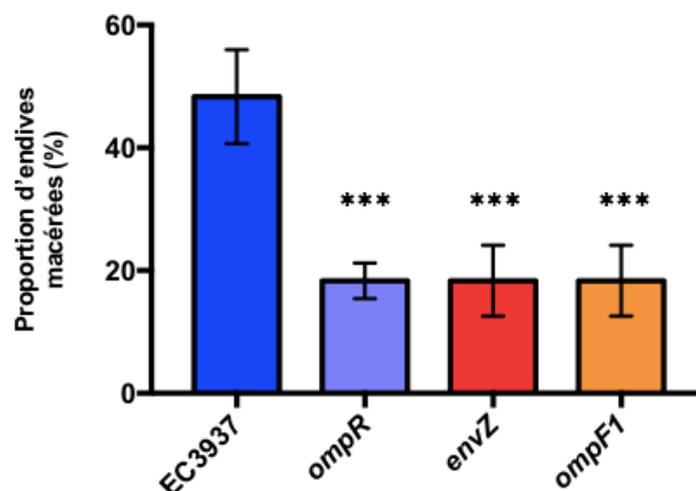


Figure 40 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à une concentration bactérienne de 10^4 bactéries. Vingt feuilles d'endives sont inoculées avec 10^4 bactéries de la souche sauvage, *envZ*, *ompR* et *ompF1*. L'apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 120H. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (***) $p < 0,001$).

On a 2,5 fois moins d'endives macérées en absence de la porine OmpF1 ou lors de l'inactivation du phosphorelais. Ces données indiquent donc que le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important dans le mécanisme infectieux sans toutefois être indispensable.

3.2. Une surphosphorylation d'OmpR entraîne une perte de virulence.

Le phosphorelais EnvZ/OmpR étant important dans le processus infectieux, nous nous sommes demandé si un dérèglement de l'activité du phosphorelais peut entraîner, tout comme la suppression du système, une conséquence sur la virulence. En effet, la communauté scientifique a montré par ses études qu'une régulation fine des phosphorelais de la bactérie est essentielle au bon déroulement du processus infectieux et à la survie bactérienne. La perte ou un excès de phosphorylation peuvent générer des modifications géniques entraînant des conséquences drastiques sur différents processus (infectieux, métabolique ...). A titre d'exemple, CpxAR, phosphorelais intervenant dans les étapes précoces de l'infection chez *D. dadantii*, a besoin d'une régulation fine de sa phosphorylation *in planta*. En effet, un excès de phosphorylation du régulateur CpxR entraîne un effet délétère sur la bactérie (Bontemps-Gallo *et al.*, 2015).

Deux types de mutants sont réalisés par mutagenèse dirigée : un mutant non phosphorylable et un mutant constitutivement phosphorylé. Pour le mutant non phosphorylable, l'aspartate en position 55 recevant le phosphate du régulateur OmpR est remplacé par une asparagine (*ompR-55*). En ce qui concerne la phosphorylation constitutive, deux acides aminés entourant l'histidine phosphorylable en position 243 du capteur EnvZ ont été ciblées : la valine en position 241 et la thréonine en position 247. La valine est substituée par une glycine (*envZ-241*) tandis que la thréonine est modifiée en arginine (*envZ-247*). Chez *E. coli*, ces deux mutations provoquent une hausse du taux de phosphorylation du régulateur OmpR (Waukau *et Forst.*, 1992 ; Aiba *et al.*, 1989). Une fois la mutagenèse effectuée, les mutations sont introduites par conjugaison hétérologue dans la souche *ompR* de *D. dadantii*.

Avant d'étudier l'impact de la variation de phosphorylation sur la virulence, nous avons commencé par vérifier l'effet des mutations sur la phosphorylation. Pour cela, des PhosTag *in vivo* sont effectués avec les souches sauvage, *envZ-241*, *envZ-247*, *ompR-55* et les souches *envZ* et *ompR* comme témoins. Les bactéries, cultivées en milieu M63 complété avec du glycérol 0,2%, sont lysées par sonication une fois en phase exponentielle. 100 µg de lysats cellulaires sont déposés par puits dans un gel PhosTag™. Comme déjà vu précédemment, la souche sauvage présente un taux de phosphorylation d'OmpR d'environ 10%. En ce qui concerne le mutant *ompR-55*, on observe un profil semblable à notre témoin *envZ* (Figure 41B, 41C). En effet, une seule bande représentant la protéine OmpR non phosphorylée est visible. Cette souche possède donc bien un régulateur non phosphorylable. Pour les deux mutants constitutivement phosphorylés, nous nous attendions à avoir un taux de phosphorylation plus important que ce qui est observé dans la souche sauvage. C'est uniquement le cas du mutant *envZ-241*. Ce mutant présente une phosphorylation très importante avec un peu plus de 90% de régulateurs phosphorylés (Figure 41A, 41C). La quantité de protéines OmpR dans ces mutants est également très importante montrant encore une fois un rétrocontrôle du régulateur sur le système. Contrairement à *envZ-241*, le régulateur OmpR du mutant *envZ-247* est phosphorylé à 13,83% ce qui est semblable à la souche sauvage (Figure 41A, 41C). Cette mutation ne semble pas, chez *D. dadantii*, permettre une phosphorylation constitutive du régulateur. Le mutant *envZ-241* est donc choisi pour la suite de ces travaux.

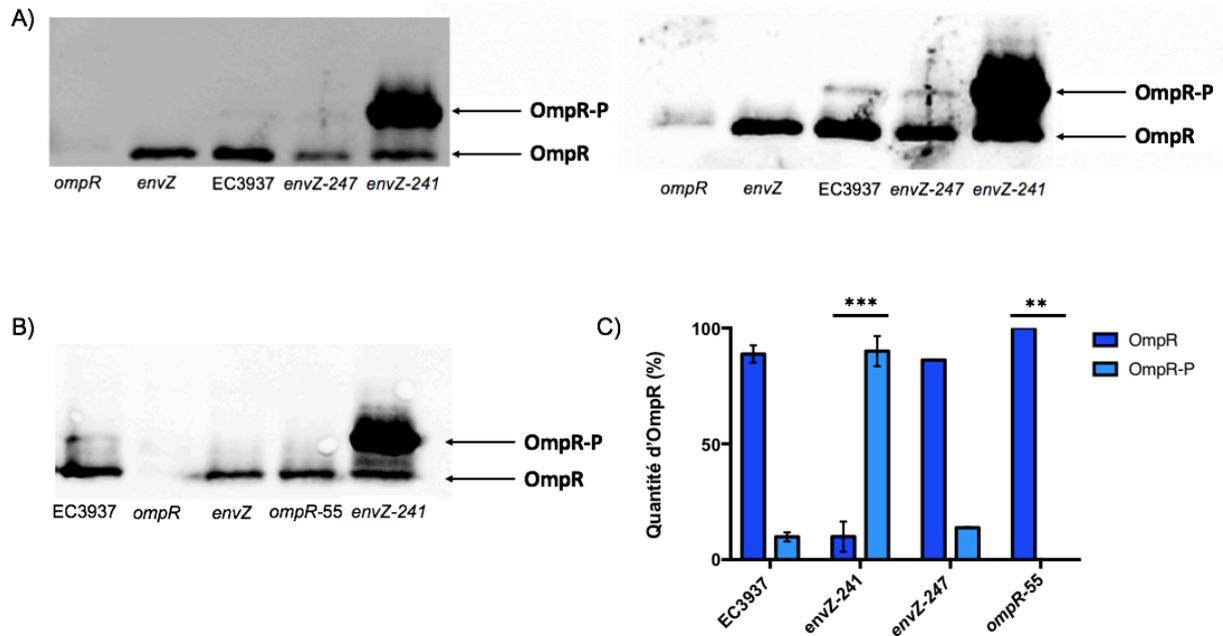


Figure 41 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag *in vivo* des mutants du phosphorelais EnvZ/OmpR

- A. 100 µg des lysats cellulaires des souches sauvage, *envZ*, *ompR*, *envZ-241* et *envZ-247* sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Le Western blot est effectué grâce à un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR. Les deux images représentent un unique gel dont le contraste a été modifié.
- B. 100 µg des lysats cellulaires des souches sauvage, *envZ*, *ompR*, *envZ-241* et *ompR-55* sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Le Western blot est effectué grâce à un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR.
- C. Les proportions d'OmpR phosphorylé ou non sont déterminées à l'aide du logiciel Fusion. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Des tests de pathogénicité à faible inoculum bactérien (10^4) sont effectués sur les mutants confirmés. La souche *ompR-55* présente un taux de macération aux alentours de 28% ce qui est semblable au taux observé dans une souche dépourvue d'un des deux membres du phosphorelais. En ce qui concerne le mutant *envZ-241*, il ne cause absolument aucun symptôme au niveau des feuilles d'endives (Figure 42). En effet, aucune macération, même localisée au niveau du lieu d'incision, n'est visible.

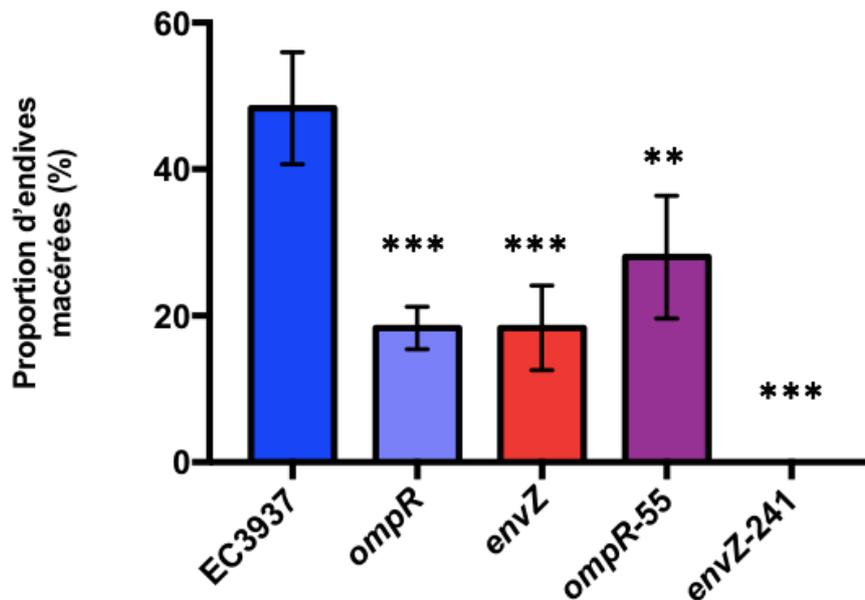


Figure 42 : Pathogénicité sur feuilles d'endives à une concentration bactérienne de 10^4 bactéries. Vingt feuilles d'endives sont inoculées avec 10^4 bactéries de la souche sauvage, *envZ*, *ompR*, *ompR-55* et *envZ-241*. L'apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 120H. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Le mutant *envZ-241* ne présentant aucun symptôme à faible inoculum bactérien, nous sommes donc demandé si cette surphosphorylation du régulateur OmpR venait également perturber le processus de virulence à une concentration de 10^7 bactéries. Les tests de pathogénicité sont donc également effectués à cette concentration et, comme à faible inoculum bactérien, on observe une baisse drastique du taux d'infection pour le mutant *envZ-241* (100% pour EC3937 vs 18,33% pour *envZ-241*) (Figure 43). Afin d'essayer d'expliquer cette perte de virulence, les différents facteurs de virulence (sécrétion d'exoenzymes, motilité, synthèse d'exopolysaccharides) sont vérifiés. Ce mutant semble uniquement affecté dans sa sécrétion de pectinases avec une baisse d'un facteur 1,5 au niveau du diamètre de dégradation du polygalacturonate par rapport aux souches sauvages, *ompR* et *envZ* (Données non présentées). Aucune différence n'est visible pour les autres facteurs de virulence.

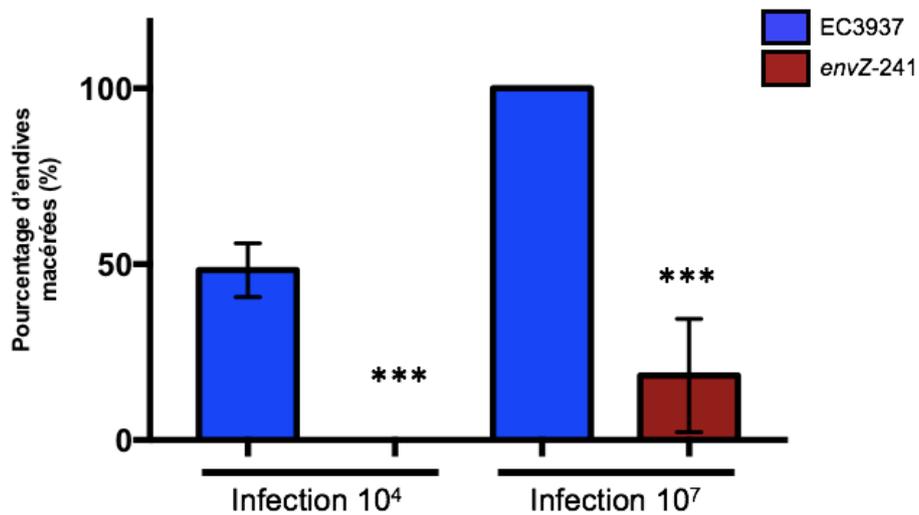


Figure 43 : Pathogénicité sur feuilles d’endives des souches sauvage et *envZ-241* à des concentrations bactériennes de 10⁴ et 10⁷ bactéries.

Vingt feuilles d’endives sont inoculées avec 10⁴ et 10⁷ bactéries de la souche sauvage et *envZ-241*. L’apparition de la macération est observée suite à une incubation à 30°C pendant 120H. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage (***) p < 0,001).

Ces données semblent indiquer qu’une régulation fine de l’activité du phosphorelais EnvZ/OmpR est importante et nécessaire pour permettre le bon déroulement du processus infectieux, une suractivation du système étant plus néfaste que son inactivation.

3.3. Le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important durant les premières étapes de l’infection.

Nous avons montré ci-dessus que le phosphorelais EnvZ/OmpR joue un rôle important lors du processus infectieux et qu’une suractivation du système entraîne un effet délétère sur la virulence. Le phosphorelais EnvZ/OmpR, comme tous les autres, doit donc être très finement régulé afin de permettre à la bactérie de contrer efficacement les défenses de son hôte et ainsi entamer sa colonisation. En 2015, Bontemps-Gallo et ses collaborateurs montrent, par la technique du PhosTag *in planta*, que le phosphorelais CpxAR est activé lors des étapes précoces de l’infection en réponse aux défenses de la plante. Une fois la macération étendue, le système est inactivé et retourne ainsi à un niveau de phosphorylation basal. Nous nous sommes donc demandé quel était la chronologie d’activation du phosphorelais EnvZ/OmpR lors de l’infection.

Pour comprendre la chronologie *in planta*, un PhosTag est réalisé à partir de bactéries extraites de feuilles d’endives macérées après 24H, 48H et 72H d’infection à 30°C. Étant

donné que les endives sont inoculées avec des bactéries cultivées en LB jusqu'en phase stationnaire, la phosphorylation avant inoculation est observée dans ces mêmes conditions. Une fois extraites, les bactéries sont lysées par sonication et 100 µg de lysats cellulaires sont déposés sur un gel PhosTag™. Avant inoculation dans la feuille d'endive, le régulateur OmpR présente un taux de phosphorylation de 7,5%. Cette proportion d'OmpR phosphorylé augmente durant les premières heures de l'infection avec une quantité d'OmpR phosphorylé aux alentours de 13% à 24H d'incubation. Suite à cette hausse est observée une baisse importante du niveau de phosphorylation à 48H et 72H avec des taux inférieurs à 7,5% (3,5% et 5,1% respectivement) (Figure 44).

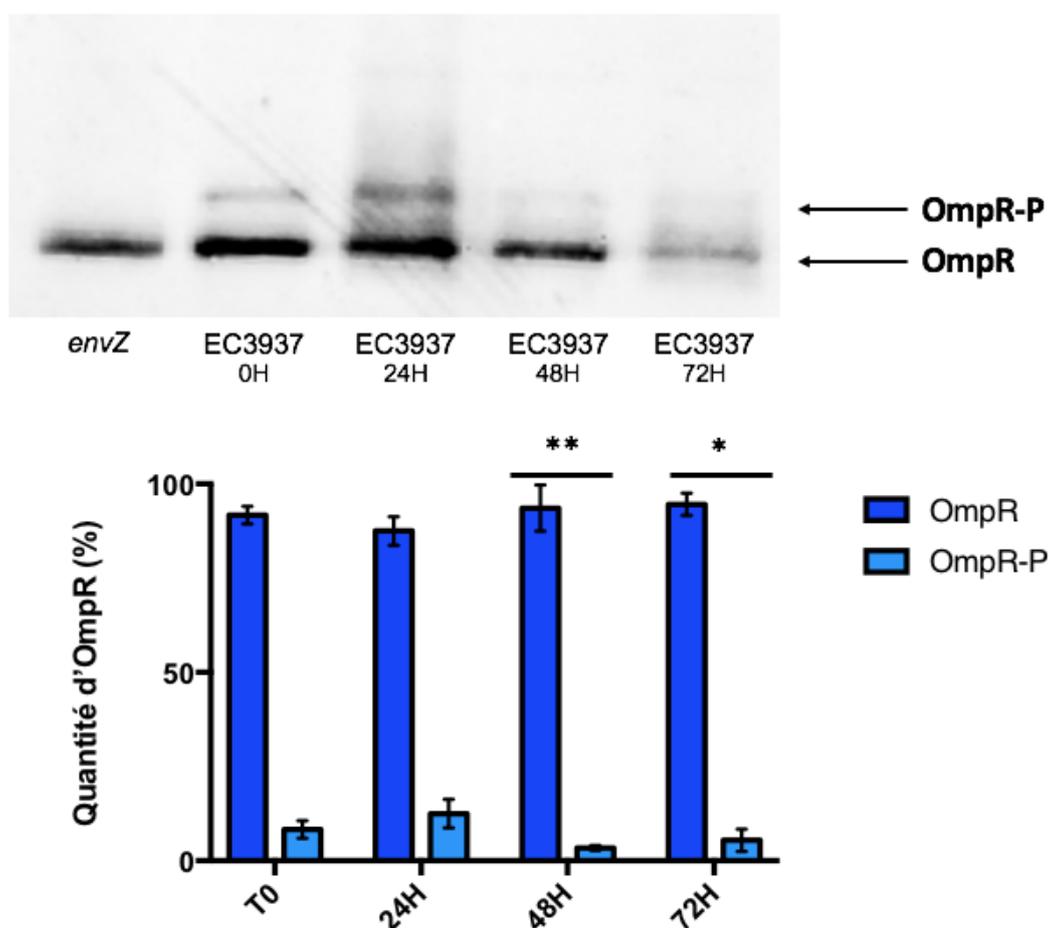


Figure 44 : Quantification des protéines OmpR et OmpR-P par PhosTag *in planta*

Les macérations des feuilles d'endives causées par l'inoculation de la souche sauvage à 10^7 bactéries sont extraites à 24H, 48H et 72H. Les souches sauvage et *envZ* sont cultivées en milieu LB en tant que témoins. 100 µg des lysats cellulaires sont déposés sur gel polyacrylamide 10% PhosTag 35 µM. Le Western blot est effectué grâce à un anticorps dirigé contre le régulateur OmpR. Les proportions d'OmpR phosphorylée ou non sont déterminées à l'aide du logiciel Fusion. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec la souche sauvage à 24H d'incubation (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ces données semblent donc indiquer que le phosphorelais EnvZ/OmpR est activé à un stade précoce de l'infection. Couplées aux données *in vivo* obtenues ci-dessus, cela peut nous amener à penser qu'EnvZ/OmpR joue un rôle prépondérant contre les défenses de l'hôte. En effet, cette dernière engendre pour la bactérie un stress acide (Jiang *et al.*, 2016), stress auquel le phosphorelais répond. La baisse de phosphorylation observée à 48H et 72H laisse supposer que la bactérie a gagné contre les défenses de l'hôte. De ce fait, elle peut commencer sa colonisation.

Toutefois, certains phosphorelais ne répondent pas à un seul et unique stress mais à plusieurs. Il se peut donc que l'interprétation du pH de la plante en fonction de l'activité du phosphorelais OmpR ne soit pas bonne, d'autres stimuli pouvant moduler également son activité. Nous avons alors voulu savoir comment évoluaient le pH et l'osmolarité dans l'environnement de la bactérie au cours du processus infectieux.

Tout d'abord, le pH *in planta* est mesuré grâce à une électrode pH MicroOrion™ (ThermoScientific). Les mesures sont réalisées à 0H, 24H, 48H et 72H au lieu d'incision dans des feuilles endives infectées et non infectées. Au moment de l'incision permettant le dépôt bactérien, le pH est aux alentours de 7,5. Le lieu de l'incision s'acidifie durant les premières 48H d'infection jusqu'à un pH d'environ 6,2 pour ensuite s'alcaliniser pour revenir à un pH de 7,3 (72H après infection) (Figure 45). Alors qu'une variation du pH est visible lors de l'infection, ce n'est pas le cas dans les endives non infectées où le pH est stable durant les 72H après l'incision (pH entre 7 et 7,3) (Figure 45).

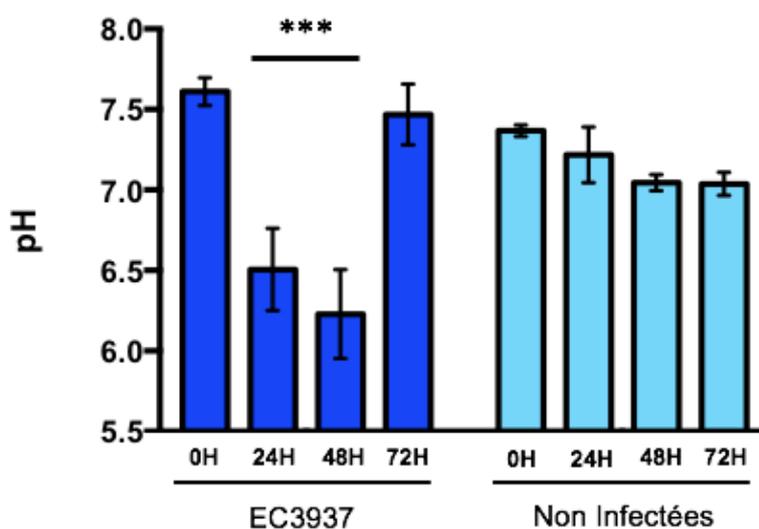


Figure 45 : Mesure du pH dans des endives infectées ou non à 0H, 24H, 48H, 72H.

Huit feuilles d'endives sont incisées au scalpel stérile puis infectées ou non avec la souche sauvage EC3937 à une concentration de 10^7 bactéries. A différents temps (0H, 24H, 48H et 72H), le pH est mesuré grâce à une électrode pH MicroOrion™ (ThermoScientific) au niveau du lieu de l'incision. Les

données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec le pH à 0H (***) $p < 0,001$).

Après les mesures de pH, le degré d'osmolarité est également observé. Pour cela, 50 μ L d'extrait de macération sont récupérés au voisinage du lieu d'incision à différents temps. On observe avant infection une osmolarité dans la feuille d'endives aux alentours de 310 mOsm. Alors que nous nous attendions à observer une hausse de l'osmolarité consécutive à la lyse des cellules végétales provoquées par les PCDWE sécrétées par *D. dadantii*, ce n'est pas le cas. En effet, on observe que, quel que soit le temps d'infection, l'osmolarité reste constante dans la plante avec une moyenne aux alentours de 250 mOsm (Figure 46).

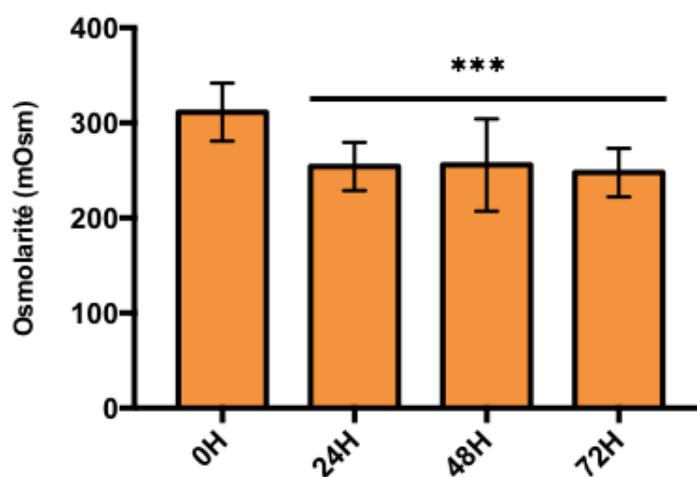


Figure 46 : Mesure de l'osmolarité dans des endives infectées à 0H, 24H, 48H, 72H.

Seize feuilles d'endives sont incisées au scalpel stérile puis infectées avec la souche sauvage EC3937 à une concentration de 10^7 bactéries. A différents temps (0H, 24H, 48H et 72H), 50 μ L de macération sont récupérés au niveau du lieu d'incision et l'osmolarité est mesurée grâce à l'osmomètre Roebbling Type 13. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'hypothèse de départ était que, lors de son entrée dans l'hôte, la bactérie rencontrait un environnement acide et de basse osmolarité pour ensuite évoluer dans un milieu à pH 7/8 et à haute osmolarité. Or nos travaux indiquent que ce n'est pas le cas avec l'hôte modèle *C. intybus*. Effectivement, ces données montrent bien une acidification durable s'étalant sur les 48h premières heures d'infection. En revanche, l'osmolarité reste constante tout du long de l'infection. Couplées aux données de phosphorylation d'EnvZ/OmpR, ces résultats semblent indiquer que le système répond aux variations de pH mais également à un ou plusieurs autres stimuli indéterminés permettant une répression de son activité aux alentours de 48H.

3.4. Une fois installé, le profil des porines OmpF1 et OmpF2 ne varie plus lors de l'infection de la plante.

Le phosphorelais EnvZ/OmpR réagit au pH acide mais semble également répondre à d'autres stimuli non identifiés, entraînant un profil de phosphorylation *in planta* différent de celui observé *in vivo*. Je me suis donc questionnée sur la régulation des porines OmpF1 et OmpF2 *in planta*. Ces dernières présentent-elles un profil dépendant de l'activité d'OmpR uniquement ou un profil différent causé par l'intervention d'autres régulateurs ? Afin de vérifier cela, un gel de porines est réalisé en parallèle du PhosTag *in planta*. Les bactéries localisées dans la macération des feuilles d'endive à 24H, 48H et 72H sont extraites puis lysées afin d'en extraire les protéines membranaires. 150 µg d'extraits protéiques sont déposés sur un gel acrylamide 12% qui est ensuite coloré au bleu de Coomassie. Alors que l'on s'attendait à observer une différence de la concentration des porines en réponse aux stress subis lors du processus infectieux, l'expression des porines est stable quel que soit le moment de l'infection : on observe une expression d'OmpF1 et d'OmpF2 constante durant toute l'infection (Figure 47).

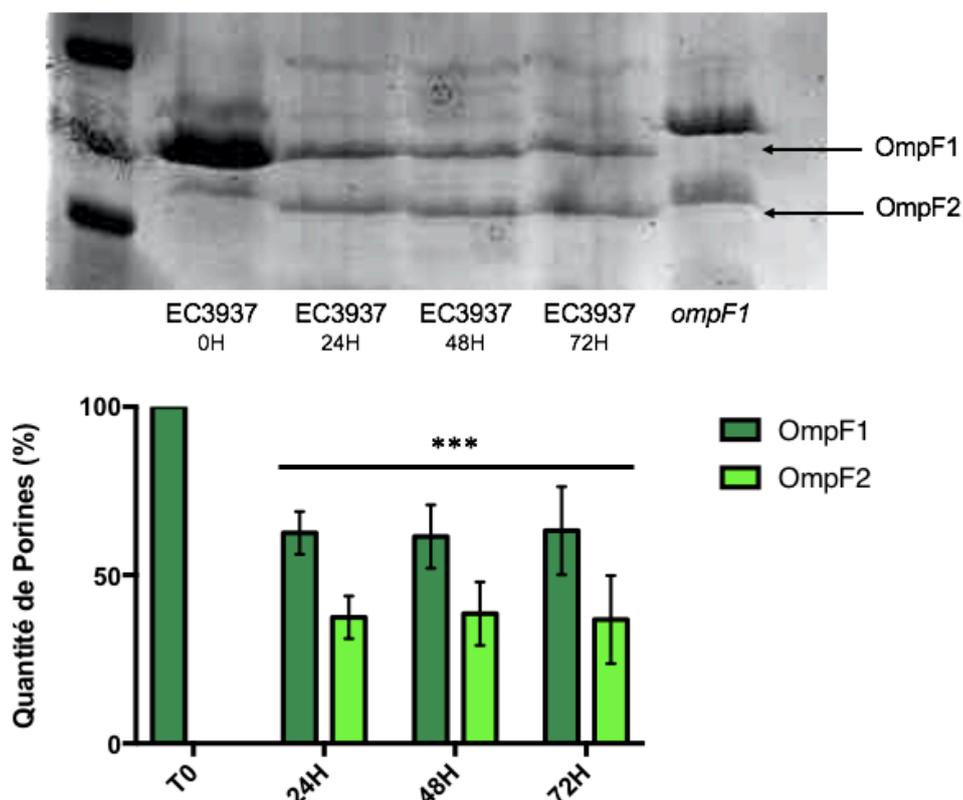


Figure 47 : Profil des porines OmpF1 et OmpF2 *in planta*

Les macérations des feuilles d'endives causées par l'inoculation de la souche sauvage sont extraites à 24H, 48H et 72H. La souche *ompF1* est utilisée en tant que témoin. 150 µg d'extraits protéiques sont déposés sur gel polyacrylamide 12%. Les profils protéiques sont révélés par coloration au bleu de

Coomassie. Les proportions de protéines sont déterminées à l'aide du logiciel ImageJ. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le symbole astérisque* indique une différence significative avec les quantités de porines détectées à T0 (** $p < 0,001$).

Ces données montrent que le profil des porines n'est pas en adéquation avec l'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR. L'activité du phosphorelais diminue tout au long du processus infectieux tandis que le profil protéique ne varie pas avec une quantité constante des porines OmpF1 et OmpF2. Cette constatation nous amène à penser que des régulateurs globaux ou phosphorelais autre que le système EnvZ/OmpR interviennent dans la régulation de ces porines, probablement afin de maintenir l'intégrité de la membrane externe et ainsi permettre la survie de la bactérie.

3.5. Discussion

Lors de l'étude de la relation entre le phosphorelais EnvZ/OmpR et les OPG, nous avons pu observer que la délétion d'EnvZ/OmpR n'affecte pas le phénomène de virulence que cela soit au niveau de l'apparition de la pourriture molle ou au niveau de la chronologie de la maladie. EnvZ/OmpR étant un phosphorelais essentiel à la perception de plusieurs facteurs environnementaux comme le pH, il nous semblait étonnant que ce dernier ne joue pas un rôle important dans l'adaptation de la bactérie à son hôte. De plus, EnvZ/OmpR est essentiel à la virulence de certaines espèces comme *Yersinia pestis* (Bontemps-Gallo *et al.*, 2019). Ces réflexions nous ont amenés à nous focaliser plus spécifiquement sur le rôle du phosphorelais durant l'infection.

Les tests de pathogénicité effectués au laboratoire sont habituellement réalisés à fort inoculum bactérien afin de combattre efficacement les défenses de la plante et ainsi déterminer les gènes essentiels à une pleine virulence. Cette technique ne permet pas de déterminer les gènes ayant un rôle plus subtil, ce qui expliquerait le faible nombre de phosphorelais considérés comme impliqués dans le processus infectieux. Des tests à faible inoculum bactérien sont réalisés sur la souche sauvage ainsi que sur les différents mutants. Alors qu'aucune différence n'était visible à fort inoculum, les mutants *envZ* et *ompR* affichent une baisse de 30 % du pourcentage d'infection comparativement à la souche sauvage (Figure 40). Sachant qu'OmpR est essentiel à l'activation de la transcription du gène *ompF1*, le mutant est également testé et montre une diminution du pourcentage d'infection semblable aux mutants *envZ* et *ompR* (Figure 40). Puisque que nous avons montré précédemment dans cette étude que l'absence d'OmpF1 est compensée par d'autres porines comme GanL, nous pouvons nous interroger sur un rôle autre que le passage de solutés pour cette porine. Chez certaines bactéries zoopathogènes, certaines porines possèdent un rôle d'adhésine et permettent donc l'attachement à l'hôte. C'est le cas des porines OmpF et OmpC chez les

E. coli APEC ou encore OmpD chez *S. enterica* sv *typhimurium* (Hejair *et al.*, 2017 ; Hara-Kaonga et Pistole, 2004). Nous pouvons nous interroger sur un possible rôle d'OmpF1 dans l'adhésion. Des premiers tests d'adhésion sur graines de luzerne et sur lentilles ont été effectués. Les premiers résultats obtenus montrent une baisse d'un facteur 10 du nombre de mutants *ompF* ayant adhéré aux graines de luzerne comparativement à la souche sauvage. Ce test a pour le moment été réalisé une seule fois. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Nous montrons donc ici un effet de l'inactivation du système EnvZ/OmpR sur le phénomène de virulence dû certainement à l'inactivation de gènes cibles jouant un rôle dans les premières étapes de l'infection comme l'adhésion ou encore la motilité (Figures 19 ; 20). Cette inactivation peut toutefois être considérée comme extrême car l'entièreté du phosphorelais est inactivée par l'absence d'un des deux composants du système. Dans la littérature, il est décrit qu'une régulation fine des gènes cibles passe par une activation minutée du phosphorelais, cette activation étant traduite par son état de phosphorylation. C'est pour cette raison que l'étude des mutants non phosphorylable et constitutivement phosphorylé est réalisée. Le mutant non phosphorylable *ompR-55*, dans lequel l'aspartate récepteur du phosphate a été modifié en asparagine, présente des phénotypes semblables à ceux obtenus dans une souche *envZ* ou *ompR* (Figure 42). Le mutant *envZ-241*, présentant une phosphorylation constitutive du régulateur, montre des phénotypes différents. Tout d'abord, la mutation EnvZ-V241G provoque une baisse de la sécrétion de pectinases ainsi qu'une perte de virulence à fort inoculum (Figure 43). Cependant, de façon assez étonnante, la perte de virulence n'est pas totale avec l'apparition de macération avancée sur 18% des feuilles d'endives infectées. Ces résultats suggèrent donc que la suractivation du phosphorelais EnvZ/OmpR provoque des conséquences plus importantes sur le processus infectieux que son inactivation. Ces données montrent une nouvelle fois que l'activation du phosphorelais doit être parfaitement minutée. L'activation doit avoir lieu à des moments clés, l'activation prolongée ou trop importante du système pouvant provoquer des conséquences néfastes sur la virulence ou encore la survie bactérienne.

Sachant que le phosphorelais EnvZ/OmpR est important dans le processus infectieux, nous nous sommes focalisés sur son activité *in planta*. Le phosphorelais joue un rôle considérable lors des premières étapes de l'infection. En effet, au bout de 24H, une hausse de la phosphorylation du régulateur est visible avec un taux de phosphorylation aux alentours de 13%. Ce taux diminue ensuite pour atteindre 4-5% à 48H (Figure 44). Afin de mieux comprendre ces observations, les paramètres pH et osmolarité ont été vérifiés dans notre plante hôte tout au long du processus infectieux. Alors que le pH passe de 6,5 en début à 7,5 en fin d'infection, l'osmolarité, elle, ne varie pas et reste aux alentours de 250 mOsm (Figures 45/46). Si l'on compare les données *in vivo* et les données *in planta*, nous pouvons voir une

phosphorylation à 24H semblable à celle observée à pH6. En revanche à 48H, alors que la bactérie se situe toujours dans un environnement à pH6,5, le taux de phosphorylation d'OmpR diminue. Cela laisse penser à la présence d'un stimulus supplémentaire jouant sur l'activité du système comme la carence nutritionnelle. En effet, il est possible que la disponibilité en nutriments soit différente en début et en fin d'infection avec la lyse des cellules végétales. Parallèlement à cela, bien que le phosphorelais EnvZ/OmpR régule les porines OmpF1 et OmpF2 en fonction du pH, le profil protéique de la membrane externe ne varie pas. Cela laisse supposer une régulation par d'autres régulateurs globaux ou phosphorelais permettant un maintien de ces deux porines majeures de la membrane externe.

Discussion Générale et Perspectives

Les bactéries comme *Dickeya dadantii* rencontrent tout au long de leur vie des environnements multiples et variés. Elles sont confrontées à de nombreuses variations environnementales et subissent notamment des stress multiples (acide, osmotique, oxydatif ...). Par conséquent, il est indispensable que la bactérie puisse s'adapter à ces modifications afin de pouvoir y survivre.

Les phosphorelais constituent le mécanisme de transduction du signal le plus répandu chez les procaryotes. Ils possèdent un rôle prépondérant dans la perception et l'adaptation à l'environnement. Présents chez la grande majorité des bactéries, ces phosphorelais peuvent présenter des différences majeures selon les espèces que ce soit au niveau des stimuli ressentis ou du régulon modulé.

Le système EnvZ/OmpR est l'un des phosphorelais les plus étudiés par son implication dans la régulation des gènes de porines. Découvert chez *E. coli*, ce système est principalement étudié chez les bactéries zoonopathogènes comme *Yersinia enterocolitica*, *S. enterica* sv *typhimurium* ou encore *Shigella flexneri* (Raczkowska et Brzostek, 2004 ; Perkins *et al.*, 2013 ; Bernardini *et al.*, 1990). D'abord, très peu étudié chez les phytopathogènes, cela semble se développer ces dernières années comme sur *Erwinia amylovora* (Li *et al.*, 2014). Toutefois, quelle que soit l'espèce, EnvZ/OmpR joue un rôle important dans la régulation de nombreux gènes cibles notamment de gènes de virulence ce qui en fait un régulateur clé dans les réseaux de régulation.

Les OPG, composants majeurs du périplasme, jouent un rôle important dans l'activation et la modulation du système RcsCDB ce qui nous a amené à nous intéresser aux relations entre les OPG et EnvZ/OmpR (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013). Nous montrons que l'activité du système EnvZ/OmpR dépend de la présence des OPG sans pour autant être modulée par leur concentration (Figures 23 / 26). En nous basant sur l'expression minimale des deux gènes rapporteurs *ompF* et *kdgN* en condition *opgG* (Figure 23), nous avons conclu que le système EnvZ/OmpR est inactivé en absence d'OPG. Toutefois, les analyses effectuées par la suite sur la porine OmpF1 nous amènent à réviser notre position. En effet, nous montrons ci-dessus qu'une hausse du taux de phosphorylation d'OmpR est corrélée à une diminution de la quantité de porines OmpF1 (Figures 35 / 36), laissant penser à une suractivation du système EnvZ/OmpR dans une souche dépourvue en OPG et non à une inactivation du phosphorelais. Nous montrons également dans un mutant surphosphorylé OmpR une perte de la sécrétion de pectinases (Données non présentées). Or, quand le phosphorelais EnvZ/OmpR est inactivé dans un contexte *opgG*, une restauration de la sécrétion des pectinases est visible (Figure 18B). Cela laisse donc penser que, dans une souche *opgG*, la perte de sécrétion de pectinases est causée non pas par la suractivation du système RcsCDB comme cela était supposé mais par une suractivation du système

EnvZ/OmpR. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait donc intéressant de réaliser un PhosTag *in vivo* sur une souche *opgG* ce qui permettrait d'observer le taux de phosphorylation d'OmpR et ainsi conclure sur le rôle des OPG dans l'activation de ce système. Parallèlement à cela, nous pouvons nous questionner sur le mode d'action des OPG sur le système. Les OPG agissent-ils directement sur le phosphorelais ? Ou, au contraire, leur absence provoque-t-elle des modifications de l'enveloppe bactérienne, se répercutant de ce fait sur l'activité du système ?

Les OPG modulant l'activité du système EnvZ/OmpR, nous nous sommes focalisés sur d'autres stimuli potentiels de ce phosphorelais. Lorsque la bactérie entre dans son hôte, elle est confrontée à un nouvel environnement hostile. La fluctuation d'osmolarité et de pH sont deux des stress environnementaux les plus rencontrés par les bactéries lors du processus infectieux et sont connus tout deux comme modulant l'activité du phosphorelais EnvZ/OmpR (Heyde et Portalier, 1987 ; Mizuno et Mizushima, 1990). Chez *E. coli* comme chez *S. enterica* sv *typhimurium*, le phosphorelais est activé dans un milieu pH acide et/ou à haute osmolarité (Chakraborty et Kenney, 2018). Chez notre modèle *D. dadantii*, nous mettons en évidence une activation du phosphorelais uniquement en milieu à pH acide. En effet, aucune modulation de l'activité n'est visible lorsque l'osmolarité du milieu varie (Figure 30). Cela nous a semblé très surprenant, le phosphorelais EnvZ/OmpR étant principalement décrit pour sa réponse à l'osmolarité de l'hôte. En suivant celle-ci lors du processus infectieux, nous avons pu observer qu'elle est stable que l'on soit en début ou en fin d'infection alors que nous pensions que la lyse des cellules végétales entraînait une hausse de ce paramètre, (Figure 46). Cette observation effectuée sur la feuille d'endive a été confirmée sur un autre modèle hôte : le tubercule de pomme de terre qui présente une osmolarité constante aux alentours de 350 mOsm tout du long de l'infection (Données non présentées).

Parallèlement, nous montrons une activation *in planta* du phosphorelais EnvZ/OmpR durant les premières étapes de l'infection. En effet, le taux de phosphorylation du régulateur OmpR augmente durant les premières 24H pour ensuite redescendre à un niveau basal. Cette activation n'est pas en adéquation avec ce que l'on observe *in vivo*. A 24H, le pH *in planta* est de 6,5. A ce pH, le niveau d'activation d'OmpR est de 13% ce qui correspond à un niveau intermédiaire à ce que l'on observe à pH6 et pH7 *in vivo* (Figures 35 / 44 / 45). En revanche, à 48H, une diminution de la phosphorylation du régulateur OmpR est visible alors que le pH dans la plante reste aux alentours de pH6,5 (Figures 44 / 45). Nous pouvons nous interroger sur la présence d'un autre stress *in planta* entraînant une modulation du système EnvZ/OmpR. Nous pensons que ce stress pourrait être la carence nutritionnelle. En effet, la bactérie peut être confrontée lors du processus infectieux à des concentrations variables en nutriments. On peut logiquement penser qu'au début de l'infection, la bactérie a peu de nutriments à sa disposition. Puis, lors de la lyse des cellules végétales et donc du déversement du contenu

intracellulaire, la disponibilité en nutriments augmente fortement. Ce stress étant un stimulus activateur d'EnvZ/OmpR connu chez *E. coli* (Liu et Ferenci, 1998), il serait intéressant d'observer la phosphorylation du régulateur OmpR par PhosTag *in vivo* lors du passage d'un milieu minimum complétement en glycérol à un milieu minimum non complétement.

Chez *E. coli*, le phosphorelais EnvZ/OmpR régule plus d'une centaine de gènes cibles (Oshima *et al.*, 2002). Parmi ces gènes sont retrouvés les gènes codant les deux porines majeures de la bactérie *ompF* et *ompC* ainsi que des gènes impliqués dans le phénomène de virulence comme l'opéron maître de la motilité *flhDC* (Shin et Park, 1995 ; Huang et Igo, 1996). Durant cette étude, nous nous sommes intéressés à certains gènes cibles du phosphorelais chez *D. dadantii*. Pour commencer, la régulation de deux facteurs importants de la virulence par le régulateur OmpR est mise en évidence. Nous montrons tout d'abord que le phosphorelais EnvZ/OmpR est impliqué dans le phénomène de motilité en jouant un rôle activateur sur l'opéron maître *flhDC* (Figure 20). L'implication du système dans la sécrétion de pectinases est également mise en évidence grâce au mutant constitutivement phosphorylé *envZ-241* qui présente une perte de sécrétion de pectinases (Données non présentées). Le régulateur OmpR semble jouer un rôle de répresseur sur un ou plusieurs gènes intervenant dans la voie de dégradation du polygalacturonate. Ces données confirment le rôle du phosphorelais EnvZ/OmpR durant les premiers stades de l'infection notamment en réprimant les facteurs essentiels de la phase symptomatique.

Le régulateur EnvZ/OmpR est un élément essentiel dans la régulation des porines de la membrane externe chez de très nombreuses espèces. Ces porines, variables selon les espèces, ont une importance capitale dans l'ajustement de la composition de la membrane externe et de ce fait dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne. Les porines OmpC et OmpF sont les deux porines les plus étudiées pour leur régulation chez *E. coli* par le système EnvZ/OmpR (Mizuno et Mizushima, 1990). Ces porines intervenant dans la diffusion passive de petites molécules hydrophiles diffèrent par leur taille de pore et leur vitesse de diffusion (Decad et Nikaido, 1976). Alors que la porine OmpF est retrouvée chez toutes les espèces bactériennes, la porine OmpC n'apparaît que chez certaines espèces. En effet, cette porine n'est retrouvée ni chez le genre *Dickeya* ni chez les genres proches tels que *Pectobacterium* ou *Pantoea* (Tableau 2). Les études phylogénétiques effectuées mettent en avant chez le genre *Dickeya* la présence d'une seconde porine qui semble provenir d'un événement de duplication du gène *ompF1*. Cette porine nommée OmpF2 est exprimée *in vivo* lorsque la bactérie est confrontée à un stress acide. Sa régulation se fait à l'inverse de la porine OmpF1 dont l'expression protéique est diminuée dans un milieu à pH acide (Figure 36). Cette régulation est similaire au mécanisme OmpF/OmpC chez *E. coli*.

Alors que l'expression protéique des porines OmpF1 et OmpF2 varie en fonction de du pH, elle ne varie pas selon l'osmolarité (Figure 33). Quelque que soit cette dernière, OmpF1 est pleinement exprimée tandis qu'OmpF2 est à son niveau d'expression minimal. En revanche, au niveau transcriptionnel, le gène *ompF1* est modulé en fonction de l'osmolarité. Nous montrons dans cette étude que l'activité des deux phosphorelais RcsCDB et EnvZ/OmpR varie très peu à basse et haute osmolarité avec seulement 4 à 5% de différence du taux de phosphorylation (Figure 30). Nous montrons également que les deux phosphorelais sont capables de se fixer en amont des régions régulatrices des gènes *ompF1* mais aussi *ompF2* (Figures 29/38), ce qui peut nous amener à penser qu'il existe une coopération entre les régulateurs OmpR et RcsB dans la régulation de ces gènes. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre cette régulation. Les données obtenues lors des expériences de retards sur gel nous indiquent que la régulation de ces deux gènes *ompF* semblent se faire directement par fixation de la protéine OmpR sur les séquences en amont des promoteurs (Figures 29 / 38). Alors que les sites de fixation de la protéine OmpR sont bien identifiés chez *E. coli*, il est très difficile de les définir chez *D. dadantii*. Deux sites présentant des fortes homologies avec les sites C1 et C3 sont visibles en amont du gène *ompF1* (Figure 27). Cependant, aucune séquence similaire aux boîtes de fixation d'*E. coli* n'est présente dans la séquence régulatrice d'*ompF2* (Données non présentées). Il pourrait être intéressant pour la suite de localiser les sites de fixation d'OmpR par la technique d'empreinte à la DNase mais également de situer les sites de fixation de RcsB afin de voir si les deux régulateurs se fixent au même niveau. Le suivi de l'expression d'autres gènes cibles des deux phosphorelais en fonction de l'osmolarité pourrait également être intéressant afin de voir si le peu de différence visible à basse et haute osmolarité est suffisante pour induire un effet sur la modulation de ces gènes.

Pour finir, lors des études réalisées *in planta*, nous montrons que le profil protéique des porines OmpF1 et OmpF2 ne varie pas lors de l'infection (Figure 44). Les proportions restent les mêmes que l'on soit en début ou en fin du processus infectieux ce qui semble indiquer une régulation très stricte de ces deux porines. Cela laisse penser que d'autres régulateurs globaux ou d'autres phosphorelais tels que CpxAR interviennent dans cette régulation pour permettre entre autres un maintien de l'intégrité membranaire essentielle à la survie de la bactérie. Il serait intéressant par la suite de comprendre le rôle de ces deux porines dans la bactérie. Laissent-elles passer le même type de molécules que chez *E. coli* ? Ces deux porines montrent-elles une variation dans leur taille de pore comme OmpC et OmpF ? Très peu d'études sur la modification des porines à pH acide ont été menées. Todt et ses collaborateurs suggèrent qu'une modification de la taille des canaux des porines pourrait se produire lors d'une variation de pH. Ils suggèrent plus particulièrement une diminution de la taille de canaux dans un environnement acide (Todt *et al.*, 1992).

Le travail que j'ai effectué durant ma thèse permet donc d'appréhender le système EnvZ/OmpR chez *D. dadantii* par l'analyse de ses stimuli, de son régulon ou encore de son interaction avec les OPG. De nombreuses questions restent cependant en suspens notamment concernant l'activation du système par d'autres stimuli et la régulation des porines OmpF1 et OmpF2 par d'autres phosphorelais. Cette étude nous montre une nouvelle fois que l'adaptation de la bactérie à son environnement repose sur un important et complexe réseau de régulation qui se met en place suite à de multiples stress. Les phosphorelais comme EnvZ/OmpR, éléments essentiels de ce réseau, nécessitent une régulation fine de leur phosphorylation. Avoir une phosphorylation adéquate à un instant T semble important pour le fitness, le métabolisme ou encore la virulence de la bactérie. Quelques pourcentages de différence dans le taux de phosphorylation peuvent causer un déséquilibre dans la régulation avec pour conséquence une modification dans la modulation des gènes cibles. Un des problèmes majeurs des phosphorelais est l'absence de connaissance concernant leur dynamique de phosphorylation. Établir la dynamique de phosphorylation de l'ensemble de 32 phosphorelais de *D. dadantii* et étudier les variations des paramètres physico-chimiques ou les mécanismes de la plante au cours de l'infection serait intéressant pour permettre une meilleure compréhension de la pathogenèse de notre bactérie hôte *D. dadantii*.

Procédures Expérimentales

1. Souches, Plasmides et Milieux

1.1. Génotypes des souches et des plasmides utilisés

Les génotypes des souches et les plasmides utilisés durant cette étude sont décrits dans le tableau 3.

Souches de <i>Dickeya dadantii</i>		
EC3937	Sauvage	Collection du laboratoire
NF3723	<i>opgG</i> :: Cm	Collection du laboratoire
NF3835	miniTn5-Sp P _{BAD} opgGH	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2013
NF7199	<i>rcsB</i> :: Cm	Bouchart <i>et al.</i> , 2010
NF7422	<i>ompR</i> :: Gm	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2016
NF7423	<i>ompR</i> :: Gm , <i>opgG</i> :: Cm	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7440	<i>ompR</i> :: Gm , miniTn5-Sp P _{BAD} opgGH	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7515	<i>cpxA</i> :: Gm	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2015
NF7521	<i>envZ</i> :: Gm	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2016
NF7524	<i>envZ</i> :: Gm , <i>opgG</i> :: Cm	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7532	<i>cpxR</i> :: Gm	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2015
NF7534	<i>cpxR</i> :: Gm , <i>opgG</i> :: Cm	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7632	<i>cpxA</i> :: Gm , <i>opgG</i> :: Cm	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7731	<i>envZ</i> :: Gm , miniTn5-Sp P _{BAD} opgGH	Caby <i>et al.</i> , 2018
NF7850	miniTn5-Sp <i>ompR</i> -55 ; <i>ompR</i> :: Gm	Cette étude
NF7894	<i>ompF2</i> :: Gm	Cette étude
NF7895	<i>ompF1</i> :: Kan	Cette étude
NF7896	<i>ompF1F2F3</i> :: Kan	Cette étude
NF7897	<i>ompF1F2</i> :: Gm	Cette étude
NF7898	<i>ompF2F3</i> :: Kan	Cette étude
NF7899	<i>ompF3</i> :: Gm	Cette étude
NF7906	<i>ompF1</i> :: Kan ; <i>ompF3</i> :: Gm	Cette étude
NF7911	miniTn5-Sp <i>ompR-envZ</i> T247R ; <i>ompR</i> :: Gm	Cette étude
NF7916	pUTminiTn5-Sp <i>ompR-envZ</i> V241G ; <i>ompR</i> :: Gm	Cette étude
Souches d'<i>E. coli</i>		
BL21	<i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Invitrogen
S17-1λPir	<i>recA1</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M+, RP4:2-Tc::Mu-Kan::Tn7, λpir	De Lorenzo et Timmis, 1994
Top10F'	F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrB</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <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
Plasmides		
pET100/D-Topo	Amp ^R	Life Technologies

pUC18Not	Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUTminiTn5-Sp	Sp ^R , Amp ^R	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pNFW410	pET100 <i>rscB</i>	Madec <i>et al.</i> , 2014
pNFW444	pET100 <i>cpxR</i>	Collection du laboratoire
pNFW480	pET100 <i>ompR</i> (<i>D. dadantii</i>)	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2016
A446-1B	pET100 <i>ompR</i> (<i>E. coli</i>)	E-Zyvec
pl. 214.2	pUC18Not <i>ompR-envZ</i>	Cette étude
pl. 225.2	pUC18Not <i>ompRD55N-envZ</i>	Cette étude
pl. 241.2	pUTminiTn5-Sp <i>ompRD55N-envZ</i>	Cette étude
pl. 265.1	pUC18Not <i>ompF3</i>	Cette étude
pl. 266.4	pUC18Not <i>ompF1</i>	Cette étude
pl. 267.8	pUC18Not <i>ompF2</i>	Cette étude
pl. 271.2	pUC18Not <i>ompF1 NheI</i> + K7 Kan <i>NheI</i>	Cette étude
pl. 272.4	pUC18Not <i>ompF2 HpaI</i> + K7 Gm <i>HpaI</i>	Cette étude
pl. 273.2	pUC18Not <i>ompF1ompF2</i>	Cette étude
pl. 274.2	pUC18Not <i>ompF2ompF3</i>	Cette étude
pl. 275.3	pUC18Not <i>ompF1ompF2ompF3</i>	Cette étude
pl. 280.1	pUC18Not <i>ompF1ompF2ompF3</i> délété entre deux sites <i>NheI</i> + K7 Kan <i>NheI</i>	Cette étude
pl. 281.1	pUC18Not <i>ompF1ompF2</i> délété entre les sites <i>NheI</i> et <i>HpaI</i> + K7 Gm <i>HpaI/NheI</i>	Cette étude
pl. 282.7	pUC18Not <i>ompR-envZ</i> T247R	Cette étude
pl. 283.8	pUC18Not <i>ompR-envZ</i> V241G	Cette étude
pl. 284.2	pUC18Not <i>ompF3 Nrul</i> + K7 Gm <i>HpaI</i>	Cette étude
pl. 285.1	pUC18Not <i>ompF2ompF3</i> délété entre deux sites <i>NheI</i> + K7 Kan <i>NheI</i>	Cette étude
pl. 286.3	pUTminiTn5-Sp <i>ompR-envZ</i> T247R	Cette étude
pl. 287.16	pUTminiTn5-Sp <i>ompR-envZ</i> V241G	Cette étude

Tableau 3 : Souches et plasmides utilisés lors de cette étude

Gm : gentamycine, Cm : chloramphénicol, Kan : kanamycine, Amp : ampicilline, Sp : spectinomycine, miniTn5 : mini transposon 5.

1.2. Milieux de culture, conditions de croissance et conservation des bactéries

Les bactéries sont cultivées à différentes températures selon l'espèce. Les souches d'*E. coli* sont incubées à 37°C sous une agitation de 140 rpm tandis que les souches de *D. dadantii* sont incubées à 30°C sous une agitation de 125 rpm. La croissance de ces bactéries est suivie par mesure de la turbidité à une longueur d'onde de 620 nm, une densité optique (DO) de 1 correspondant à 1 X 10⁹ bactéries/mL environ. Les bactéries sont conservées à -80°C dans du glycérol 25% pour *D. dadantii* et 20% pour *E. coli*.

Durant cette étude, de nombreux milieux sont utilisés. Leur composition est décrite ci-dessous :

- Le milieu LB ou Lysogeny Broth est un milieu complexe (Bertani, 2004)
- Le milieu M63 est un milieu minimum complétement par des métabolites nécessaires à la croissance des bactéries. Sont ajoutés au milieu une source de carbone à 0,2% ainsi que parfois des acides aminés et bases azotées à 40 mg/mL ou de la thiamine à 2 mg/mL. Durant cette étude, différentes quantités de NaCl seront ajoutées afin de faire varier l'osmolarité de 330 mOsm à 500 et 700 mOsm respectivement. Afin d'obtenir une osmolarité de 170 mOsm, le milieu M63 est dilué d'un facteur deux.
- Le milieu Bas-Phosphate est un milieu carencé en phosphate ce qui favorise la perte des plasmides introduits chez *D. dadantii* (Torriani, 1968). Il est composé de Tris HCl (120 mM), NaCl (90 mM), KCl (40 mM), NH₄Cl (21 mM), CaCl₂ (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), Na₂SO₄ (25 µM), KH₂PO₄ (0,5 mM) ainsi que 0,25% de bactopeptone. Le milieu est utilisé à pH7,4 et est complétement par une source de carbone à 0,2% ainsi que par l'antibiotique nécessaire.
- Le milieu PGA, permettant l'observation des pectinases, est un milieu minimum M63 auquel sont ajoutés 0,4% de polygalacturonate (PGA) ainsi que 0,2% de glycérol.
- Le milieu CMC, permettant l'observation des cellulases, est un milieu minimum M63 auquel sont ajoutés 0,2% de carboxyméthylcellulose (CMC) ainsi que 0,2% de glycérol et 7 mM de MgSO₄.
- Le milieu protéase permettant leur observation est un milieu LB complétement avec 1% de lait écrémé en poudre.

Tous ces milieux, hormis le Bas-Phosphate, peuvent être solidifiés par l'ajout d'agar à 1,5%. Un milieu fait exception : le milieu motilité qui est un milieu M63 faiblement gélosé par ajout de 0,4% d'agar.

Durant cette étude, de nombreux antibiotiques sont utilisés à des concentrations variables selon le type d'antibiotique et l'espèce bactérienne. Les antibiotiques pour *E. coli* sont ajoutés aux concentrations finales suivantes :

- Ampicilline (Amp) ; Kanamycine (Kan) : 50 µg/mL
- Chloramphénicol (Cm) ; Tétracycline (Tet) : 25 µg/mL
- Streptomycine (Str) ; Spectinomycine (Sp) : 100 µg/mL
- Gentamycine (Gm) : 4 µg/mL

Pour les souches de *D. dadantii*, la concentration d'antibiotiques utilisée est divisée par deux.

2. Techniques Génétiques

2.1. Transformation chimique d'*E. coli*

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

2.2. Électroporation de *D. dadantii*

L'électroporation est utilisée pour la construction de mutants par insertion de cassette de résistance aux antibiotiques chez *D. dadantii*. Les cellules de *D. dadantii* sont rendues compétentes et transformées par électroporation d'après Sambrook *et al.* (1989). Les bactéries sont sélectionnées sur milieu LB complété par l'antibiotique qui dépend de la cassette de résistance interrompant le gène d'intérêt. Les clones obtenus sont cultivés successivement en milieu Bas-Phosphate, milieu carencé en phosphate. Ce milieu va ainsi favoriser la perte de plasmides et permettre la recombinaison homologe (Torriani, 1968)

2.3. Conjugaison

La conjugaison est utilisée pour l'insertion des mini-transposons Tn5 contenant un fragment d'ADN dans le génome de *D. dadantii*. Les bactéries réceptrices de *D. dadantii* sont mises en contact avec les bactéries donatrices d'*E. coli*, possédant le plasmide pUT-mini-Tn5, selon un ratio de 1 : 10. La suspension est déposée sur boîte LB gélosé à 30°C. Après 1H d'incubation, les bactéries sont reprises dans du M63 et étalées sur du milieu M63 complété avec du saccharose 0,2% et l'antibiotique nécessaire à la sélection (résistance portée par le miniTn5). Les clones obtenus sont repiqués et seuls les clones sensibles à l'ampicilline (résistance du pUT) sont utilisés par la suite.

2.4. Transduction

Les transductions chez *D. dadantii* sont effectuées à partir du phage Φ EC2 d'après Résibois *et al.* (1984)

3. Techniques de Biologie Moléculaire

3.1. Extraction et purification d'ADN génomique, plasmidique et d'ARN

L'extraction des plasmides est effectuée à partir du kit Nucleospin® Plasmid (Macherey Nagel™) tandis que l'ADN génomique est extrait en utilisant le kit Nucleospin® Tissue (Macherey Nagel™).

Afin d'extraire les bandes d'ADN obtenues lors d'une électrophorèse, le kit Nucleospin® Gel & PCR Clean Up (Macherey Nagel™) est utilisé.

L'extraction d'ARN est effectuée à partir du kit Nucleospin® RNA plus (Macherey Nagel™).

3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les deux ADN polymérases utilisées sont la Q5® High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs™), choisie pour l'inactivation de gènes cibles, et la *OneTaq* DNA polymerase (New England Biolabs™), choisie pour vérifier l'insertion des mutations dans le génome. Ces deux enzymes sont utilisées selon les conditions standards préconisées par NEBiolabs™. Les PCR sont réalisées avec 100 ng d'ADN dans un volume de 50 µL pour la Q5 High-Fidelity Polymerase ou de 25 µL pour la *OneTaq* DNA polymerase.

3.3. Enzymes de restriction et de modification

Les endonucléases de restriction (New England Biolabs™) sont utilisées à raison de 10 U/µg d'ADN selon les recommandations fournies par l'entreprise. Les fragments obtenus suite à la digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1% dans du TAE (Tris 40 mM, acétate 20 mM, EDTA 1 mM, pH8,3) auquel est ajouté du SybrSafe® (dilution 1/10000^{ème}). Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le SmartLadder (Eurogentec™).

La FASTAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher Scientific™) permettant la déphosphorylation des plasmides est utilisée à raison de 1 U/µg d'ADN selon les conditions standard préconisées par le fournisseur.

La T4 DNA ligase (New England Biolabs) permettant la recircularisation des plasmides est utilisée dans le tampon fourni par NEBiolabs selon les conditions préconisées. La réaction a lieu pendant la nuit à 16°C.

3.4. Constructions des mutants

Les constructions sont réalisées chez *E. coli* puis sont insérées dans la souche EC3937 chez *D. dadantii* par électroporation. A cela s'ensuit des cultures successives en bas phosphate. Les différentes amorces utilisées durant les clonages sont répertoriées dans le tableau 4 (page 122).

3.4.1. Mutants *ompF1*, *ompF2* et *ompF3*

La PCR146, contenant le gène *ompF1*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 266.4). Une cassette de résistance à la kanamycine digérée par l'enzyme *NheI* est insérée au niveau d'un site *NheI* pour former le plasmide 271.2.

La PCR147, contenant le gène *ompF2*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 267.8). Un site *HpaI* est ajouté dans le gène grâce à une mutagenèse dirigée (PCR147*HpaI*) réalisée à partir du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB. Une cassette de résistance à la gentamycine digérée par l'enzyme *HpaI* est insérée au niveau de ce site pour former le plasmide 272.4.

La PCR145, contenant le gène *ompF3*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 265.1). Un site *NruI* est ajouté dans le gène grâce à une mutagenèse dirigée (PCR145*NruI*) réalisée à partir du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB. Une cassette de résistance à la gentamycine digérée par l'enzyme *HpaI* est insérée au niveau de ce site pour former le plasmide 284.2.

3.4.2. Mutants *ompF1F2*, *ompF2F3* et *ompF1F3*

La PCR148, contenant les gènes *ompF1* et *ompF2*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 273.2). Un site *HpaI* a été ajouté dans le gène *ompF2* grâce à une mutagenèse dirigée (PCR148*HpaI*) réalisée grâce au kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB. Le fragment situé entre les sites *NheI* du gène *ompF1* et *HpaI* du gène *ompF2* est délété pour permettre l'insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine digérée par les enzymes *HpaI/NheI* (pl. 281.1).

La PCR149, contenant les gènes *ompF2* et *ompF3*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 274.2). Un site *NheI* a été ajouté dans le gène *ompF2* grâce à une mutagenèse dirigée (PCR149*NheI*) réalisée grâce au kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB. Le fragment situé

entre les deux sites *NheI* des gènes *ompF2* et *ompF3* est délété pour permettre l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine digérée par l'enzyme *NheI* (pl. 285.1).

Afin de réaliser le mutant *ompF1ompF3*, le plasmide 284.2 contenant le gène *ompF3* interrompu par une cassette de résistance à la gentamycine est inséré dans une souche *ompF1* devenue compétente par électroporation.

3.4.3. Mutant *ompF1F2F3*

La PCR150, contenant les trois gènes *ompF*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 275.3). Le fragment situé entre les deux sites *NheI* du gène *ompF1* et du gène *ompF3* est délété pour permettre l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine digérée par l'enzyme *NheI* (pl. 280.1).

3.4.4. Mutant *envZ-241, envZ-247 et ompR-55*

La PCR127, contenant l'opéron *ompRenvZ*, est clonée dans un plasmide pUC18Not (pl. 214.2). Les différentes mutagenèses ont lieu sur ce plasmide. L'opéron muté obtenu est transféré sur le pUTminiTn5-Sp afin d'être introduit par la suite dans la souche NF7422 de *D. dadantii* par conjugaison hétérologue

La mutagenèse dirigée permettant le changement de la valine en glycine sur le gène *envZ* est effectuée par le biais du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB (PCR-V241G) formant le plasmides 282.7. L'opéron portant la mutation est ensuite inséré dans le vecteur pUTminiTn5-Sp formant ainsi le plasmide 286.3.

La mutagenèse dirigée permettant le changement de la thréonine en arginine sur le gène *envZ* est effectuée par le biais du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB (PCR-T247R) formant le plasmides 288.8. L'opéron portant la mutation est ensuite inséré dans le vecteur pUTminiTn5-Sp formant ainsi le plasmide 287.16.

La mutagenèse dirigée permettant le changement de l'aspartate en glutamate sur le gène *ompR* est effectuée par le biais du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis NEB (PCR-D55N) formant le plasmides 225.2. L'opéron portant la mutation est ensuite inséré dans le vecteur pUTminiTn5-Sp formant ainsi le plasmide 241.2.

Amorces utilisées lors des clonages			
PCR127	pUCOmpR- <i>Hind</i> -F	CATAAAGCTTCCACTTGCAGGCGTTTACGC	Cette étude
	pUCEnvZ- <i>Sac</i> -R	AACTGAGCTCGATCCGCGGACACCTATG	Cette étude
PCR145	ompF- <i>Sal</i> -F	GGATGTGACCCCTGGCGGAGTTCTGGAT	Cette étude
	ompF- <i>Xba</i> -R	AACGTCTAGAGCTACGACCAGTAAAGCTGTTG	Cette étude
PCR145 <i>Nru</i> I	ompF3- <i>Nru</i> I-F	TCGCGACTTGATAAATACGCTAGC	Cette étude
	ompF3- <i>Nru</i> I-R	TGCTTCATCATTTCGCATTAC	Cette étude
PCR146	ompF2- <i>Xba</i> -F	AACCTCTAGACCAATCGCTCCGAAACTCA	Cette étude
	ompF2- <i>Kpn</i> I-R	ATATGGTACCACTTCTTTCTGGCGGCAA	Cette étude
PCR147	ompF3- <i>Xba</i> -F	GGATTCTAGATGCATAAAGCCGAGGCATAG	Cette étude
	ompF3- <i>Kpn</i> I-R	AACGGGTACCTAAGAGCTGGCGACGACTAA	Cette étude
PCR147 <i>Hpa</i> I	ompF2- <i>Hpa</i> I-F	GTTAACGTAATATTCTGGCAGTGG	Cette étude
PCR148 <i>Hpa</i> I	ompF2- <i>Hpa</i> I-R	GCTTCATCATTATCAATACC	Cette étude
	F1F2- <i>Sal</i> -F	GGAAGTCGACGAACCGGAAGTGGCATTG	Cette étude
PCR148	F1F2- <i>Xba</i> -R	AACGTCTAGACCCATCAGCAGTCTCACATC	Cette étude
	F2F3- <i>Sal</i> -F	GGAAGTCGACCGAAACTCAAATTGCCGATGG	Cette étude
PCR149	F2F3- <i>Xba</i> -R	GTAATCTAGATAAGAGCTGGCGACGACTA	Cette étude
	ompF2- <i>Nhe</i> I-F	GCTAGCGTAATATTCTGGCAGTGG	Cette étude
PCR149 <i>Nhe</i> I	ompF2- <i>Hpa</i> I-R	GCTTCATCATTATCAATACC	Cette étude
	F1F2- <i>Sal</i> -F	GGAAGTCGACGAACCGGAAGTGGCATTG	Cette étude
PCR150	F2F3- <i>Xba</i> -R	GTAATCTAGATAAGAGCTGGCGACGACTA	Cette étude
	envZV241G-F	ATGGCCGGCGGCGAGCCACGAT	Cette étude
PCR-V241G	envZV241G-R	CAGCAGCGTACGGTCATCCGC	Cette étude
	envZT247R-F	GATCTGCGCAGGCGCCGCTGACC	Cette étude
PCR-T247R	envZT247R-R	GTGGCTGACGCCGGCCAT	Cette étude
	ompR-D55N-F	CCATCTGATGGTGCTGAATCTGATGTTGCCGGGG	Collection
PCR-D55N	ompR-D55N-R	CCCCGGCAACATCAGATTCAGCACCATCAGATGG	Collection

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées lors des différents clonages

3.5. qRT-PCR (quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Les ADNc sont rétrotranscrits en utilisant le kit Superscript IV First-Strand Synthesis (ThermoFisher Scientific) à partir des ARN, préalablement traités avec de la DNase I. Ces rétrotranscriptions sont effectuées selon les instructions du fabricant. La qPCR est réalisée en utilisant la méthode SYBR Green décrit par Hommais et ses collaborateurs en 2011. Les amorces utilisées sont regroupées au sein du tableau 5. Le gène *ipxC*, codant une UDP-N-acétylglucosamine désacétylase, est utilisé en tant que gène de référence (Hommais *et al.*, 2011).

Amorces utilisées lors des expériences de qRT-PCR		
ompF-F	CGT AAC TCT GGT GTT GCT ACT T	Cette étude
ompF-R	AGT CGC TAT GTG CTG ATT GG	Cette étude
kdgN-F	CCT GCG TTA TCG TCC TTT CTA C	Cette étude
kdgN-R	CAG CAC GCT GGT AAT GGT ATA G	Cette étude
ompR-F	GCT CGA TTG ATG TGC AGA TTT C	Cette étude
ompR-R	ACA AAG ACG TAG CCC AAC C	Cette étude
envZ-F	CTG GCG GAG TCG ATC AAT AA	Cette étude
envZ-R	GCC ACT TCC ATC TGC ATT TC	Cette étude
spy-F	CGG AAG GCG TAG TCA ATC AA	Cette étude
spy-R	TTT CTG TTC CGG CGT CAA	Cette étude
degP-F	CCA GAT TGT CGA ATA CGG AGA G	Cette étude
degP-R	GCA TCC ACT TTC ATG GCT TTA G	Cette étude
opgG-F	CCG GAA CAG GCT TAT GTG AT	Cette étude
opgG-R	AAT CGA CCA GGA ATG CAG TAG	Cette étude
opgH-F	GGA ACT GGC GAT AGC TTT GT	Cette étude
opgH-R	CCA CTC CGC CGT ATG ATT TAG	Cette étude
flhD-F	TCG GTT GGG TAT CAA TGA AGA A	Cette étude
flhD-R	TCA CTG AAG CGG AAA TGA CAT A	Cette étude
fliC-F	CAC GGC TCA TGT TGG ATA CT	Cette étude
fliC-R	CATTGACAACCTGAGCAACAC	Cette étude
ipxC-F	AAA TCC GTG CGT GAT ACC AT	Cette étude
ipxC-R	CAT CCA GCA GCA GGT AGA CA	Cette étude

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées lors des expérimentations de qRT-PCR

3.6. Retard sur Gel

Les régions promotrices d'*ompF1* et *ompF2* ainsi que la région codante d'*opgC* sont amplifiées par PCR (Tableau 6). 100 ng d'ADN sont mis en présence de différentes concentrations de protéines purifiées OmpR, RcsB ou CpxR dans du tampon Binding (Tris pH 7,5 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, 1mM MnCl₂ et glycérol 2,5%). Après incubation pendant 30 minutes à température ambiante, du tampon de charge est ajouté (Tris pH7,5 25 mM, glycérol 4% et bleu de bromophénol 0,2 %). L'échantillon est alors déposé sur un gel TBE d'acrylamide/ bisacrylamide 6% (Tris-borate EDTA : 89 mM Tris-borate pH8, 2 mM EDTA). Après migration à 100V pendant 1 heure, l'ADN est visualisé par coloration au bromure d'éthidium (1 µg/mL).

Amorces utilisées lors des expériences de retard sur gel		
ompF-EMSA-F	CGT GAA GAA CGT CTG GAA CA	Cette étude
ompF-EMSA-R	GCC GTC TTT ATT GTA CAC TTC	Cette étude
ompF2-F	GTA TAG TTT ATC AGT TCT AAT CG	Cette étude
ompF2-R	GAA TAT TAC GCT TCA TCA TTA TC	Cette étude
opgCmil-F	AAC TGA CCA GCA TGG GAT TC	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2016
opgCmil -R	GGG GTT GCG TTG TAG CAG G	Bontemps-Gallo <i>et al.</i> , 2016

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées lors des PCR effectuées pour les expériences de retard sur gel.

3.7. Séquençage

Le séquençage des produits PCR ainsi que des plasmides a été réalisé par la société Eurofins.

4. Techniques de Biochimie

4.1. Purification des protéines OmpR, RcsB et CpxR

Les plasmides pNFW410, pNFW444, pNFW480 sont insérés dans une souche BL21 d'*E. coli*. Les cellules transformantes sont sélectionnées et mises en culture. Une fois que la culture a atteint une DO de 0,5, la protéine recombinante est induite par ajout d'IPTG 1mM (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) durant 2h30. La culture est centrifugée et le culot remis en suspension dans du TNTi (Tris 25mM pH8, NaCl 300 mM, Triton 0,05 %, Imidazole 20mM). La suspension est lysée par sonication 5 fois durant 1 min. Le surnageant récupéré après centrifugation est mis au contact de billes Ni-NTA (Qiagen) préalablement lavées 2 fois avec 1 mL de TNTi. L'échantillon est incubé à 4°C sur roue pendant 2h. Les billes sont alors lavées 8 fois avec 1mL de TNTi puis les protéines sont éluées à deux reprises par ajout de 500 μ L de TNi (Tris 25mn pH8, NaCl 300 mM, Imidazole 500 mM). La concentration en protéines de la fraction obtenue est déterminée par la méthode de Bradford (1976) (BioRad Protein Assay) avec une solution de BSA (Bovin Serum Albumine ou Albumine de Sérum Bovin) comme référence. La pureté de l'échantillon est vérifiée sur un gel d'acrylamide 12% coloré par la suite au bleu de Coomassie.

4.2. Extraction des protéines membranaires

Les bactéries en phase stationnaire sont centrifugées, lavées dans du tampon phosphate 20 mM pH7,2 puis de nouveau centrifugées. Le culot est resuspendu dans 2 mL de tampon phosphate 20 mM pH7,2 puis la suspension est lysée par sonication 4 X 45 sec. Les bactéries intactes sont éliminées par centrifugation 10 000 g durant 30 min à 4°C et le surnageant est incubé 30 min à température ambiante avec du N-lauroylsarcosine 0,5% (Beis *et al.*, 2006). La suspension est ultracentrifugée à 100 000 g durant 1H et le culot obtenu est resuspendu avec du tampon phosphate 20 mM pH7,2. 150 µg de protéines sont déposées sur un gel d'acrylamide 12% (375 mM Tris pH8,8 ; 0,1% SDS ; 1% APS et 0,08% Temed). Du tampon de charge 2X (250 mM Tris pH6,5 ; 15% glycérol ; 2,5% SDS, 0,025% Bleu de Bromophénol) est ajouté aux échantillons avant d'être mis à chauffer à 100°C durant 5 min. La migration s'effectue à 25 mA et le gel est coloré au bleu de Coomassie.

4.3. PhosTag

La séparation des protéines est réalisée sur un gel SDS-PAGE 10% acrylamide auquel sont ajoutés 35 µM de PhosTag™ et 35 µM MnCl₂. Une partie des molécules d'acrylamide sont greffées à des molécules de PhosTag™, ce qui permet une séparation des protéines dépendante de leur niveau de phosphorylation. En effet, le PhosTag™ retarde la migration de toute protéine phosphorylée par rapport à la même non phosphorylée, permettant ainsi de les séparer.

4.3.1. PhosTag *in vitro*

Le PhosTag *in vitro* est réalisé à partir de protéines purifiées. Ces dernières sont phosphorylées à partir de différents donneurs de phosphate : l'ATP, l'acétylphosphate et le phosphoramidate. 5 µg de protéines OmpR et OmpD55N sont incubés avec du tampon 5X (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ et 2mM β-mercaptoéthanol). 25 mM de donneur de phosphate sont ajoutés afin de phosphoryler la protéine purifiée et la suspension est mise à incuber à température ambiante durant 30 min. Les échantillons sont déposés dans le gel PhosTag™ qui est mis à migrer à 15 mA. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

4.3.2. PhosTag *in vivo*

Le PhosTag *in vivo* est réalisé à partir de cultures en phase exponentielle. Ces cultures sont centrifugées et les culots remis en suspension dans du milieu M63 sans source de carbone. Les suspensions sont lysées par sonication deux fois pendant 30 sec. 100 µg de lysats cellulaires sont déposés dans le gel PhosTag™. La migration se fait à 12 mA. Le gel est ensuite incubé dans du Tris Glycine EDTA 1 mM afin de chélater les ions Mn²⁺ puis dans

de l'éthanol 20% durant 10 min avant d'être transféré sur membrane nitrocellulose grâce au Trans-Blot® Turbo™ Blotting system (BioRad) à une intensité de 2,5 A durant 7 min. Le blocage de la membrane se fait à 4°C dans du PBS-Tween 0,5% BSA 5% lait écrémé en poudre 5%. Le Western-blot est réalisé contre les régulateurs RcsB, CpxR et OmpR à partir de protocoles standards en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin CpxR, dilué au 1/1000^{ème}, RcsB, dilué au 1/1000^{ème} et OmpR, dilué au 1/300^{ème}. L'anticorps secondaire anti-lapin couplé à de la peroxydase de raifort est utilisé à une dilution au 1/10000^{ème}. Les protéines d'intérêt sont détectées par chimioluminescence grâce au kit Supersignal™ West Dura (ThermoScientific).

4.3.3. PhosTag *in planta*

Le PhosTag *in planta* est réalisé à partir des bactéries extraites de la macération de feuilles d'endive à 24H, 48H et 72H. La macération extraite de la plante est ajoutée à 20 mL de M63 sans source de carbone. La suspension est filtrée puis centrifugée. Le culot est resuspendu dans du M63 sans source de carbone. Les suspensions sont soumises à deux cycles de sonication de 30 sec et 100 µg de lysats cellulaires sont déposés dans le gel PhosTag™. La suite du protocole est identique à ce qui est effectué *in vivo*.

4.4. Spectrométrie de Masse

Les protéines extraites des gels de porine sont préalablement digérées à la trypsine. Les peptides résultants sont analysés sur un système chromatographie nano RSLC couplé à un spectromètre de masse Q Exactive HF (Thermo Scientific). La méthode utilisée est le Top20 HCD DDA (Data Dependant Acquisition opéré grâce à de la Higher-energy Collisional Dissociation). Les données brutes sont traitées avec le logiciel "Proteome Discoverer 2.4", avec le moteur de recherche Sequest HT contre une base de données Uniprot *Dickeya dadantii*.

5. Analyses Phénotypiques

5.1. Sécrétion d'exoenzymes et d'exopolysaccharides

5.1.1. Sécrétion de pectinases

10⁷ bactéries sont déposées sur milieu PGA. Après 48H d'incubation à 30°C, les boîtes sont recouvertes d'une solution d'acétate de cuivre 10% jusqu'à l'apparition d'un halo translucide correspondant à l'hydrolyse du PGA. Le diamètre du halo de dégradation est alors mesuré.

5.1.2. Sécrétion de cellulases

10^7 bactéries sont déposées sur milieu CMC. Après 48H d'incubation à 30°C, les boîtes sont recouvertes d'une solution de Rouge Congo à une concentration de 1 mg/mL durant 15 min puis rincées deux fois avec du NaCl 1M jusqu'à l'apparition d'un halo translucide jaune causée par l'hydrolyse du CMC. Le diamètre du halo de dégradation est alors mesuré.

5.1.3. Sécrétion de protéases

10^7 bactéries sont déposées sur milieu Lait. Après 48H d'incubation à 30°C, un halo translucide sur fond trouble correspondant à l'hydrolyse du lait apparaît si la bactérie est capable de sécréter des protéases.

5.1.4. Sécrétion d'exopolysaccharides

10^7 bactéries sont déposées sur un milieu M63 complétementé avec 0,2% de glycérol. Après 48H d'incubation à 30°C, l'aspect muqueux ou non des colonies est observé.

5.2. Motilité

10^7 bactéries sont déposées sur un milieu LB faiblement gélosé (0,4%). Après 48H d'incubation à 30°C, les souches motiles forment un halo de nage qui est alors mesuré.

5.3. Tests de pathogénicité

5.3.1. Infection sur feuille d'endive

Une entaille d'environ 1 cm est réalisée sur une feuille d'endive à l'aide d'un scalpel stérile. 10^3 à 10^7 bactéries sont déposées au niveau de l'incision et les feuilles sont incubées pendant 24H à 122H à 30°C en atmosphère humide. La macération est ensuite observée.

5.3.2. Infection sur tubercule de pomme de terre

Les tubercules de pomme de terre variété Amandine sont stérilisés par du NaOCl à 0,5% puis rincés deux fois avec à l'eau stérile. Une fois les tubercules séchés, on réalise un puits de 3,5 cm de profondeur dans lequel 10^7 bactéries sont inoculées. Les tubercules sont alors incubés pendant 72H à 30°C en atmosphère humide. Les pommes de terre sont ouvertes et la macération récupérée afin d'être pesée.

5.4. Mesure du pH et de l'osmolarité dans la feuille d'endive

Une entaille d'environ 1 cm est réalisée sur feuilles d'endive à l'aide d'un scalpel stérile. Les feuilles sont infectées ou non avec 10^7 bactéries et sont incubées pendant 24H à 72H à 30°C en atmosphère humide. Le pH est mesuré chaque jour au niveau du lieu d'incision grâce à une électrode pH Micro Orion (ThermoScientific) connectée à un pH-mètre FiveEasy (Mettler Toledo). L'osmolarité est mesurée chaque jour au niveau du lieu d'incision grâce à l'osmomètre Roebling Type 13.

6. Analyses Statistiques

Les tests statistiques sont réalisés à partir du logiciel Graph-Prism 7. Le test One-Way ANOVA est utilisé afin d'analyser les données collectées.

Références

Bibliographiques

- Aiba, H., Mizuno, T. & Mizushima, S. Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J. Biol Chem.* **264**, 8563–8567 (1989).
- Alič, Š., Naglič, T., Tusek-Znidarič, M., Peterka, M., Ravnikar, M. & Dreo, T. Putative new species of the genus *Dickeya* as major soft rot pathogens in *Phalaenopsis* orchid production. *Plant Pathol.* **66**, 1357–1368 (2017).
- [A] Antúñez-Lamas, M., Cabrera, E., Lopez-Solanilla, E., Solano, R., González-Melendi, P., Chico, J.M., Toth, I., Birth, P., Pritchard, L., Liu, H. & Rodriguez-Palenzuela, P. Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues: Bacterial chemoattraction towards jasmonate. *Mol. Microbiol.* **74**, 662–671 (2009).
- [B] Antúñez-Lamas, M., Cabrera-Ordóñez, E., Lopez-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O., Rodríguez-Moreno, A. & Rodriguez-Palenzuela, P. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology.* **155**, 434–442 (2009).
- Appleman, J.A., Chen, L.-L. & Stewart, V. Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *J. Bacteriol.* **185**, 4872–4882 (2003).
- Asmar, A.T., Ferreira, J.L., Cohen, E.J., Cho, S.H., Beeby, M., Hughes, K.T. & Collet, J.-F. Communication across the bacterial cell envelope depends on the size of the periplasm. *PLoS Biol.* **15**, e2004303 (2017).
- Barbieri, C.M. & Stock, A.M. Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both *in vitro* and *in vivo* using Phos-tag-based reagents. *Anal. Biochem.* **376**, 73–82 (2008).
- Batchelor, E., Walther, D., Kenney, L. J. & Goulian, M. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins OmpF and OmpC. *J. Bacteriol.* **187**, 5723–5731 (2005).
- Beis, K., Whitfield, C., Booth, I. & Naismith, J.H. Two-step purification of outer membrane proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **39**, 10–14 (2006).
- Bernardini, M.L., Fontaine, A. & Sansonetti, P.J. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**, 6274–6281 (1990).
- Bertani, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* **186**, 595–600 (2004).
- Bohin, J.-P. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 11–19 (2000).
- Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. Osmoregulation in the Periplasm. *The Periplasm* (2007).
- Bontemps-Gallo, S. *Dickeya dadantii*: Vers la compréhension du rôle biologique des glucanes périplasmiques osmorégulés. (2013).

- Bontemps-Gallo, S., Cogez, V., Robbe-Masselot, C., Quintard, K., Dondeyne, J., Madec, E. & Lacroix J.-M. Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in *Escherichia coli*: the phosphoethanolamine transferase is encoded by *opgE*. *BioMed. Res. Int.* **2013**, 1–8 (2013).
- Bontemps-Gallo, S., Madec, E., Dondeyne, J., Delrue, B., Robbe-Masselot, C., Vidal, O., Prouvost, A.-F., Boussemart, G., Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* **15**, 881–894 (2013).
- Bontemps-Gallo, S., Madec, E. & Lacroix, J.-M. Inactivation of *pecS* restores the virulence of mutants devoid of osmoregulated periplasmic glucans in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Microbiology* **160**, 766–777 (2014).
- Bontemps-Gallo, S. & Lacroix, J.-M. New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 690–697 (2015).
- Bontemps-Gallo, S., Madec, E. & Lacroix, J.-M. The two-component system CpxAR is essential for virulence in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii* EC3937. *Environ. Microbiol.* **17**, 4415–4428 (2015).
- Bontemps-Gallo, S., Madec, E., Robbe-Massselot, C., Souche, E., Dondeyne, J. & Lacroix, J.-M. The *opgC* gene is required for OPGs succinylation and is osmoregulated through RcsCDB and EnvZ/OmpR in the phytopathogen *Dickeya dadantii*. *Sci. Rep.* **6**, 19619 (2016).
- Bontemps-Gallo, S., Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. Osmoregulated Periplasmic Glucans. *EcoSal Plus.* **7**, (2017).
- Bontemps-Gallo, S., Fernandez, M., Dewitte, A., Raphaël, E., Gherardini, F.C. Pradel, E., Koch, L., Biot, F., Reboul, A & Sebbane, F. Nutrient depletion may trigger the *Yersinia pestis* OmpR-EnvZ regulatory system to promote flea-borne plague transmission. *Mol. Microbiol.* **112**, 1471–1482 (2019).
- Bouchart, F., Delangle, A., Lemoine, J., Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. 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 (2007).
- Bouchart, F., Boussemart, G., Prouvost, A.-F., Cogez, V., Madec, E., Vidal, O., Delrue, B., Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. The Virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans is restored by inactivation of the RcsCD-RcsB phosphorelay. *J. Bacteriol.* **192**, 3484–3490 (2010).
- Boulanger, A., Francez-Charlot, A., Conter, A., Castanié-Cornet, M.-P., Cam, K. & Gutierrez, C. Multistress regulation in *Escherichia coli*: expression of *osmB* involves two

- independent promoters responding either to sigmaS or to the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J. Bacteriol.* **187**, 3282–3286 (2005).
- Boyer, M.-H., Cami, B., Chambost, J.-P., Magnan, M. & Cattaneo, J. Characterization of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. *Eur. J. Biochem.* **162**, 311–316 (1987).
 - Brady, C.L., Cleenwerk, I., Denman, S., Venter, S.N., Rodríguez-Palenzuela, P., Coutinho, T.A. & De Vos, P. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben *et al.* 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *Iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 1592–1602 (2012).
 - Briones, G., Iñón de Iannino, N., Steinberg, M. & Ugalde, R.A. Periplasmic cyclic 1,2-ss-glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology.* **143**, 1115–1124 (1997).
 - Caby, M., Bontemps-Gallo, S., Gruau, P., Delrue, B., Madec, E. & Lacroix, J.-M. The EnvZ-OmpR two-component signaling system is inactivated in a mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans in *Dickeya dadantii*. *Front. Microbiol.* **9**, 2459 (2018).
 - Cai, S.J. & Inouye, M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 24155–24161 (2002).
 - Caimano, M.J., Kennedy, M.R., Kairu, T., Desrosiers, D.C., Harman, M., Dunham-Ems, S., Akins, D.R., Pal, U. & Radolf, J.D. The hybrid histidine kinase Hk1 is part of a two-component system that is essential for survival of *Borrelia burgdorferi* in feeding *Ixodes scapularis* ticks. *Infect. Immun.* **79**, 3117–3130 (2011).
 - Castanié-Cornet, M.-P., Cam, K. & Jacq, A. RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 4264–4270 (2006).
 - Cayley, D.S., Guttman, H.J. & Thomas Record, M. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**, 1748–1764 (2000).
 - Chakraborty, S., Mizusaki, H. & Kenney, L.J. A FRET-based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of *Salmonella* during macrophage infection. *PLoS Biol.* **13**, e1002116 (2015).
 - Chakraborty, S., Winardhi, R.S., Morgan, L.K., Yan, J. & Kenney, L.J. Non-canonical activation of OmpR drives acid and osmotic stress responses in single bacterial cells. *Nat. Commun.* **8**, 1587 (2017).
 - Chakraborty, S. & Kenney, L.J. A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*. *Front. Microbiol.* **9**, 2656 (2018).

- Chapelle, E., Alubbu, B., Malfatti, P., Solier, L., Pédrón, J., Kraepiel, Y. & Van Gijsegem, F. A straightforward and reliable method for bacterial *in planta* transcriptomics: application to the *Dickeya dadantii* / *Arabidopsis thaliana* pathosystem. *Plant J.* **82**, 352–362 (2015).
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., López-Solanilla, E., Low, D., Moleleki, L., Pirhonen, M., Pitman, A., Perna, N., Reverchon, S., Rodríguez-Palenzuela, P., San Francisco, M., Toth, I., Tsuyumu, S., Van der Waals, J., Van der Wolf, J., Van Gijsegem, F., Yang, C.-H. & Yedidia, I. . The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**, 425–449 (2012).
- Charkowski, A.O. The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**, 269–288 (2018).
- Cho, S.-H., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Roszczenko, P., Asmar, A., Laloux, G., Hov, A.-K., Leverrier, P., Van der Henst, C., Vertommen, D., Typas, A., Collet, J.-F. Detecting envelope stress by monitoring β -barrel assembly. *Cell.* **159**, 1652–1664 (2014).
- Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J. & Bohin, J.-P. Osmoregulated Periplasmic Glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**, 3127–3133 (2001).
- Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F. & Enard, C. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **12**, 45–52 (1999).
- Condemine, G. & Ghazi, A. Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*). *J. Bacteriol.* **189**, 5955–5962 (2007).
- Cosgrove, D.J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 171–201 (1997).
- Costechareyre, D., Balmand, S., Condemine, G. & Rahbé, Y. *Dickeya dadantii*, a plant pathogenic bacterium producing Cyt-Like entomotoxins, causes septicemia in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* **7**, e30702 (2012).
- Czajkowski, R., De Boer, W.J., Van Veen, J.A. & Van der Wolf, J.M. Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*): Interaction between *Serratia* A30 and *Dickeya* sp. IPO2222. *Plant Pathol.* **61**, 677–688 (2012).
- Czajkowski, R. Bacteriophages of Soft Rot *Enterobacteriaceae* - a minireview. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnv230 (2016).
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J. & Silhavy, T.J. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* **9**, 387–398 (1995).

- Danese, P.N., Pratt, L.A. & Kolter, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**, 3593–3596 (2000).
- De la Cruz, M.A. & Calva, E. The complexities of porin genetic regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 24–36 (2010).
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K.N. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6568–6572 (1990).
- De Wulf, P., Kwon, O. & Lin, E.C. The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *J. Bacteriol.* **181**, 6772–6778 (1999).
- Decad, G.M. & Nikaido, H. Outer membrane of gram-negative bacteria. XII. Molecular-sieving function of cell wall. *J. Bacteriol.* **128**, 325–336 (1976).
- Delangle, A., Prouvost, A.-F., Cogez, V., Bohin, J.-P., Lacroix, J.-M. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* gan locus, involved in galactan catabolism. *J. Bacteriol.* **189**, 7053–7061 (2007).
- Delepelaire, P. & Wandersman, C. 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 (1991).
- Delgado, J., Forst, S., Harlocker, S. & Inouye, M. Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**, 1037–1047 (1993).
- Delhaye, A., Laloux, G. & Collet, J.-F. The Lipoprotein NlpE is a Cpx sensor that serves as a sentinel for protein sorting and folding defects in the *Escherichia coli* envelope. *J. Bacteriol.* **201**, e00611-18, [/jlb/201/10/JB.00611-18.atom](https://doi.org/10.1128/JB.00611-18) (2019).
- Delilhas, N. & Forst, S. MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J. Mol. Biol.* **313**, 1–12 (2001).
- Ebel, W. & Trempy, J.E. *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *J. Bacteriol.* **181**, 577–584 (1999).
- Ferrières, L. & Clarke, D.J. 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**, 1665–1682 (2003).
- Fiedler, W. & Roterling, H. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**, 14684–14689 (1988).
- Forst, S., Comeau, D., Norioka, S. & Inouye, M. Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 16433–16438 (1987).

- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, P., Gutierrez, C. & Cam, K. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**, 823–832 (2004).
- Franza, T., Michaud-Soret, I., Piquerel, P. & Expert, D. Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**, 1181–1191 (2002).
- Futai, K. Attenuated colicin-based screening to discover and create novel resistance genes. *J. Microbiol. Methods.* **100**, 128–136 (2014).
- Gao, R. & Stock, A.M. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 133–154 (2009).
- Gerken, H., Charlson, E.S., Cicirelli, E.M., Kenney, L.J. & Misra, R. MzrA: a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon. *Mol. Microbiol.* **72**, 1408–1422 (2009).
- Gerken, H. & Misra, R. MzrA-EnvZ interactions in the periplasm influence the EnvZ/OmpR two-component regulon. *J. Bacteriol.* **192**, 6271–6278 (2010).
- Gerstel, U., Park, C. & Römling, U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* **49**, 639–654 (2004).
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W. A. & Saier, M.H. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 3516–3524 (2004).
- Gottesman, S., Trisler, P. & Torres-Cabassa, A. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.* **162**, 1111–1119 (1985).
- Grenier, A.-M., Duport, G., Pages, S., Condemine, G. & Rahbe, Y. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1956–1965 (2006).
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130 (1995).
- Hall, M.N. & Silhavy, T.J. Transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 major outer membrane protein 1b. *J. Bacteriol.* **140**, 342–350 (1979).
- [A] Hall, M.N. & Silhavy, T.J. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **151**, 1–15 (1981).
- [B] Hall, M.N. & Silhavy, T.J. Genetic analysis of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **15**, 91–142 (1981).
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* **166**, 557–580 (1983).

- Hara-Kaonga, B. & Pistole, T.G. OmpD but not OmpC is involved in adherence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* to human cells. *Can. J. Microbiol.* **50**, 719–727 (2004).
- Harholt, J., Suttangkakul, A. & Vibe Scheller, H. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153**, 384–395 (2010).
- Harlocker, S.L., Bergstrom, L. & Inouye, M. Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270**, 26849–26856 (1995).
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. & Swings, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* **21**, 384–397 (1998).
- Hejair, H.M.A., Zhu, Y., Ma, J., Zhang, Y., Pan, Z., Zhang, W. & Yao, H. Functional role of OmpF and OmpC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **107**, 29–37 (2017).
- Hérault, E., Reverchon, S. & Nasser, W. Role of the LysR-type transcriptional regulator PecT and DNA supercoiling in the thermoregulation of *pel* genes, the major virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol* **16**, 734–745 (2014).
- Heyde, M. & Portalier, R. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 511–517 (1987).
- Hoch, J.A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000).
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Liori, S., Expert, D., Nasser, W. & Reverchon, S. PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol* **190**, 7508–7522 (2008).
- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Van Gijsegem, F., Nasser, W. & Reverchon, S. *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One.* **6**, e20269 (2011).
- Howard, C.J. & Glynn, A.A. The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology.* **20**, 767–777 (1971).
- Hsing, W. & Silhavy, T.J. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 3729–3735 (1997).
- Huang, K.-J. & Igo, M.M. Identification of the bases in the *ompF* regulatory region, which interact with the transcription factor OmpR. *J. Mol. Biol.* **262**, 615–628 (1996).

- Hughes, K., Gillen, K., Semon, M.J. & Karlinsey, J. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science*. **262**, 1277–1280 (1993).
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. & Reverchon, S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 213–257 (1996).
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G. & Shevchik, V.E. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**, 427–440 (2014).
- Hussein, N.A., Cho, S.-H., Laloux, G., Siam, R. & Collet, J.-F. Distinct domains of *Escherichia coli* IgaA connect envelope stress sensing and down-regulation of the Rcs phosphorelay across subcellular compartments. *PLoS Genet.* **14**, e1007398 (2018).
- Isaac, D.D., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J. & Silhavy, T.J. The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17775–17779 (2005).
- Jackson, B.J., Bohin, J.-P. & Kennedy, E.P. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* **160**, 976–981 (1984).
- Jahn, C.E., Willis, D.K. & Charkowski, A.O. The flagellar sigma factor *fliA* is required for *Dickeya dadantii* virulence. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**, 1431–1442 (2008).
- Jiang, P., Atkinson, M.R., Srisawat, C., Sun, Q. & Ninfa, A.J. Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. *Biochemistry.* **39**, 13433–13449 (2000).
- Jiang, X., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Greliche, N., Muskhelishvili, G., Nasser, N., & Reverchon, S. Global transcriptional response of *Dickeya dadantii* to environmental stimuli relevant to the plant infection. *Environ. Microbiol.* **18**, 3651–3672 (2016).
- Kawaji, H., Mizuno, T. & Mizushima, S. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **140**, 843–847 (1979).
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics.* **4**, 3177–3186 (2004).
- Kennedy, E.P., Rumley, M.K., Schulman, H. & Van Golde, L.M. Identification of sn-glycerol-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived Oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**, 4208–4213 (1976).
- Kennedy, E.P. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1092–1095 (1982).
- Kenney, L.J. & Anand, G.S. EnvZ/OmpR two-component signaling: an archetype system that can function noncanonically. *EcoSal Plus.* **9**, (2020).
- Komeda, Y. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **168**, 1315–1318 (1986).

- Lacroix, J.-M., Loubens, I., Tempête, M., Menichi, B. & Bohin, J.-P. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* **5**, 1745–1753 (1991).
- Lacroix, J.-M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A., Bohin, J.-P. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **181**, 3626–3631 (1999).
- Lan, C. Y. & Igo, M. M. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J. Bacteriol.* **180**, 171–174 (1998).
- Laub, M.T. & Goulian, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 121–145 (2007).
- Lee, A.K., Detweiler, C.S. & Falkow, S. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**, 771–781 (2000).
- Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. 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 (2004).
- Létoffé, S., Delepelaire, P. & Wandersman, C. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* **9**, 1375–1382 (1990).
- Li, S., Liang, H., Wei, Z., Bai, H., Li, M., Li, Q., Qu, M., Shen, X., Wang, Y & Zhang, L. An osmoregulatory mechanism operating through OmpR and LrhA controls the motile-sessile switch in the plant growth-promoting bacterium *Pantoea alhagi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e00077-19, /aem/85/10/AEM.00077-19.atom (2019).
- Li, W., Ancona, V. & Zhao, Y. Co-regulation of polysaccharide production, motility, and expression of type III secretion genes by EnvZ/OmpR and GrrS/GrrA systems in *Erwinia amylovora*. *Mol. Genet. Genomics.* **289**, 63–75 (2014).
- Liu, X. & Ferenci, T. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3917–3922 (1998).
- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F. & Rodríguez-Palenzuela, P. The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Mol. Microbiol.* **49**, 347–357 (2003).
- López-Solanilla, E., García-Olmedo, F. & Rodríguez-Palenzuela, P. Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell.* **10**, 917–924 (1998).
- Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J.-M. & Bohin, J.-P. 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 (1993).
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. & Stock, J. B. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 718–722 (1992).
 - Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J.D., Perna, N.T., Kelman, A & Charkowski, A.O. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology.* **97**, 1150–1163 (2007).
 - Madec, E., Bontemps-Gallo, S. & Lacroix, J.-M. Increased phosphorylation of the RcsB regulator of the RcsCDB phosphorelay in strains of *Dickeya dadantii* devoid of osmoregulated periplasmic glucans revealed by Phos-tag gel analysis. *Microbiology.* **160**, 2763–2770 (2014).
 - Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, J.C., Stewart, P.S. & O’Toole G.A. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* **426**, 306–310 (2003).
 - Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa* / *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**, 47–56 (1999).
 - Majdalani, N. & Gottesman, S. The RcsB phosphorelay: A Complex Signal Transduction System. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 379–405 (2005).
 - Marrero, G., Schneider, K.L., Jenkins, D.M. & Alvarez, A.M. Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3524–3539 (2013).
 - Martínez-Flores, I., Cano, R., Bustamante, V.H., Calva, E. & Puente, J.L. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 556–562 (1999).
 - Masclaux, C. Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937 pectate lyases in pathogenesis of african violets. *MPMI.* **9**, 198 (1996).
 - Mathieu, Y., Guern, J., Spiro, M.D., O’Neill, M.A., Kates, K., Darvill, A.G. & Albersheim, P. The transient nature of the oligogalacturonide-induced ion fluxes of tobacco cells is not correlated with fragmentation of the oligogalacturonides. *Plant J.* **16**, 305–311 (1998).
 - May, K.L., Lehman, K.M., Mitchell, A.M. & Grabowicz, M. A stress response monitoring lipoprotein trafficking to the outer membrane. *mBio.* **10**, e00618-19, /mbio/10/3/mBio.00618-19.atom (2019).
 - McEwen, J. & Silverman, P. Chromosomal mutations of *Escherichia coli* that alter expression of conjugative plasmid functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 513–517 (1980).
 - McIntire, FC., Peterson, W.H. & Riker, A.J. A polysaccharide produced by the crown-gall organism. *J. Biol. Chem.* (1942).

- Meyer, S.E., Granett, S., Jung, J.U. & Villarejo, M.R. Osmotic regulation of PhoE porin synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 5501–5502 (1990).
- Mhedbi-Hajri, N., Malfatti, P., Pédrón, J., Gaubert, S., Reverchon, S. & Van Gijsegem, F. PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environ. Microbiol.* **13**, 2901–2914 (2011).
- Miller, K., Kennedy, E. & Reinhold, V. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**, 48–51 (1986).
- Mizuno, T., Wurtzel, E.T. & Inouye, M. Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Bacteriol.* **150**, 1462–1466 (1982).
- Mizuno, T. & Mizushima, S. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**, 1077–1082 (1990).
- Mizuno, T. Compilation of All Genes Encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**, 161–168 (1997).
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangel, J.L. & Grant, S.R. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 363–371 (2007).
- Motz, M. & Jung, K. The role of polyproline motifs in the histidine kinase EnvZ. *PLoS One.* **13**, e0199782 (2018).
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. & Iino, T. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 139–147 (1990).
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. & Iino, T. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific Sigma factor, sigma^F. *Mol. Microbiol.* **6**, 3149–3157 (1992).
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H. & Mizuno T. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* **46**, 281–291 (2002).
- Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J.-M., Robert-Baudouy, J. & Bohin, J.-P. Osmoregulated Periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**, 3134–3141 (2001).
- Pallen, M.J. & Matzke, N.J. From the origin of species to the origin of bacterial flagella. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 784–790 (2006).
- Park, H., Saha, S.K. & Inouye, M. Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6728–6732 (1998).

- Parker, C.T., Klower, A.W., Schnaitman, C.A., Stein, M.A., Gottesman, S. & Gibson, B.W. 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**, 2525–2538 (1992).
- Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M. & Elphinstone, J. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 2264–2266 (2014).
- Pédrón, J., Chapelle, E., Alunni, B. & Van Gijsegem, F. Transcriptome analysis of the *Dickeya dadantii* *PecS* regulon during the early stages of interaction with *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Pathol.* **19**, 647–663 (2018).
- Perkins, T.T., Davies, M.R., Klemm, E.J., Rowley, G., Wileman, T., James, K., Keane, T., Maskell, D., Hinton, J.C.D., Dougan, G. & Kingsley, R.A. ChIP-seq and transcriptome analysis of the OmpR regulon of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium reveals accessory genes implicated in host colonization. *Mol. Microbiol.* **87**, 526–538 (2013).
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. & Silhavy, T. J. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 911–917 (1996).
- Price, N. L. & Raivio, T. L. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J. Bacteriol.* **191**, 1798–1815 (2009).
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., & Corel, C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* **183**, 7213–7223 (2001).
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S. & Nasser, W. The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol.* **86**, 172–186 (2012).
- Prüß, B.M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development. *J. Bacteriol.* **199**, e00259-17, [jlb/199/18/e00259-17.atom](https://doi.org/10.1128/jb.199/18/e00259-17) (2017).
- Py, B., Bortoli-German, I, Haiech, J., Chippaux, M. & Barras, F. Cellulase EGZ of *Erwinia chrysanthemi*: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis. *Protein. Eng.* **4**, 325–333 (1991).
- Quintard, K., Dewitte, A., Reboul, A., Madec, E., Bontemps-Gallo, S., Dondeyne, J., Marceau, M., Simonet, M., Lacroix, J.-M. & Sebbane F. Evaluation of the role of the *opgGH* operon in *Yersinia pseudotuberculosis* and its deletion during the emergence of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **83**, 3638–3647 (2015).
- Raczkowska, A. & Brzostek, K. Identification of OmpR protein and its role in the invasion properties of *Yersinia enterocolitica*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 11–16 (2004).
- Raetz, C.R. & Dowhan, W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1235–1238 (1990).

- Raffa, R.G. & Raivio, T.L. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**, 1599–1611 (2002).
- Raivio, T.L. & Silhavy, T.J. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J. Bacteriol.* **179**, 7724–7733 (1997).
- Raivio, T.L. MicroReview: Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **56**, 1119–1128 (2005).
- Raivio, T.L., Leblanc, S.K.D. & Price, N.L. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *J. Bacteriol.* **195**, 2755–2767 (2013).
- Rehm, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 578–592 (2010).
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.O., Zhulin, I.B. & Taylor, B.L. PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**, 806–816 (2000).
- Resibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E. & Toussaint, A. ϕ EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology.* **137**, 102–112 (1984).
- Reverchon, S., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J. *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **11**, 1127–1139 (1994).
- Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J. & Nasser, W. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **179**, 3500–3508 (1997).
- Reverchon, S. & Nasser, W. *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* (2013) doi:10.1111/1758-2229.12073.
- Río-Álvarez, I., Muñoz-Gómez, C., Navas-Vásquez, M., Martínez-García, P.M., Antúnez-Lamas, M., Rodríguez-Palenzuela, P. & López-Solanilla, E. Role of *Dickeya dadantii* 3937 chemoreceptors in the entry to Arabidopsis leaves through wounds. *Mol. Plant. Pathol.* **16**, 685–698 (2015).
- Roberts, D.L., Bennett, D.W. & Forst, S.A. Identification of the site of phosphorylation on the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 8728–8733 (1994).
- Sambrook, J. G., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular Cloning, a laboratory manual (1989).
- Samson, R., Legendre, J.-B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, A. & Gardan, L. 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 zae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1415–1427 (2005).

- Sarma, V. & Reeves, P. Genetic locus (*ompB*) affecting a major outer-membrane protein in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **132**, 23–27 (1977).
- Sathiyarayanan, G., Dineshkumar, K. & Yang, Y.-H. Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 731–752 (2017).
- Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa, T. & Kobayashi, H. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 943–947 (2000).
- Schwechheimer, C. & Kuehn, M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 605–619 (2015).
- Sepulchre, J.-A., Reverchon, S. & Nasser, W. Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J. Theor. Bio.* **244**, 239–257 (2007).
- Shiba, Y., Matsumoto, K. & Hara, H. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* **81**, 51–56 (2006).
- Shin, S. & Park, C. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J. Bacteriol.* **177**, 4696–4702 (1995).
- Skarphol, K., Waukau, J. & Forst, S.A. Role of His243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 1413–1416 (1997).
- Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M. & Laub, M.T. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell.* **133**, 1043–1054 (2008).
- Sledjeski, D.D. & Gottesman, S. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**, 1204–1206 (1996).
- Soutourina, O.A. & Bertin, P.N. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 505–523 (2003).
- Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 (2000).
- Stock, J.B., Rauch, B. & Roseman, S. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**, 7850–7861 (1977).
- Sturny, R., Cam, K., Gutierrez, C. & Conter, A. NhaR and RcsB independently regulate the *osmCp1* promoter of *Escherichia coli* at overlapping regulatory sites. *J. Bacteriol.* **185**, 4298–4304 (2003).
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P. & Romeo, T. Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 5130–5140 (2002).
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. & Mizuno, T. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC YojN RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol. Microbiol.* **40**, 440–450 (2001).

- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Lu, D., Tong, K.I., Park, H., Duuta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yalazki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M. & Ikura, M. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*. **396**, 88–92 (1998).
- Tate, S., Kato, M., Nishimura, Y., Arata, Y. & Mizuno, T. Location of DNA-binding segment of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **242**, 27–30 (1988).
- Taurino, M., Abelenda, J.A., Río-Alvarez, I., Navarro, C., Vicedo, B., Farmaki, T., Jiménez, P., García-Agustín, P., López-Solanilla, E., Prat, S., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. & Sanmartín, M. Jasmonate-dependent modifications of the pectin matrix during potato development function as a defense mechanism targeted by *Dickeya dadantii* virulence factors. *Plant J.* **77**, 418–429 (2014).
- Therisod, H., Weissborn, A.C. & Kennedy, E.P. 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 (1986).
- Tian, Y., Zhao, Y., Yuan, X., Yi, J., Fan, J., Xu, Z., Hu, B., De Boer, S.H. & Li, X. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 2831–2835 (2016).
- Todt, J.C., Rocque, W.J. & McGroarty, E.J. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry.* **31**, 10471–10478 (1992).
- Torriani, A. Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo. *J. Bacteriol.* **96**, 1200–1207 (1968).
- Toth, I.K., Van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrör, L. & Elphinstone, J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* **60**, 385–399 (2011).
- Tran, N., Zielke, R.A. Vining, O.B., Azevedo, M.D., Armstrong, D.J., Banowetz, G.M., McPhail, K.L. & Sikora, E. Development of a quantitative assay amenable for high-throughput screening to target the type II secretion system for new treatments against plant-pathogenic bacteria. *J. Biomol. Screen.* **18**, 921–929 (2013).
- Tschauner, K., Hörnschemeyer, P., Müller, V.S. & Hunke, S. Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*. *PLoS one* **9**, e107383 (2014).
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A. & Vollmer, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 123–136 (2012).
- Van der Wolf, J.M., Nijhuis, E.H., Kowalewska, M.J., Saddler, G.S., Parkinson, N., Elphinstone, J.G., Pritchard, L., Toth, I.K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., De Vos, P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garland, L., Hélias, V., Pothier, J.F., Pflüger, V., Duffy, B., Tsrör, L. & Manulis, S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic

- bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 768–774 (2014).
- Van Golde, L.M., Schulman, H. & Kennedy, E.P. 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 (1973).
 - Vogel, J. & Papenfort, K. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 605–611 (2006).
 - Vogt, S.L. & Raivio, T.L. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 2–11 (2012).
 - Wall, E., Majdalani, N. & Gottesman, S. The Complex Rcs Regulatory Cascade. *Annu. Rev. Microbiol.* **72**, 111–139 (2018).
 - Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., Liu, H. & Ma, L.Z. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6724–6732 (2014).
 - Waukau, J. & Forst, S. Molecular analysis of the signaling pathway between EnvZ and OmpR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 1522–1527 (1992).
 - Weissborn, A.C. & Kennedy, E.P. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of beta 1-2-linked polyglucose chains. *J. Biol. Chem.* **259**, 12644–12651 (1984).
 - Winslow, C.E., Braodhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A. & Smith, G.H. The families and genera of the bacteria: final report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* **5**, 191–229 (1920).
 - Wolfe, A.J., Parikh, N., Lima, B.P. & Zemaitaitis, B. Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *J. Bacteriol.* **190**, 2314–2322 (2008).
 - Wurtzel, E.T., Chou, M.Y. & Inouye, M. Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J. Biol. Chem.* **257**, 13685–13691 (1982).
 - Yang, S., Peng, Q., Zhang, Q., Yi, X., Choi, C.J., Reedy, R.M., Charkowski, A.O. & Yang, C.-H. Dynamic regulation of GacA in type III secretion, pectinase gene expression, pellicle formation, and pathogenicity of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937). *MPMI.* **21**, 133–142 (2008).
 - Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103–119 (1985).
 - Yoshida, T., Qin, L., Egger, L.A. & Inouye, M. Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J. Biol. Chem.* **281**, 17114–17123 (2006).

- Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., Krauss, N., Scheerer, P. & Hunke, S. Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 9805–9814 (2011).
- Zhulin, I., Taylor, B.L. & Dixon, R. PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 331–333 (1997).

Rôle du phosphorelais EnvZ/OmpR chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Au cours de leur vie, les bactéries pathogènes sont confrontées à de nombreuses variations environnementales souvent appelées stress, notamment au cours du processus infectieux. Pour survivre et coloniser avec succès son hôte, la bactérie doit percevoir ce nouvel et hostile environnement pour s'y adapter rapidement. C'est le rôle principal assigné aux phosphorelais. Ces systèmes sont composés d'un couple capteur/régulateur. Sous l'action d'un stimulus, le capteur s'autophosphoryle et transmet son phosphate au régulateur, qui module l'activité d'un ensemble de gènes cibles permettant l'adaptation au nouvel environnement. Notre modèle expérimental *Dickeya dadantii* est une bactérie phytopathogène nécrotrophe responsable de la maladie de la pourriture molle chez un large spectre de plantes hôtes. Les variations du pH et d'osmolarité sont deux des stress souvent rencontrés et combattus par les bactéries pathogènes. Les phosphorelais EnvZ/OmpR et RcsCDB sont deux systèmes majeurs répondant à ces stress. Le laboratoire avait précédemment démontré que le niveau d'activation du système RcsCDB dépendait de la concentration en glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Leur concentration est d'autant plus élevée dans le périplasma que l'osmolarité du milieu est basse ce qui fait des OPG un intermédiaire essentiel dans la perception de l'osmolarité. Cela nous a poussé à éclaircir la relation entre EnvZ/OmpR et les OPG. Dans ce travail, j'ai montré que, contrairement à l'activation du système RcsCDB, l'activation du système EnvZ/OmpR ne dépend pas de la concentration des OPG, tout en nécessitant leur présence pour l'activation correcte de ce phosphorelais. Pour mieux comprendre le rôle du système EnvZ/OmpR chez *D. dadantii*, l'activité de ce système a été étudiée *in vivo* et *in planta*. Alors que le système EnvZ/OmpR est activé dans un milieu à pH acide et à une osmolarité élevée chez *E. coli*, mes travaux montrent que seule la variation du pH active ce phosphorelais. De plus, contrairement à *E. coli* qui possède deux porines majeures, il ne semblait exister qu'une seule porine majeure chez *D. dadantii*. Mes études ont cependant révélé l'existence d'une seconde porine apparaissant à pH acide *in vivo* et *in planta*. Ces deux porines de type OmpF sont régulées par le pH via OmpR. Passée une adaptation de quelques heures dans l'hôte, le profil de ces porines dans l'enveloppe ne change plus durant l'infection. Pourtant, le niveau d'activation d'EnvZ/OmpR durant cette même période fluctue. Ainsi, au moins un autre paramètre environnemental module l'activation de EnvZ/OmpR *in planta*. Enfin, l'absence de variation des porines dans l'enveloppe durant cette même période suggère qu'un autre régulateur, peut-être RcsCDB, permettrait le maintien de leur niveau d'expression.

Mots Clés : *Dickeya dadantii* ; phosphorelais EnvZ/OmpR ; stress environnementaux ; virulence ; glucanes périplasmiques osmorégulés ; porines

Role of EnvZ/OmpR phosphorelay in the phytopathogen bacterium *Dickeya dadantii*

During their lifetime, pathogenic bacteria are confronted with numerous environmental variations often referred to stress, particularly during infection. In order to survive and successfully colonize its host, the bacterium must perceive this new and dangerous environment to adapt quickly. This is the main role assigned to phosphorelays. These systems are composed of a sensor and a cognate regulator. Under the action of a stimulus, the sensor autophosphorylates and transmits the phosphate group to its regulator, which in turn modulates the activity of a set of target genes allowing adaptation to the new environment. Our experimental model *Dickeya dadantii* is a necrotrophic plant pathogen bacterium responsible for soft rot disease in a wide range of plant species. The variation of pH and osmolarity are two stresses often faced and fought by pathogenic bacteria. EnvZ/OmpR and RcsCDB phosphorelays are two major systems known to respond to these stresses. The laboratory had previously demonstrated that the level of activation of the RcsCDB system was dependent on the concentration of periplasmic osmoregulated glucans (OPG). Their concentration in the periplasm increases as the medium osmolarity decreases, making OPGs a major intermediate in the perception of osmolarity. This prompted us to decipher the relationship between EnvZ/OmpR and OPGs. I showed that, unlike for the activation of the RcsCDB system, the activation of EnvZ/OmpR doesn't depend on the concentration of OPGs, but still requires its presence for proper activation of the phosphorelay. To go deeper into the EnvZ/OmpR system, activities of this system have been studied *in vivo* and *in planta*. While the EnvZ/OmpR system is activated in a medium with an acidic pH and a high osmolarity in *E. coli*, my work shows that only pH variation activates this phosphorelay in *D. dadantii*. In addition, only one major porin (versus two in *E. coli*) was previously detected in *D. dadantii*. My studies revealed the existence of a second porin expressed at acidic pH *in vivo* and *in planta*. These two OmpF-like porins are regulated by the pH via OmpR. After adaptation for a few hours *in planta*, the pattern of these two porines remains the same over the rest of the infection. However, the level of OmpR activation during the same period fluctuates indicating that at least one other environmental parameter modulates the activation of EnvZ/OmpR *in planta*. The steady state level of the porines in the envelope during this same period suggests that another regulatory system, perhaps RcsCDB may maintain their expression level.

Keywords : *Dickeya dadantii* ; phosphorelay EnvZ/OmpR ; environmental stress ; virulence ; osmoregulated periplasmic glucans ; porins