



HAL
open science

Etude structurale d'un switch moléculaire impliqué dans le quorum sensing chez *Bacillus cereus*

Samira Zouhir

► **To cite this version:**

Samira Zouhir. Etude structurale d'un switch moléculaire impliqué dans le quorum sensing chez *Bacillus cereus*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114843 . tel-01070632

HAL Id: tel-01070632

<https://theses.hal.science/tel-01070632v1>

Submitted on 2 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

DISCIPLINE : 4101459

STRUCTURE, FONCTION ET INGENIERIE DES PROTEINES

ANNÉE 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1186

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenu le 14/09/2012

Par

Samira ZOUHIR

**Etude structurale d'un switch moléculaire impliqué dans
le quorum sensing chez *Bacillus cereus***

Directeur de thèse : Sylvie NESSLER PR2 (UPSUD Orsay/LEBS Gif-sur-Yvette)

Composition du jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Andréa DESSEN Véronique MONNET	DR2 (IBS Grenoble) DR2 (INRA-MICALIS Jouy en Josas)
<i>Examineurs :</i>	Beatriz GUIMARAEZ Philippe MINARD Herman VAN TILBEURGH	Scientifique de ligne (SOLEIL Gif-sur-Yvette) PR1 (UPSUD Orsay/IBBMC) PR1 (UPSUD Orsay/IBBMC)

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à ma thèse.

A commencer par les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : les docteurs Andrea DESSEN et Véronique MONNET en tant que rapporteuses, mais également les professeurs Philippe MINARD et Herman VAN TILBEURG et la docteure Beatriz GUIMARAEZ en tant qu'examineurs. Je tiens à remercier tout particulièrement Beatriz GUIMARAEZ qui s'est montrée si disponible, merci pour tout. Et enfin, je remercie chaleureusement, la professeure Sylvie NESSLER pour m'avoir permis de travailler sur ce projet. Tu m'as soutenue tout au long de mon parcours et offert de nombreuses opportunités. Grâce à toi, j'ai gagné en confiance et en maturité scientifique, alors merci pour ton encadrement.

Je tiens à remercier l'équipe qui m'a accueillie au sein du LEBS, Solange MORERA pour l'intérêt qu'elle m'a porté, Armelle VIGOUROUX et Virginie GUEGUEN-CHAIGNON pour leur soutien technique. Merci à Laura MONLEZUN qui m'a formé à l'utilisation des équipements à mon arrivée au laboratoire. Je remercie également Jakub GRUSZCZYK qui m'a beaucoup aidé et conseillé avant de partir en post-doc ainsi que Rosa GRENHA qui a pris la relève.

Merci à tous mes collègues du LEBS. En particulier Jocelyne, Jeanne, Angélique et Maud pour leur amabilité et leur efficacité, Anne-Pascale qui a volé à mon secours à chaque bug informatique, Tracy et Corinne, sans qui la vie au laboratoire serait bien compliquée, et Pascal, pour sa bonne humeur. Je n'oublie pas les cristallographes qui m'ont éclairé : Valérie BIOU, Benoît GIGANT, Marcel KNOSSOW et Louis RENAULT.

Un grand merci à mes collaborateurs du laboratoire de GME à La Minière, avec qui il a été facile de communiquer et de réfléchir sur ce projet : Stéphane PERCHAT, Thomas DUBOIS, Christelle LEMY et Didier LERECLUS. Merci également de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et m'avoir fait découvrir votre univers scientifique.

Je remercie infiniment Magali AUMONT-NICAISE pour les données ITC mais aussi son sourire, sa disponibilité et son implication dans le projet. Sans oublier Véronique Henriot pour son soutien technique, Nourredine LAZAR et Bruno COLLINET pour le SEC-MALS et Javier PEREZ pour le SAXS, ainsi que tous les responsables de ligne et les local contacts aux synchrotrons SOLEIL et ESRF.

J'aimerais remercier mes amies Agata NAWROTEK et Ingrid MIGNOT qui ont égailé mes journées. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés. Je remercie également Kaheina, Marcia, Chafika, Amira, Lydia et Samantha.

Je tiens également à remercier Francisco RAMOS-MORALES du département de génétique de l'Université de Séville pour son accueil ainsi que Joaquin, Elena et Mar pour leur sympathie et leur bonne humeur.

Je remercie l'école doctorale 425 « Innovation thérapeutique » de m'avoir accordé la bourse qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes parents, qui ont été d'un soutien sans faille.

MERCI.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	11
TABLE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABBREVIATIONS	17
RESUME/ABSTRACT	19
I. INTRODUCTION.....	23
A. La communication cellulaire chez les bactéries	25
1. Interactions entre les bactéries et l'environnement	25
2. Interactions entre les bactéries : le quorum sensing	27
a) Généralités.....	27
b) Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif : AHL	31
c) Les molécules signal universelles : AI-2.....	35
d) Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif : AIP	37
(1) Régulation indirecte.....	37
(2) Régulation directe.....	39
B. Le quorum sensing directe chez les bactéries à Gram positif.....	41
1. Caractéristiques structurales	41
a) Les motifs TPR.....	43
b) Les domaines à motif HTH	45
2. Les membres.....	47
a) PrgX et ses peptides cCF10 et iCF10	47
b) PlcR et son peptide PapR	53
c) Les Rap et leurs peptides Phr	59
d) NprR et son peptide NprX.....	67
C. Projet	75
II. MATERIELS ET METHODES	77
A. Expression des protéines	79
1. NprR et NprR Δ HTH natives	79
2. NprR Δ HTH marquée au sélénium	81
B. Purification	83
1. Extraction	83
2. Chromatographie d'affinité IMAC.....	83
3. Chromatographie d'exclusion par la taille.....	85
4. Analyse par SDS-PAGE.....	85

5.	Etalonnage de la colonne Superdex S200-26/60	87
6.	Caractérisation par SEC-MALS	89
C.	Préparation des ligands.....	89
1.	Les peptides.....	89
2.	Les oligonucléotides.....	89
D.	Caractérisation des interactions entre l'effecteur et ses ligands	91
1.	Mesures de microcalorimétrie isotherme	91
2.	Mesures de calorimétrie à balayage différentiel.....	93
E.	Etude du switch moléculaire	95
1.	Mesures de dichroïsme circulaire.....	95
2.	Gels natif	97
3.	Mesures de diffusion dynamique de la lumière.....	97
F.	Cristallisation.....	99
1.	Criblage robotisé	99
2.	Reproduction manuelle et optimisation.....	101
3.	Cryoprotection et collecte des données	105
G.	Résolution des structures cristallographiques.....	107
1.	Traitement des données	107
2.	Phasage.....	109
a)	SAD.....	109
b)	Remplacement moléculaire	111
3.	Affinement et validation.....	113
H.	SAXS.....	115
I.	Etudes bioinformatiques.....	117
1.	Analyses des séquences.....	117
2.	Analyses structurales.....	117
III.	RESULTATS	119
A.	Production et caractérisations biochimiques de l'effecteur	121
1.	Généralités.....	121
2.	Purification des échantillons pour la cristallisation.....	123
3.	Analyse par SEC-MALS	125
B.	Le switch moléculaire	127
1.	Effet du peptide sur la structure secondaire de NprR : mesures en dichroïsme circulaire. .	127
2.	Effet du peptide sur NprR : électrophorèse en conditions non dénaturantes.....	129
3.	Effet du peptide sur l'état oligomérique de NprR : mesures en diffusion dynamique de lumière.....	131
C.	Caractérisation des interactions entre NprR et ses ligands.....	133
1.	Interaction entre NprR et son peptide signal NprX	133
2.	Spécificité de reconnaissance NprR/ADN et NprR/NprX/ADN.....	135

a)	Mesures d'ITC.....	135
b)	Mesures de DSC.....	137
D.	Activation croisée.....	139
1.	Spécificité d'interaction.....	139
2.	Le Switch moléculaire.....	141
E.	Analyse structurale de la conformation facteur de transcription.....	143
1.	Les complexes NprR Δ HTH/NprX.....	143
a)	Cristallisation et traitement des données de diffraction.....	143
b)	Structure générale.....	145
c)	Spécificité d'interaction avec le peptide.....	147
d)	Le complexe NprR Δ HTH/NprX forme un tétramère.....	155
2.	Le complexe NprR/NprX/ADN.....	157
a)	Cristallisation et données de diffraction.....	157
b)	Interaction avec l'ADN.....	159
F.	Conformation inhibiteur de la sporulation.....	161
1.	Cristallisation et données de diffraction.....	161
a)	Apo NprR.....	161
b)	Apo NprR Δ HTH.....	161
2.	Expérience de SAXS.....	163
3.	Analyse par mutagenèse dirigée.....	165
ARTICLE	169
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	171
A.	La fonction facteur de transcription.....	173
1.	Mode de fixation du peptide de signalisation.....	173
2.	Mode de régulation transcriptionnelle.....	175
B.	La fonction Inhibiteur de la sporulation.....	179
1.	Un mode de dimérisation commun aux Rap.....	179
2.	Le domaine RAP.....	181
C.	La famille RNPP : évolution et classification.....	189
D.	Reconnaissance et spécificité du système NprR/NprX.....	193
1.	Export et maturation du peptide NprX.....	193
2.	Phérogroupe et activation croisée.....	195
V.	CONCLUSION.....	199
VI.	ANNEXES.....	203
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	229

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1: La chimiotaxie chez <i>E. Coli</i>	24
FIGURE 2: Le phénomène de quorum sensing.....	26
FIGURE 3: Le quorum sensing médié par les AHL chez <i>V. fischeri</i>	30
FIGURE 4: Structures de quelques AHL.....	32
FIGURE 5: Structures de quelques AI-2.....	34
FIGURE 6: Régulation de la bioluminescence chez <i>V. harveyi</i>	34
FIGURE 7: Le quorum sensing chez <i>S. aureus</i>	36
FIGURE 8: Les 4 groupes de peptides AgrD.....	36
FIGURE 9: Le système quorum sensing Rgg/SHP chez <i>S. thermophilus</i> LMD-9.....	38
FIGURE 10: La famille RNPP.....	40
FIGURE 11: Caractéristiques structurales du motif TPR.....	42
FIGURE 12: Séquence consensus du motif TPR.....	42
FIGURE 13: Caractéristiques structurales des domaines à motif HTH.....	44
FIGURE 14: Les trois grandes classes de domaines HTH.....	44
FIGURE 15: Régulation de la conjugaison du plasmide pCF10 chez <i>E. faecalis</i>	46
FIGURE 16: Modèle de répression de l'opéron <i>prgQ</i> par PrgX.....	48
FIGURE 17: Mécanisme de régulation de l'activité de PrgX par ces peptides de signalisation.....	50
FIGURE 18: Régulation de la virulence bactérienne par le système PlcR/PapR.....	52
FIGURE 19: Structure du complexe PlcR/PapR5.....	54
FIGURE 20: Activations croisées dans le système PlcR/PapR.....	56
FIGURE 21: Régulation de l'initiation de la sporulation chez <i>B. subtilis</i>	58
FIGURE 22: Régulation de la compétence chez <i>B. subtilis</i>	60
FIGURE 23 : Maturation des peptides Phr.....	62
FIGURE 24: Structure du complexe RapH/Spo0F.....	64
FIGURE 25: Une structure conservée entre RapH et RapF.....	64
FIGURE 26: Cycle infectieux de <i>B. thuringiensis</i>	68
FIGURE 27: Régulation par le système NprR/NprX chez <i>B. cereus</i>	70
FIGURE 28: Activations croisées dans le système NprR/NprX.....	72
FIGURE 29: Système d'expression pQE60.....	78
FIGURE 30: Principe de la chromatographie d'affinité IMAC.....	82
FIGURE 31: Principe de la chromatographie par exclusion de taille.....	84
FIGURE 32: Calibration de la colonne Superdex S200-26/60.....	86
FIGURE 33: Système SEC-MALS classique.....	88
FIGURE 34: Principe de la microcalorimétrie isotherme.....	90

FIGURE 35: Principe de la microcalorimétrie à balayage.....	92
FIGURE 36: Spectres CD de référence.....	94
FIGURE 37: Principe de la DLS.....	96
FIGURE 38: Diagramme de phase.....	98
FIGURE 39: Méthode de cristallisation par diffusion de vapeur.....	99
FIGURE 40: Diffraction des rayons X par un cristal de protéines.....	104
FIGURE 41: Dispersion anormale du sélénium.....	104
FIGURE 42: La méthode Shake & Bake.....	108
FIGURE 43: Principe du remplacement moléculaire.....	110
FIGURE 44: Expérience SAXS.....	114
FIGURE 45: Organisation en domaines de l'effecteur NprR basée sur sa séquence.....	120
FIGURE 46: Purification des protéines NprR et NprRΔHTH.....	122
FIGURE 47: Analyse par SEC-MALS des protéines NprR et NprRΔHTH.....	124
FIGURE 48: Spectres CD des formes Apo et complexées de l'effecteur.....	126
FIGURE 49: Effet de la fixation du peptide sur la migration électrophorétique de l'effecteur.....	128
FIGURE 50: Mesure en diffusion dynamique de la lumière.....	130
FIGURE 51: Séquence du peptide NprX.....	132
FIGURE 52: Courbes ITC des complexes effecteur/peptide du groupe I.....	132
FIGURE 53: Mesures d'ITC des complexes NprR/B26 et NprR/NprX/B26.....	134
FIGURE 54 : Région promotrice du gène <i>nprA</i> contrôlé par NprR/NprX7.....	135
FIGURE 55: Effet de la fixation du peptide et de l'ADN sur la stabilité de NprR.....	136
FIGURE 56: Effet de la fixation des peptides des groupes II à VII sur l'effecteur.....	140
FIGURE 57: Cristallisation du complexe NprRΔHTH/NprX.....	142
FIGURE 58: Structure globale de NprRΔHTH en complexe avec NprX.....	144
FIGURE 59: Fixation du peptide NprX par NprR.....	146
FIGURE 60: Interaction entre NprRΔHTH et NprX8n.....	148
FIGURE 61: Alignement de séquences NprR des groupes I à VII.....	149
FIGURE 62: Superposition structurale des RNPP.....	150
FIGURE 63: Alignement des séquences de la famille RNPP.....	151
FIGURE 64: Mesure ITC des complexes NprR-R126A/NprX7 et NprR-N275A/NprX7.....	152
FIGURE 65: Analyses électrophorétiques des mutants NprR-R126A et NprR-N275A.....	152
FIGURE 66: Conformation tétramérique du complexe NprRΔHTH/NprX.....	154
FIGURE 67: Conformations dimériques observées dans le tétramère NprRΔHTH/NprX.....	154
FIGURE 68: Model proposé pour la fonction facteur de transcription.....	155
FIGURE 69: Contenu de l'unité asymétrique du jeu de données NprR/NprX/ADN.....	156
FIGURE 70: Conformation des domaines à motif HTH.....	158
FIGURE 71: Conformation tétramérique du complexe NprR/NprX8n/ADN.....	158

FIGURE 72: Cristallisation d'Apo NprR.....	160
FIGURE 73: Cristallisation d'Apo NprR Δ HTH	160
FIGURE 74: Analyse de la forme Apo de NprR Δ HTH par SAXS.....	162
FIGURE 75: Résidus mutés aux interfaces de dimérisation	164
FIGURE 76: Profil d'élution des mutants d'interfaces des dimères I et II	164
FIGURE 77: Profils électrophorétiques en condition non dénaturantes des mutants d'interfaces.....	166
FIGURE 78: Un mode de fixation effecteur/peptide commun.....	172
FIGURE 79: Superposition	172
FIGURE 80: Superposition des domaines TPR de NprR, PlcR, PrgX et PilF	174
FIGURE 81: Les dimères rencontrés dans la famille RNPP	178
FIGURE 82: Superposition des structures RapH et NprR Δ HTH.....	180
FIGURE 83: Comparaison des domaines RAP de NprR, RapH et RapF	180
FIGURE 84: Alignement des séquences des domaines RAP de NprR et des Rap.....	182
FIGURE 85: Superposition structurale des domaines RAP de NprR et RapH	182
FIGURE 86: Conformation du domaine RAP dans NprR et RapF.....	184
FIGURE 87: Complexe RapF/ComAc	184
FIGURE 88: Modélisation du dimère Apo NprR Δ HTH à partir des données de SAXS	186
FIGURE 89: Séquence du précurseur de NprX	192
TABLEAU 1: Les systèmes de quorum sensing directe	40
TABLEAU 2 : Interaction NprR Δ HTH/NprX du groupe I.....	132
TABLEAU 3 : Kd des complexes NprR/NprX7/ADN mesurés par ITC.....	134
TABLEAU 4: Interaction NprR Δ HTH et NprX des groupes II à VII	138
TABLEAU 5: Données cristallographiques des structures NprR Δ HTH-SeMet/NprX7 et NprR Δ HTH/NprX8n	142
TABLEAU 6: Résultats des mesures d'ITC entre les mutants d'interface de dimérisation et NprX7	166

TABLES DES ANNEXES

ANNEXE A.....	205
ANNEXE B.....	207
ANNEXE C.....	209
ANNEXE D.....	213
ANNEXE E.....	215
ANNEXE F.....	219
ANNEXE G.....	221
ANNEXE H.....	223
ANNEXE I.....	225

LISTES DES ABREVIATIONS

aa : acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AHL : Acyle Homoserine Lactone

AI-2 : Auto Inducer-2

AIP : Auto-Inducer Peptide

CD : Circular Dichroïsm

Cter : Cterminal

DLS : Dynamic Light Scattering

DO : Densité Optique

DSC : Differential Scanning Calorimetry

IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography

IPTG : IsoPropyl, β -D-ThiolGalactopyranoside

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

HAP : Histidine-Aspartate Phosphorelay

HTH : Hélice Tour Hélice

MW : Molecular Weight

Nter : Nterminal

Opp : Oligopeptide Perméase

PDB : Protein Data Bank

pb : paire de base

TPR : TetratricoPeptide Repeat

SAXS : Small Angle Xray Scattering

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SEC : Size Exclusion Chromatography

SEC-MALS : Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering

WT : Wild Type

RESUME

Les bactéries utilisent un mode de communication appelé quorum sensing pour réguler l'expression des gènes en fonction de la densité de population et contrôler ainsi de façon multicellulaire des processus tels que la sporulation, la compétence ou la virulence. Chez les bactéries à Gram-positif, le quorum sensing repose principalement sur la production, la sécrétion et la détection de petits peptides de signalisation.

Le projet porte sur l'étude du système quorum sensing: NprR/NprX chez *Bacillus cereus*, où NprR est l'effecteur qui reconnaît spécifiquement le peptide de signalisation NprX. NprR est une protéine bi-fonctionnelle. Seule, elle agit en tant qu'inhibiteur de la sporulation, en complexe avec NprX, elle perd sa fonction initiale au profit d'une activité facteur de transcription impliquée dans la virulence. NprR appartient à une famille d'effecteurs de quorum sensing appelée RNPP (Rap, NprR, PlcR et PrgX) encore mal caractérisée au niveau structural. Mon projet de thèse a consisté en l'analyse structure-fonction du système NprR/NprX.

Pour comprendre la régulation fonctionnelle de NprR par NprX, des études en solution (SEC-MALS et DLS) ont permis de mettre en évidence un switch moléculaire qui repose sur un changement d'oligomérisation. Ainsi NprX fait basculer NprR d'une conformation Apo dimérique à une conformation complexée tétramérique.

L'étude structurale par cristallographie a abouti à la résolution de la structure du complexe NprR/NprX. L'analyse de ce tétramère suggère la reconnaissance de 2 sites distincts sur l'ADN. L'étude structurale par SAXS, a quant à elle, permis de proposer une conformation dimérique de la forme Apo NprR, modèle conforté grâce à une étude par mutagenèse dirigée des résidus d'interface. Il s'agit d'un mode de dimérisation semblable à celui des protéines Rap (membres de la famille RNPP).

La caractérisation par ITC de l'interaction NprR/NprX avec différentes formes du peptide, ainsi que l'analyse de la poche de fixation du complexe, ont permis de mieux comprendre la spécificité d'interaction et de mettre en évidence deux résidus clés de l'effecteur : l'Asn275 essentielle à la fixation du peptide et l'Arg 126 essentielle à l'activation de la fonction facteur de transcription.

Ces travaux ont contribué à une meilleure compréhension du système quorum sensing NprR/NprX grâce à l'élucidation du switch moléculaire contrôlé par NprX mais aussi à une meilleure connaissance de la famille d'effecteurs RNPP.

Mots Clés : *Bacillus cereus*, quorum sensing, sporulation, facteur de transcription, peptide de signalisation, switch moléculaire, oligomérisation, cristallographie, SAXS.

ABSTRACT

Bacteria use a communication mode named quorum sensing to regulate gene expression depending on the population density and thus to control processes such as sporulation, competence or virulence in a multicellular manner. In Gram-positive bacteria, the quorum sensing relies mostly on the production, the secretion and the detection of small signaling peptides.

The project focuses on the study of the quorum sensing system NprR/NprX in *Bacillus cereus*, where NprR is the effector, which recognizes specifically the signaling peptide NprX. NprR is a bi-functional protein. In the absence of peptide, it acts as a sporulation inhibitor while in complex with NprX, it acts as transcription factor implicated in virulence. NprR belongs to a family of quorum sensing effectors named RNPP (for the first identified members: Rap, NprR, PlcR and PrgX) still not well characterized at a structural level. My PhD project consisted to perform the structure/function analysis of the NprR/NprX system.

To understand the functional regulation of NprR by NprX, I carried out different studies in solution (SEC-MALS and DLS). These results allowed me to highlight a molecular switch based on a changing of the oligomerisation state of the protein. NprX binding switches NprR from an Apo dimeric conformation to a tetrameric complex.

The structural study by crystallography led to the resolution of the tetrameric NprR/NprX complex structure. The analysis of this tetramer suggests the recognition of 2 DNA binding sites. The structural study of the dimeric conformation of Apo NprR by SAXS, allowed me to propose a model similar to that of the Rap dimers (members of RNPP family). This model is supported by a directed mutagenesis study of interface residues.

The characterization by ITC of the NprR/NprX interaction with different forms of the peptide, as well as the analysis of the binding pocket in the complex, led to a better understanding of the specificity of the interaction. Two key residues of the effector were highlighted: Asn275, essential to peptide binding and Arg126, essential to the activation of the transcription factor function.

These results have contributed to a better understanding of the NprR/NprX quorum sensing system thanks to the elucidation of the molecular switch controlled by NprX but also in a better knowledge of the RNPP effectors family.

Key words: *Bacillus cereus*, quorum sensing, sporulation, transcription factor, signaling peptide, molecular switch, oligomerisation, crystallography, SAXS.

I. INTRODUCTION

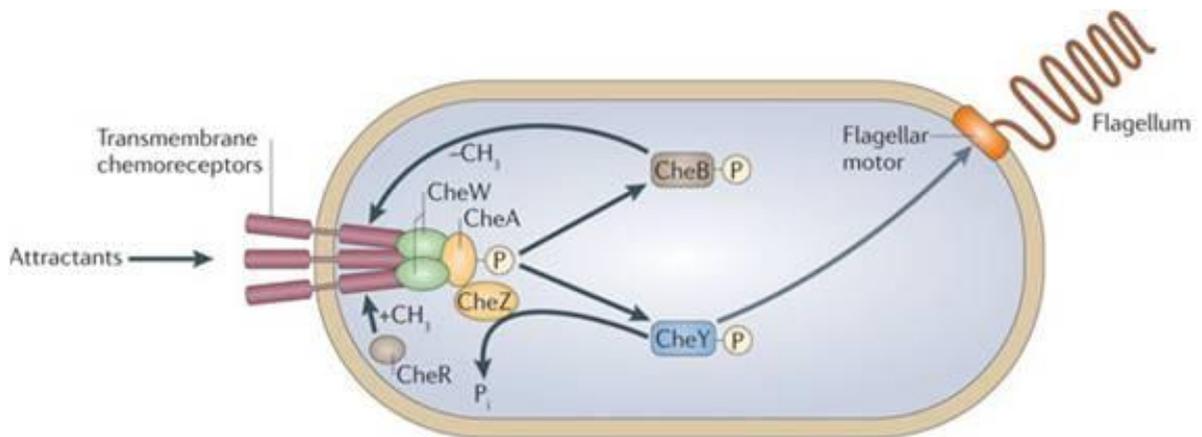


FIGURE 1: La chimiotaxie chez *E. Coli*

Les composés chimiques du milieu sont détectés par les chimiorécepteurs transmembranaires de la bactérie. Le signal est transmis à une histidine kinase, CheA, via la protéine de liaison CheW. En réponse à la diminution de concentration en attractants dans le milieu, CheA s'autophosphoryle et transfère son phosphate aux 2 régulateurs de réponses CheB et CheY. CheY-P se lie au rotor du flagelle pour promouvoir son mouvement dans une direction donnée, CheB-P, dé-méthyle les récepteurs transmembranaires. L'activité antagoniste de CheR permet à la bactérie de mesurer des gradients chimiques et la phosphatase CheZ déphosphoryle spécifiquement CheY-P pour mettre fin à la signalisation.

Schéma extrait de l'article : (Porter, Wadhams et al. 2011)

A. La communication cellulaire chez les bactéries

1. Interactions entre les bactéries et l'environnement

Les bactéries perçoivent en continu les stimuli de l'environnement qui les entoure. Afin de s'adapter au mieux à leurs conditions de vie, elles modifient leur expression génétique en réponse aux informations qu'elles ont intégré (Gross, Arico et al. 1989). Ces stimuli sont le reflet du milieu dans lequel elles évoluent : oxygène, lumière, température, pH, osmolarité, nutriments et autres composés chimiques (Gross, Arico et al. 1989). Les mécanismes de régulation mis en jeu impliquent des systèmes de signalisation de type HAP (Histidine-Aspartate Phosphorelay) qui comprennent au moins deux composants : un récepteur transmembranaire dimérique à activité Histidine kinase (HPK : Histidine Protein Kinase) qui s'autophosphoryle en réponse aux stimuli et un régulateur de réponse (ARR : Aspartate Response Regulator), généralement un facteur de transcription, qui est activé par transfert du phosphate de l'HPK sur un résidu Aspartate (West and Stock 2001; Wadhams and Armitage 2004).

Parmi les processus qui reflètent l'interaction entre les bactéries et l'environnement, on peut décrire la chimiotaxie. *E. coli* est une bactérie douée de motilité qui détecte continuellement des effecteurs chimiques sur son parcours (Berg 2008) (Porter, Wadhams et al. 2011). La bactérie possède 4 chimiorécepteurs transmembranaires appelés MCPs (Methyl-accepting Chemotaxis Protein). Ces derniers enregistrent les signaux perçus à travers un mécanisme de méthylation réversible et permettent ainsi à la bactérie de mesurer des gradients chimiques (Porter, Wadhams et al. 2011). Les signaux peuvent être répartis en deux classes selon qu'ils soient bénéfiques ou non pour la cellule. On distingue donc les signaux attractants vers lesquels les bactéries vont se diriger et les repoussants qu'elles vont au contraire chercher à fuir (Porter, Wadhams et al. 2011). Ainsi, les MCPc transmettent l'information au flagelle via une cascade de phosphorylation décrite dans la **FIGURE 1** ci-contre.

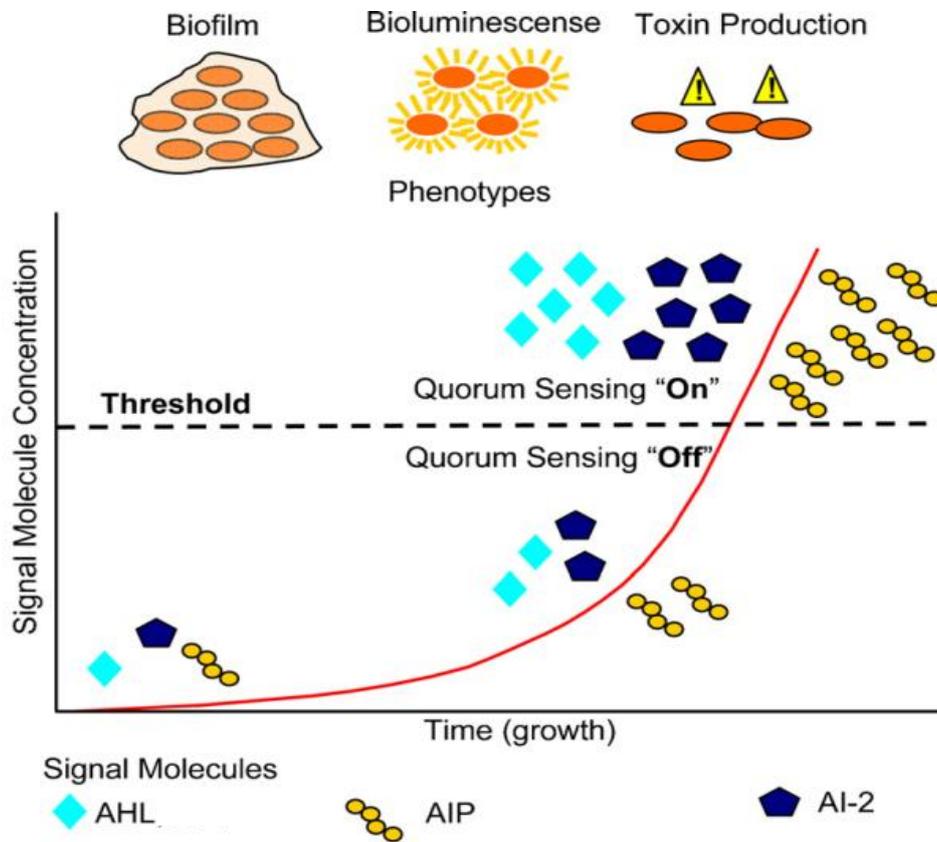


FIGURE 2: Le phénomène de quorum sensing

Les bactéries produisent et sécrètent dans le milieu extracellulaire des molécules signal de type AHL, AIP ou AI-2. Au cours de la croissance bactérienne, la concentration extracellulaire de ces molécules augmente avec la densité de population. A partir d'une concentration seuil, l'ensemble de la population bactérienne bascule vers un même processus de développement: formation de biofilms, virulence, production de lumière ... etc.

Schéma extrait de l'article : (Roy, Adams et al. 2011)

2. Interactions entre les bactéries : le quorum sensing

a) Généralités

La communication intercellulaire est un phénomène biologique fondamental que l'on retrouve chez tous les organismes vivants et qui leur permet d'adapter leurs comportements à une multitude de conditions environnementales ou physiologiques (Hooshangi and Bentley 2008). Chez les bactéries, organismes unicellulaires, une de ces formes de communication est désignée sous le terme de quorum sensing (Waters and Bassler 2005). Il s'agit d'un système de régulation génétique qui permet aux bactéries de synchroniser leurs activités cellulaires au sein d'un écosystème, leur conférant alors un comportement d'organisme multicellulaire. Ce processus de signalisation augmente leur chance de survie dans un environnement complexe (Waters and Bassler 2005) (Hooshangi and Bentley 2008).

Le quorum sensing repose sur la production, la sécrétion et la détection de petites molécules signal appelées auto-inducteurs ou phéromones et réparties principalement en trois classes (Waters and Bassler 2005) (Hooshangi and Bentley 2008):

- AHL : Acyle Homoserine Lactone, spécifique des bactéries à Gram-négatif.
- AI-2 : Auto-Inducteur-2, que l'on retrouve chez les deux types bactériens.
- AIP : Peptide Auto-Inducteur, spécifique des bactéries à Gram-positif.

La médiation de ces molécules signal permet d'évaluer la densité de population bactérienne. En effet, la concentration extracellulaire des phéromones augmente avec la densité cellulaire (Nealson and Hastings 1979) (Fuqua, Winans et al. 1994). On dit que le quorum est atteint lorsque les bactéries détectent une concentration seuil de molécules signal et déclenchent de manière coordonnée un changement de comportement de la population, (Waters and Bassler 2005). **FIGURE 2** ci-contre.

INRODUCTION

Cependant, la densité cellulaire ne contrôle pas à elle seule le développement de la bactérie. Le quorum sensing est connecté aux voies de signalisation mentionnées précédemment qui fonctionnent en réponse aux multiples signaux environnementaux perçus par la cellule bactérienne (Gross, Arico et al. 1989). C'est en intégrant l'ensemble de ces systèmes de régulation que les bactéries peuvent contrôler des activités physiologiques aussi complexes et diverses que la symbiose, la virulence, la compétence, la production d'antibiotiques ou encore la sporulation (Hooshangi and Bentley 2008).

L'implication des systèmes quorum sensing dans les processus pathogènes en font des cibles thérapeutiques de choix (Rasmussen and Givskov 2006). Alors que les traitements actuels contre les maladies infectieuses reposent sur l'inhibition de la croissance bactérienne, une nouvelle stratégie consiste à interférer directement avec l'activité microbienne de façon à ne pas imposer de pression sélective pour le développement de mutants résistants. On parle alors de quorum quenching, (Waters and Bassler 2005) (Sifri 2008). Il s'agit d'un mécanisme naturellement utilisé par les bactéries dans le cas de compétition inter-espèce, il permet à une population donnée de coloniser efficacement une niche au dépend d'autres espèces bactériennes (Waters and Bassler 2005). Les eucaryotes ont également co-évolué pour développer des systèmes de défense qui court-circuitent le quorum sensing bactérien. Ils synthétisent par exemple, des analogues AHL pouvant agir comme des inhibiteurs compétitifs, ou encore, utilisent les auto-inducteurs comme sources de nutriments (Raffa, Iannuzzo et al. 2005).

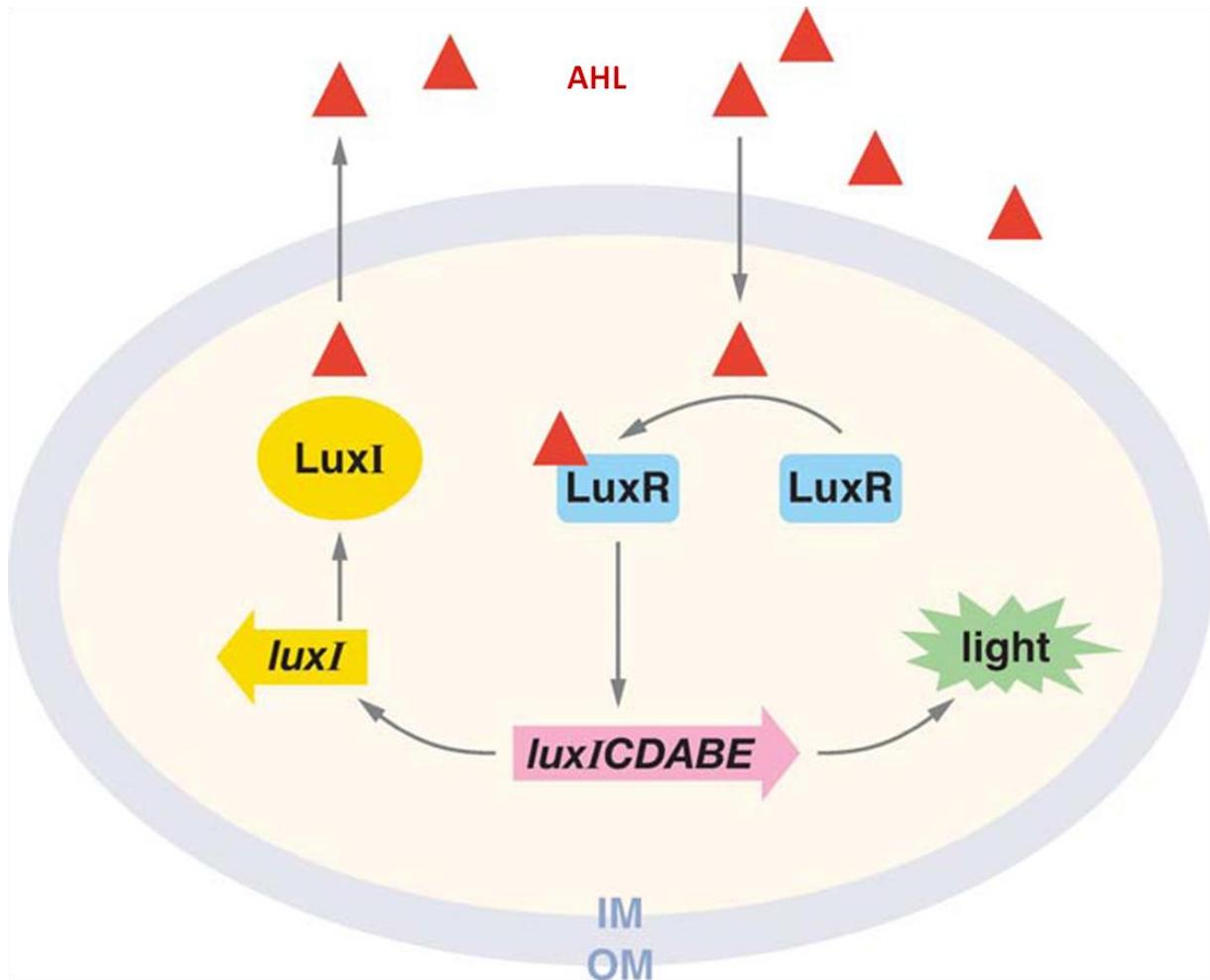


FIGURE 3: Le quorum sensing médié par les AHL chez *V. fischeri*

LuxI synthétise une AHL spécifique qui diffuse librement à travers les membranes interne et externe (IM et OM). Dans le cytoplasme, la molécule signal est spécifiquement reconnue par l'effecteur LuxR, un facteur de transcription qui régule l'expression de l'opéron luciférase pour la production de lumière.

Schéma extrait de l'article : (Waters and Bassler 2005)

b) Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif : AHL

Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif repose principalement sur la production, la sécrétion et la détection des AHL. C'est chez la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* qu'a été décrit le premier de ces systèmes (Nealson and Hastings 1979). Il est depuis considéré comme un paradigme pour le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif, on parle de systèmes de type Lux (Waters and Bassler 2005). *V. fischeri* colonise l'organe léger du calamar hawaïen *Euprymna scolope*, où elle y vit en symbiose. La bactérie y croît jusqu'à atteindre une densité cellulaire nécessaire à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la bioluminescence. Le calamar utilise la lumière produite par les bactéries pour échapper aux prédateurs, ces dernières quant à elles, profitent d'une niche riche en nutriments pour proliférer (Visick, Foster et al. 2000) (Waters and Bassler 2005). Ce système AHL met en jeu deux protéines essentielles qui contrôlent l'expression de l'opéron luciférase *luxICDABE*, responsable de la bioluminescence. LuxI est une AHL synthase dont le produit de réaction est la 3OC6-HomoSerine Lactone (3OC6-HSL) et LuxR est un facteur de transcription qui reconnaît spécifiquement la 3OC6-HSL. Le complexe LuxR/3OC6-HSL activé induit l'expression de l'opéron luciférase (Engebrecht and Silverman 1984) (Fuqua, Parsek et al. 2001) (Waters and Bassler 2005). Du fait de la présence de *luxI* dans l'opéron, il se produit une boucle de rétrocontrôle positive qui fait ainsi basculer la population bactérienne en mode « quorum sensing » pour produire de la lumière (Waters and Bassler 2005). **FIGURE 3** ci contre.

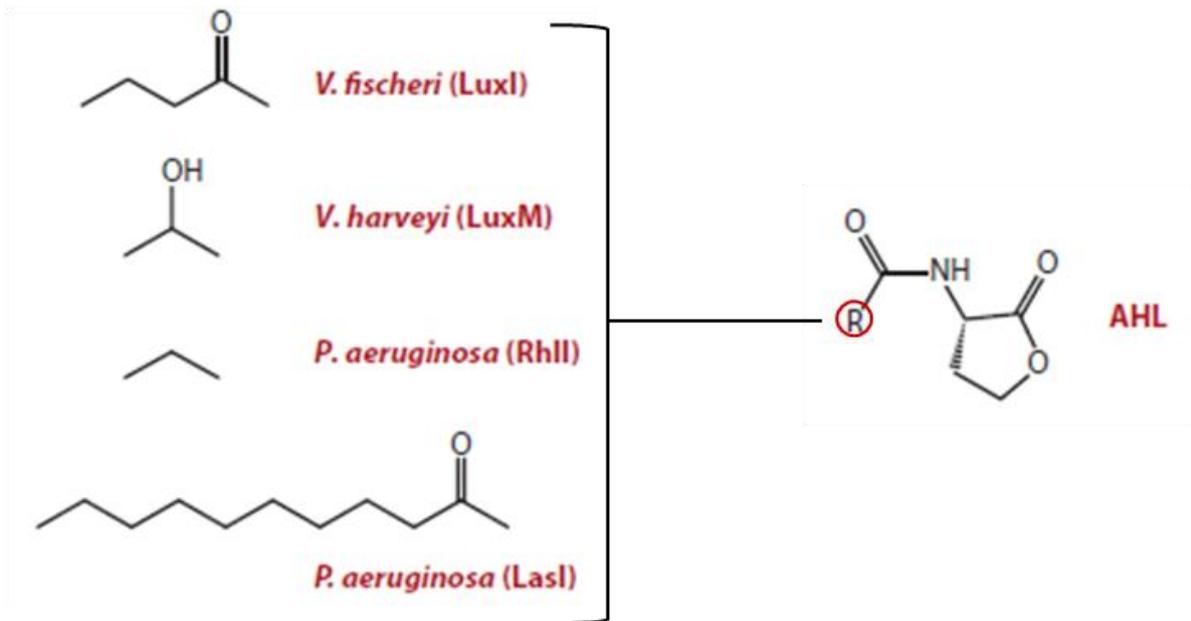


FIGURE 4: Structures de quelques AHL

La spécificité de reconnaissance des AHL repose sur la chaîne d'acide gras greffée en position R du groupement N-Acétyl sur le cycle lactone.

Figure extraite de l'article : (Ng and Bassler 2009)

Ces systèmes de quorum sensing de type Lux sont surtout utilisés dans la communication intra-espèce du fait de la grande spécificité entre les effecteurs LuxR et leurs AHLs apparentés. Cette spécificité repose sur la diversité des chaînes d'acide gras greffées par les LuxI sur les AHLs, **FIGURE 4** ci-contre, (Parsek, Val et al. 1999). En théorie, du fait de leur petite taille et de leur caractère lipophile, les AHLs diffusent librement à travers les membranes cellulaires (Sifri 2008). En pratique, cela dépend entre autre de la longueur et de la nature des chaînes d'acides gras. Ainsi chez *P. aeruginosa*, alors que le C4-HSL diffuse librement, le 3oxo,C12-HSL est activement transporté par une pompe à efflux (Pearson, Van Delden et al. 1999) (Boyer and Wisniewski-Dye 2009). Comme dans cet exemple de bioluminescence chez *V. fischeri*, la détection des AHL peut se faire de manière directe. La molécule signal est réinternalisée dans la cellule, où elle est spécifiquement reconnue par un régulateur de réponse. Les AHLs peuvent également être détectées de manière indirecte par un système HAP comme dans le cas du système Lux de *V. harveyi* décrit dans le paragraphe qui suit (Hanzelka, Parsek et al. 1999).

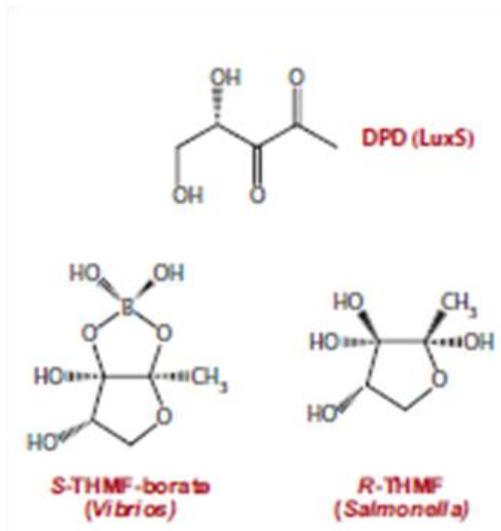


FIGURE 5: Structures de quelques AI-2

Les molécules signal AI-2 dérivent du même composé, le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). Le S-THMF-borate et le R-THMF sont deux dérivés actifs identifiés chez les espèces *Vibrios* et *Salmonella*.

Figure extraite de l'article : (Ng and Bassler 2009)

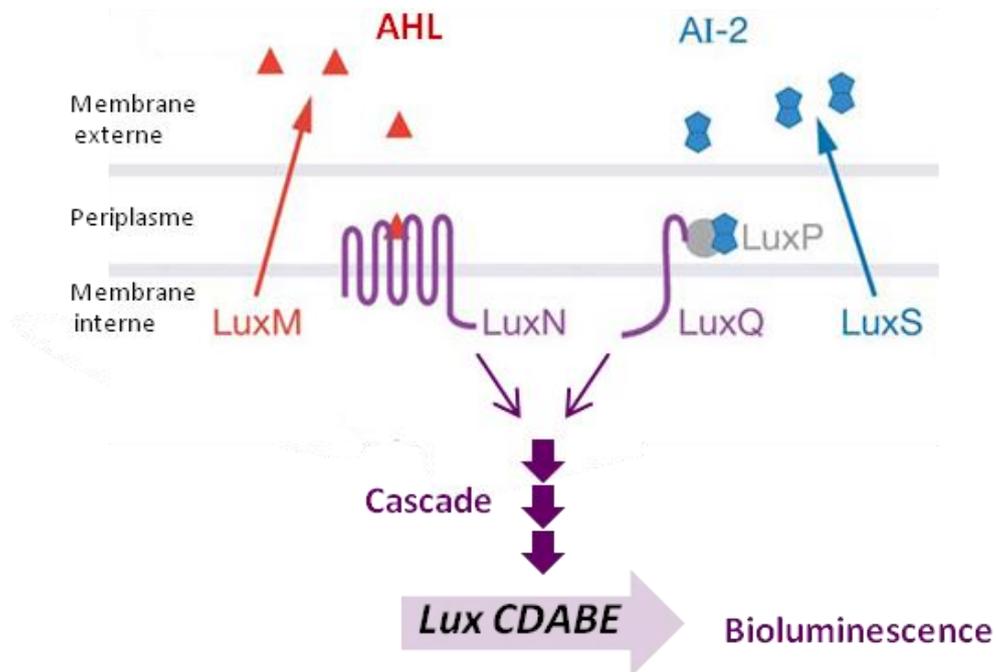


FIGURE 6: Régulation de la bioluminescence chez *V. harveyi*

Chez *Vibrio harveyi* les molécules signal de type AHL et AI-2, respectivement synthétisées par l'AHL synthase LuxM et la S-ribosylhomocysteine lyase *LuxS*, sont détectées spécifiquement par leurs récepteurs membranaires respectifs, LuxN et LuxQ. Dans la cellule, ces récepteurs activent une cascade de signalisation commune aboutissant à l'expression de l'opéron *lux* contrôlant le phénomène de bioluminescence.

Schéma simplifié, extrait de l'article : (Waters and Bassler 2005)

c) *Les molécules signal universelles : AI-2*

Le quorum sensing basé sur les molécules signal de type AI-2 a d'abord été découvert chez la bactérie à Gram négatif *V. harveyi* (Bassler, Wright et al. 1994). Cette bactérie peut produire de la lumière à travers une double régulation : par une AHL d'une part et par un AI-2 d'autre part. La molécule 3OHC4-HSL est synthétisée par l'enzyme LuxM et reconnue spécifiquement par le récepteur transmembranaire LuxN qui déclenche une cascade de phosphorylation aboutissant à l'expression de l'opéron luciférase de *V. harveyi* (Hanzelka, Parsek et al. 1999) (Freeman, Lilley et al. 2000). Parallèlement, l'enzyme LuxS synthétise le 4,5-dihydroxy-2,3 pentanedione (DPD), une molécule réactive sujette à des réarrangement spontanés donnant lieu à un équilibre de dérivés inter convertibles désignés sous le terme général de molécules AI-2 (Xavier and Bassler 2003) (Waters and Bassler 2005). Ces AI-2 sont reconnues par des récepteurs spécifiques et déclenchent une réponse bactérienne, voir [FIGURE 5](#) ci-contre. Chez *V. harveyi*, le dérivé S-THMF-borate est reconnu par la protéine periplasmique LuxP qui interagit avec le récepteur membranaire à activité histidine kinase LuxQ (Bassler, Wright et al. 1994) (Waters and Bassler 2005). LuxQ activé déclenche la même cascade de phosphorylation que la 3OHC4-HSL, [FIGURE 6](#).

Le gène luxS est retrouvé dans plus de la moitié des génomes bactériens actuellement séquencés (Lowery, Dickerson et al. 2008) (Federle 2009). Ainsi, différentes souches bactériennes peuvent détecter divers dérivés du DPD à travers leurs récepteurs spécifiques (Xavier and Bassler 2005). Les AI-2 sont considérées comme des molécules signal universelles utilisées par les bactéries pour la communication inter-espèces et intra-espèces (Bassler and Losick 2006). La détection des AI-2 peut se faire de manière indirecte, comme dans le cas présent, ou de manière directe comme c'est le cas des entérobactéries du genre *Salmonella* où l'auto-inducteur est réinternalisé dans le cytoplasme pour interagir avec son effecteur cible (Kendall and Sperandio 2007).

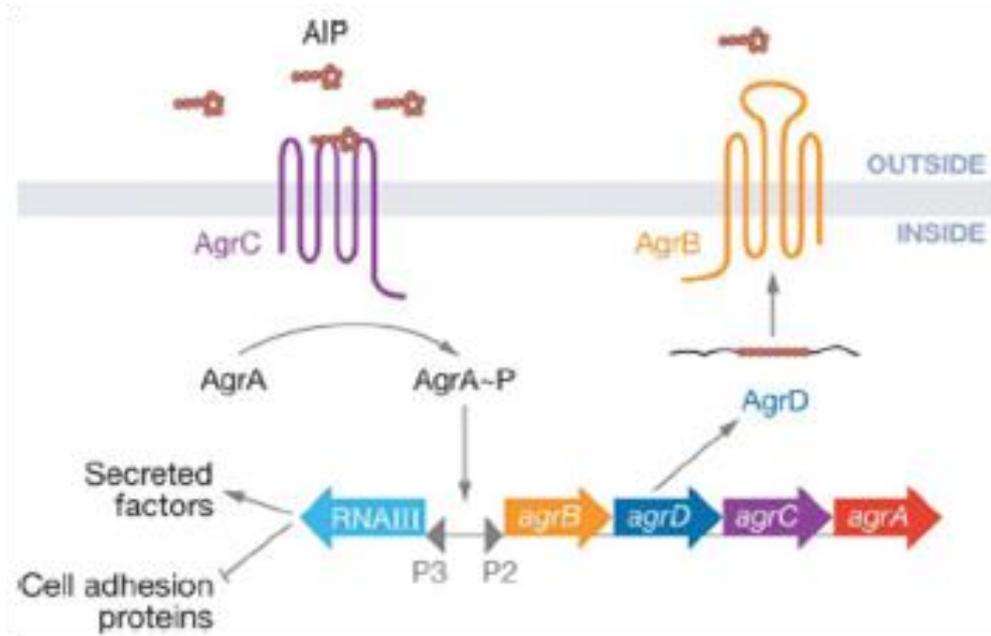


FIGURE 7: Le quorum sensing chez *S. aureus*

Le peptide signal AgrD exprimé par l’opéron *agr* (accessory gene regulator) est exporté par la protéine de transport AgrB et mûré en un peptide autoinducteur (AIP) spécifiquement reconnu par le récepteur transmembranaire à activité protéine kinase, AgrC. Une fois activé par fixation d’AgrD, AgrC s’autophosphoryle et transfère son phosphate au régulateur transcriptionnel AgrA. AgrA-P induit alors l’expression de l’opéron *agr* ainsi que d’un ARN multifonctionnel (RNAIII) qui active l’expression de facteurs de virulence sécrétés et réprime l’expression de protéines impliquées dans l’adhésion cellulaire.

Schéma extrait de l’article : (Waters and Bassler 2005)

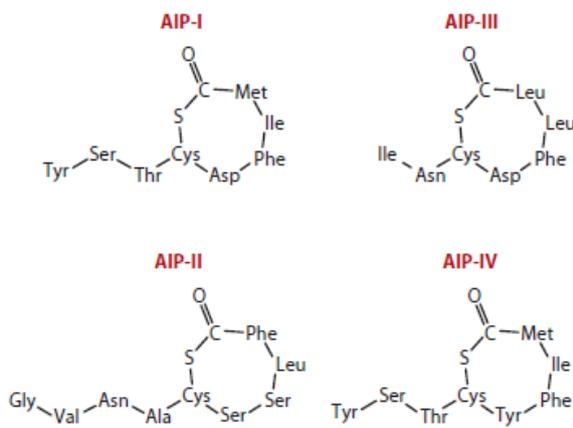


FIGURE 8: Les 4 groupes de peptides AgrD

Chaque groupe de peptide active un récepteur AgrC spécifique et inhibe les récepteurs des autres souches bactériennes dans une compétition inter-espèce.

Figure extraite de l’article : (Ng and Bassler 2009)

d) *Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif : AIP*

(1) Régulation indirecte

Chez les bactéries à Gram positif, le quorum sensing repose généralement sur la production et la sécrétion d'auto-inducteurs peptidiques (AIP), souvent modifiés, qui sont détectés de manière indirecte par des systèmes à plusieurs composants de type HAP. Des récepteurs à activité histidine kinase reconnaissent spécifiquement un AIP donné et déclenchent une cascade de phosphorylation qui régule *in fine* l'activité d'un facteur de transcription (Waters and Bassler 2005). L'un des systèmes les plus étudiés est le système Agr de *Staphylococcus aureus* qui oriente le développement cellulaire vers un processus de virulence (Ji, Beavis et al. 1995) (Novick, Projan et al. 1995). La protéine membranaire de transport AgrB, exporte le peptide AgrD sous sa forme mature en y ajoutant un cycle thiolactone (Saenz, Augsburg et al. 2000). La reconnaissance d'AgrD mature par le récepteur AgrC déclenche l'activité kinase de ce dernier qui s'autophosphoryle puis transfère le phosphate au facteur de transcription AgrA. AgrA-P induit alors l'expression d'un ARN régulateur appelé ARNIII qui réprime l'expression de facteurs d'adhésion cellulaires et active l'expression de facteurs de virulence (Novick, Ross et al. 1993). AgrA-P active également l'expression de l'opéron *agrBDCA*, ce qui a pour conséquence de créer une boucle de rétrocontrôle positif, voir **FIGURE 7** ci-contre (Novick, Projan et al. 1995).

La spécificité des systèmes Agr repose sur la séquence du peptide AgrD. Il existe 4 groupes de peptides, chacun activant spécifiquement un récepteur AgrC spécifique et pouvant inhiber les autres **FIGURE 8** (Lyon, Wright et al. 2002). Ainsi, une inhibition compétitive des récepteurs AgrC non apparentés permet à un groupe de souches de *S. aureus* de prendre le dessus sur les autres groupes en interférant avec leurs systèmes quorum sensing. On parle de compétition inter-espèces (Waters and Bassler 2005).

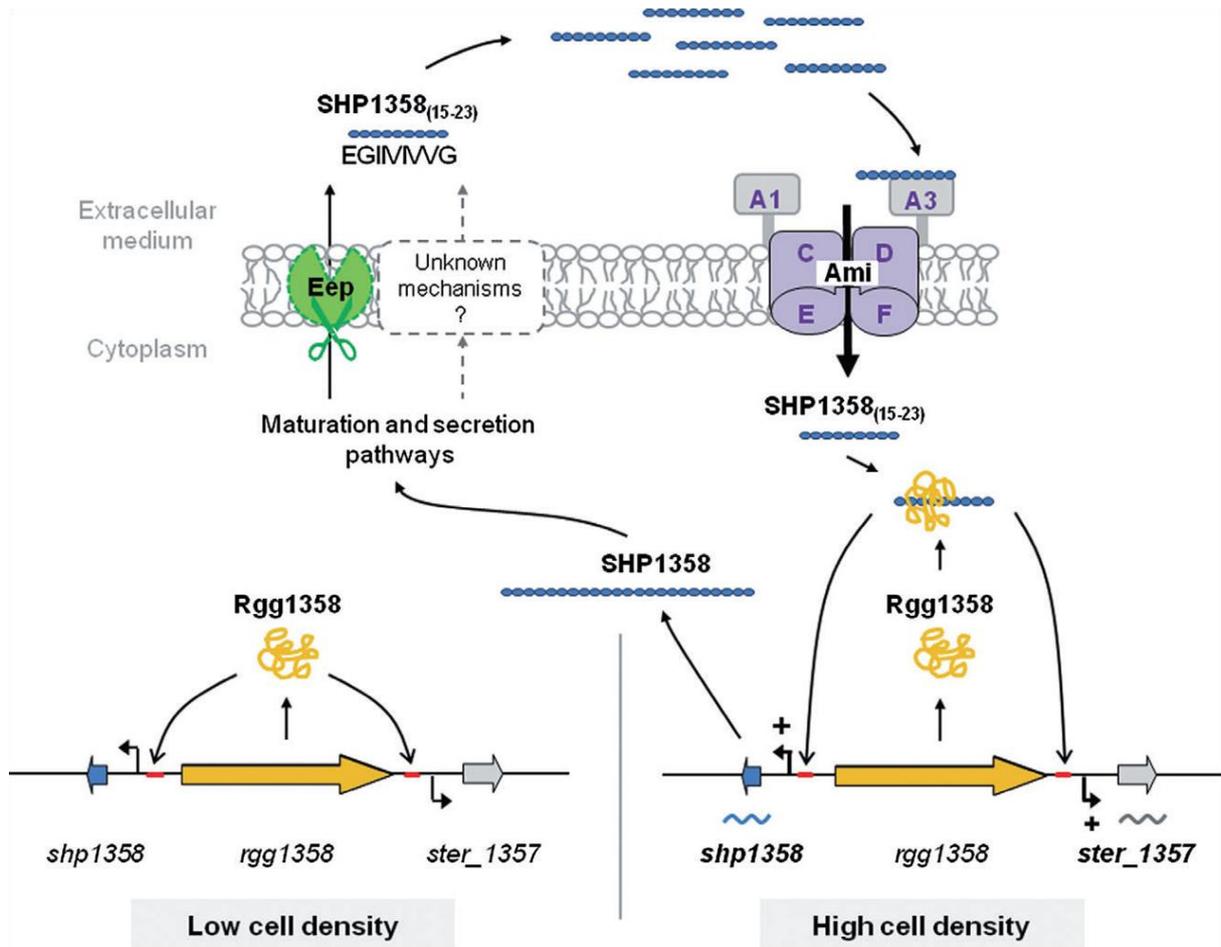


FIGURE 9: Le système quorum sensing Rgg/SHP chez *S. thermophilus* LMD-9

Rgg1358 est un régulateur transcriptionnel qui reconnaît 2 sites distincts sur l'ADN : la région promotrice du gène *ster_1357*, codant pour un peptide cyclique sécrété de fonction inconnue et la région promotrice du gène *shp1358*, codant pour son peptide signal SHP1358. Ce dernier est produit, sécrété et mûré sous la forme d'un peptide actif de 9aa, selon un processus encore mal caractérisé, impliquant la métalloprotéase Eep. Le peptide mûré est réimporté par le système d'oligopeptide perméase Ami. A l'intérieur de la cellule, la forme mûre de SHP1358 interagit directement avec Rgg1358 pour induire l'expression des gènes *shp1358* et *ster_1357*.

Schéma extrait de l'article : (Fleuchot, Gitton et al. 2011)

(2) Régulation directe

Il a également été mis en évidence chez les Gram-positif une régulation directe du quorum sensing par des peptides de signalisation réimportés dans le cytoplasme de la cellule bactérienne où ils interagissent directement avec le régulateur quorum sensing qu'ils ciblent. Les peptides sont produits en tant que pré-pro-peptides qui subissent au moins 2 étapes de clivage. Une première pendant l'export, permet de sécréter le pro-peptide qui est à nouveau clivé dans le milieu extracellulaire pour libérer le peptide actif. Ce dernier est réimporté dans la bactérie, sans modifications post-traductionnelles, par des oligopeptides perméases appelées Opp appartenant à la famille des ABC transporteurs (ATP Binding cassette) (Higgins 1992). Ces derniers hydrolysent l'ATP pour transporter de petits peptides allant de 3 à 20aa (Pottathil and Lazazzera 2003). Généralement, les peptides de signalisation sont codés par de petits cadres ouverts de lecture situés à proximité du gène codant pour le régulateur qu'ils ciblent.

Les premiers régulateurs directement activés par leurs peptides ayant été identifiés sont les protéines Rap et les facteurs de transcription NprR, PlcR et PrgX. Ils ont été regroupés en une famille appelée RNPP (Declerck, Bouillaut et al. 2007) (Rocha-Estrada, Aceves-Diez et al. 2010). On ne trouve des homologues de ces RNPP que dans les classes *Bacilli* et *Clostridia* des bactéries à Gram positif (Declerck, Bouillaut et al. 2007).

Récemment de nouveaux systèmes de quorum sensing direct ont été identifiés chez les bactéries streptocoque. Le système ComR/ComS est impliqué dans la compétence (Fontaine, Boutry et al. 2010) et le système Rgg/SHP contrôle l'expression d'un peptide cyclique sécrété dont le rôle est encore inconnu (Fleuchot, Gitton et al. 2011). Dans les 2 cas le régulateur est directement activé par un peptide ré-internalisé dans la cellule bactérienne. Il n'a pour l'instant, pas encore été établi si ces 2 régulateurs appartiennent à la famille RNPP. La **FIGURE 9** ci-contre décrit le système Rgg/SHP.

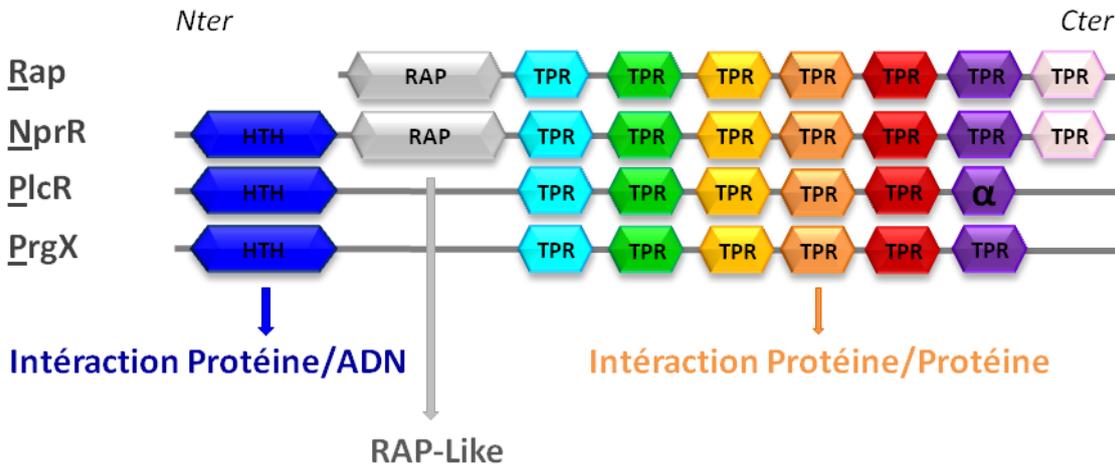


FIGURE 10: La famille RNPP

Les membres fondateurs de la famille RNPP ont en commun un domaine de régulation en Cter formé d’une répétition de motifs TetratrigoPeptide Repeat (TPR). Les facteurs de transcription NprR, PlcR et PrgX possèdent de plus un domaine N-terminal de liaison à l’ADN à motif Hélice-Tour-Hélice (HTH). Les protéines Rap présentent un domaine particulier que l’on retrouve également chez NprR et que l’on a appelé domaine RAP.

Bactérie	Fonction des effecteurs	Rôle biologique	Peptides associés	Effet sur l’effecteur
<i>Bacillus subtilis</i>	<u>Rap</u> (inhibiteur)	Sporulation/ Compétence	<u>PhrH</u> : TDRNTT (6aa)	Négatif
<i>Bacillus cereus</i>	<u>NprR</u> (inhibiteur/ facteur de transcription)	Sporulation/ Virulence	<u>NprX-I</u> : SKPDIVG (7aa)	Switch
<i>Bacillus cereus</i>	<u>PlcR</u> (facteur de transcription)	Virulence	<u>PapR-I</u> : ADLPFEF (7aa)	Positif
<i>Enterococcus faecalis</i>	<u>PrgX</u> (facteur de transcription)	Conjugaison	<u>iCF10</u> : AITLIFI (7aa) <u>cCF10</u> : LVTLVFFV (7aa)	Positif Négatif
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<u>Rgg</u> (facteur de transcription)	Production de peptide cyclique	<u>SHP₁₃₅₈</u> : EGIIVIVVG (9aa)	Positif
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<u>ComR</u> (facteur de transcription)	Compétence	<u>ComS</u> : IAILPYFAGCL (11aa)	Positif

TABLEAU 1: Les systèmes de quorum sensing directe

B. Le quorum sensing directe chez les bactéries à Gram positif

1. Caractéristiques structurales

La famille RNPP a été proposée en 2007, lorsque la structure de PlcR, un effecteur du quorum sensing, a été résolue en complexe avec son peptide de signalisation (Declerck, Bouillaut et al. 2007). L'effecteur possède un domaine de liaison à l'ADN à motif HTH (Pabo and Sauer 1984) ainsi qu'un domaine de régulation à motifs répétés TPR (D'Andrea and Regan 2003). L'architecture de PlcR a révélé une forte homologie structurale avec PrgX, un autre effecteur de quorum sensing directe dont la structure avait déjà été résolue (Shi, Brown et al. 2005). Par ailleurs, des recherches d'homologies par Psi-Blast ont permis d'identifier plusieurs protéines apparentées à ces deux facteurs de transcription, parmi lesquelles NprR et les protéines de la famille Rap (Declerck, Bouillaut et al. 2007). La séquence de NprR présente le consensus du motif HTH ainsi que des motifs TPR mais se distingue de PlcR et PrgX par une insertion d'une centaine de résidus, commune aux protéines Rap. Les Rap sont directement régulées par leurs peptides de signalisation, mais sont dénuées de domaine de liaison à l'ADN et ne fonctionnent pas comme des facteurs de transcription, [FIGURE 10](#). Une vue d'ensemble des systèmes connus de quorum sensing directe est présentée dans le [TABLEAU 1](#) ci-contre.

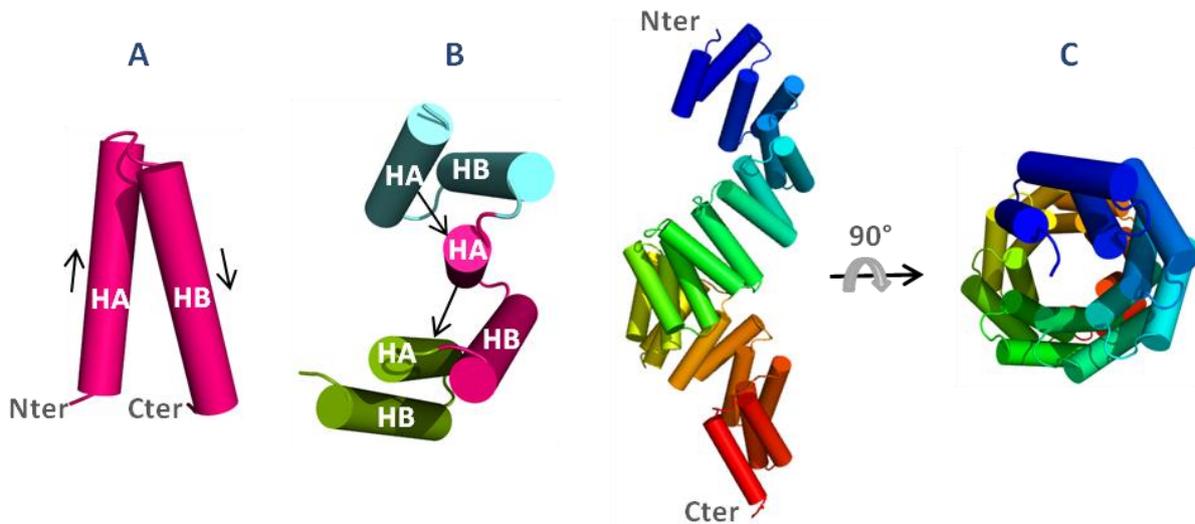


FIGURE 11: Caractéristiques structurales du motif TPR

- A.** Un motif TPR se compose de 2 hélices α antiparallèles HA et HB reliées par une boucle.
- B.** Les motifs TPR s'empilent pour former un module minimum dans lequel l'hélice HA d'un TPR interagit avec l'hélice HA du TPR suivant.
- C.** La structure globale d'un domaine TPR est une superhélice droite.

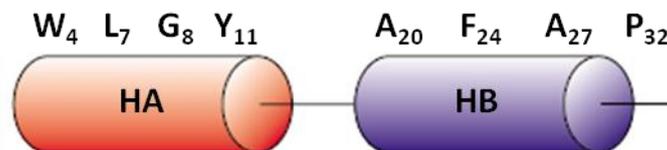


FIGURE 12: Séquence consensus du motif TPR

La séquence consensus du motif TPR est indiquée au dessus des HA et HB. Seules les positions G/A₈, A₂₀ et A₂₇ sont très conservées, alors que les autres positions ont une préférence pour des résidus hydrophobes petits ou grands.

Figure extraite de l'article : (D'Andrea and Regan 2003)

a) *Les motifs TPR*

Les motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat) sont retrouvés dans les 3 royaumes du vivant et permettent de médier les interactions protéines/protéines et les assemblages en multi complexe (Blatch and Lassle 1999). Un motif consiste en la répétition de 34 aa organisés en 2 hélices α , HA et HB, qui s'agencent de manière antiparallèle (**FIGURE 11-A**). L'unité fonctionnelle minimale comprend trois motifs répétés dont l'architecture est maintenue par des interactions entre l'hélice HA et son hélice HB ainsi que l'hélice HA du motif suivant (**FIGURE 11-B**). Un domaine TPR varie donc de 3 à plus de 16 motifs qui se répètent avec un angle d'empilement de 24° générant ainsi une structure globale du domaine TPR en super hélice (**FIGURE 11-C**) (Das, Cohen et al. 1998). Les 34 aa du motif ne présentent pas de séquence consensus stricte, mais plutôt une succession de résidus hydrophobes à des positions conservées comme l'indique la **FIGURE 12** ci-contre (D'Andrea and Regan 2003). Les motifs TPR sont d'autant plus versatiles que l'insertion de résidus pouvant allonger la taille des hélices ou des boucles, ne modifie pas l'architecture du domaine (D'Andrea and Regan 2003). Ainsi, le programme de prédiction TPRpred (Karpenahalli, Lupas et al. 2007) ne reconnaît pas dans la séquence de PrgX les motifs TPR pourtant révélés par sa structure 3D.

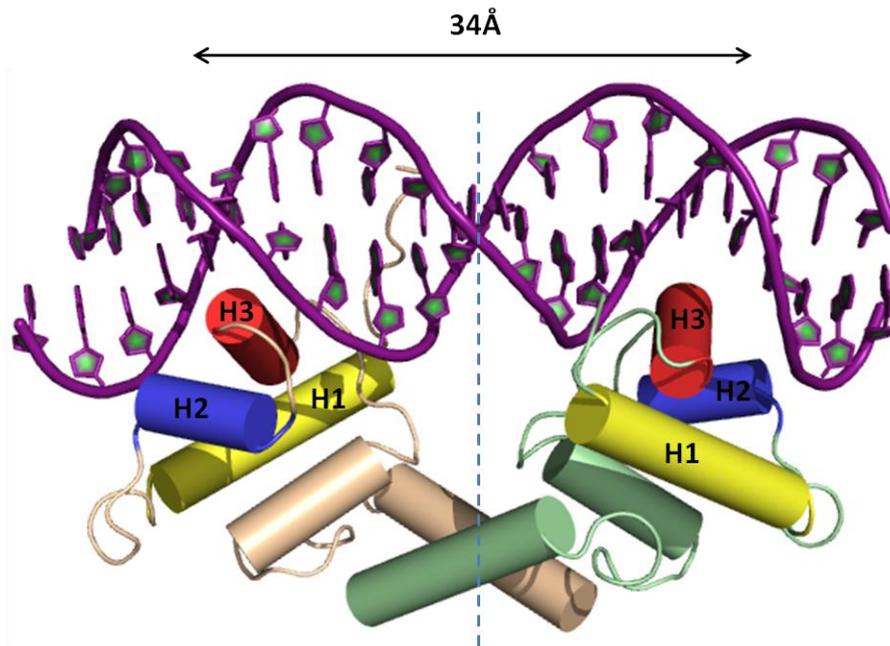


FIGURE 13: Caractéristiques structurales des domaines à motif HTH

Le motif HTH consiste en deux petites hélices α , H2 (bleu) et H3 (rouge) orthogonales et reliées par un tour. L'hélice H1 (jaune) stabilise le motif HTH en formant un cœur hydrophobe avec les hélices H2 et H3. L'hélice H3 interagit spécifiquement avec la double hélice d'ADN en s'insérant au niveau d'un grand sillon. Ces domaines fonctionnent en tandem et reconnaissent des séquences d'ADN palindromiques ou pseudo-palindromiques. Le complexe Cro/ADN a été ici pris comme exemple (code PDB : 3CRO).

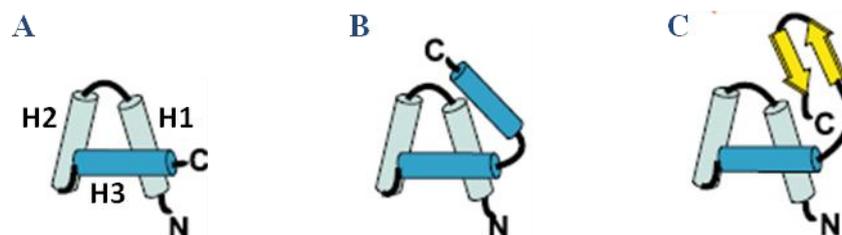


FIGURE 14: Les trois grandes classes de domaines HTH

A. Domaine HTH à 3 hélices α : ne comprend que l'architecture minimale conservée composée des hélices H1, H2 et H3. **B.** Domaine HTH avec extension d'hélices α : comprend le cœur conservé ainsi que 1 à 2 hélices α supplémentaires. **C.** Domaine HTH avec extension de brins β : comprend le cœur conservé ainsi que 1 à plusieurs unités de brins β .

b) Les domaines à motif HTH

Le motif HTH (Hélice-Tour-Hélice) existe chez les 3 royaumes du vivant mais est surtout répandu chez les procaryotes et permet de médier les interactions protéines/ADN (Wintjens and Rooman 1996). L'architecture minimale du domaine consiste en l'association de 3 petites hélices α (H1, H2 et H3) qui forment un cœur hydrophobe et où le motif est représenté par les hélices H2 et H3. L'hélice H3 correspond à l'hélice de reconnaissance, cette dernière s'insère dans le grand sillon de l'ADN où elle interagit spécifiquement avec les bases exposées (Aravind, Anantharaman et al. 2005). En dépit d'une grande diversité de séquence, il existe quelques éléments conservés, le plus caractéristique étant le motif « shs » situé dans le tour entre les hélices H2 et H3, où « s » représente un petit résidu (très souvent une Glycine) et « h » un résidu hydrophobe. En plus de cette signature, on note la conservation de résidus hydrophobes dans les hélices H1, H2 et H3 et qui forment le cœur hydrophobe stabilisant le domaine (Aravind, Anantharaman et al. 2005). Les domaines HTH fonctionnent en tandem pour reconnaître des séquences d'ADN palindromiques sur lesquelles ils se fixent au niveau de deux grands sillons consécutifs ([FIGURE 13](#)). Les unités fonctionnelles des facteurs de transcription à domaine HTH sont donc des dimères (Pabo and Sauer 1984). Il existe 3 grandes classes de domaines HTH ([FIGURE 14](#)) : les domaines basiques, composés uniquement du paquet de 3 hélices (H1, H2 et H3), les domaines avec des extensions d'hélices, composés du domaine basique auquel s'ajoutent 1 à 2 hélices α supplémentaires et enfin, les domaines avec des extensions de brins β , composés du domaine basique auquel s'ajoutent des unités de brins β structurés en épingle à cheveux (Aravind, Anantharaman et al. 2005). Au sein de ces classes, on distingue diverses sous familles. Les facteurs de transcription de la famille RNPP présentent des domaines HTH de la classe des domaines à extension d'hélices α et apparenté à la famille Cro (PROSITE) dont le membre représentatif est le facteur de transcription Cro issu du phage 434 (Wintjens and Rooman 1996). Il s'agit d'un domaine de 50 à 60 résidus souvent situé en Nter et composé de 4 à 5 hélices α .

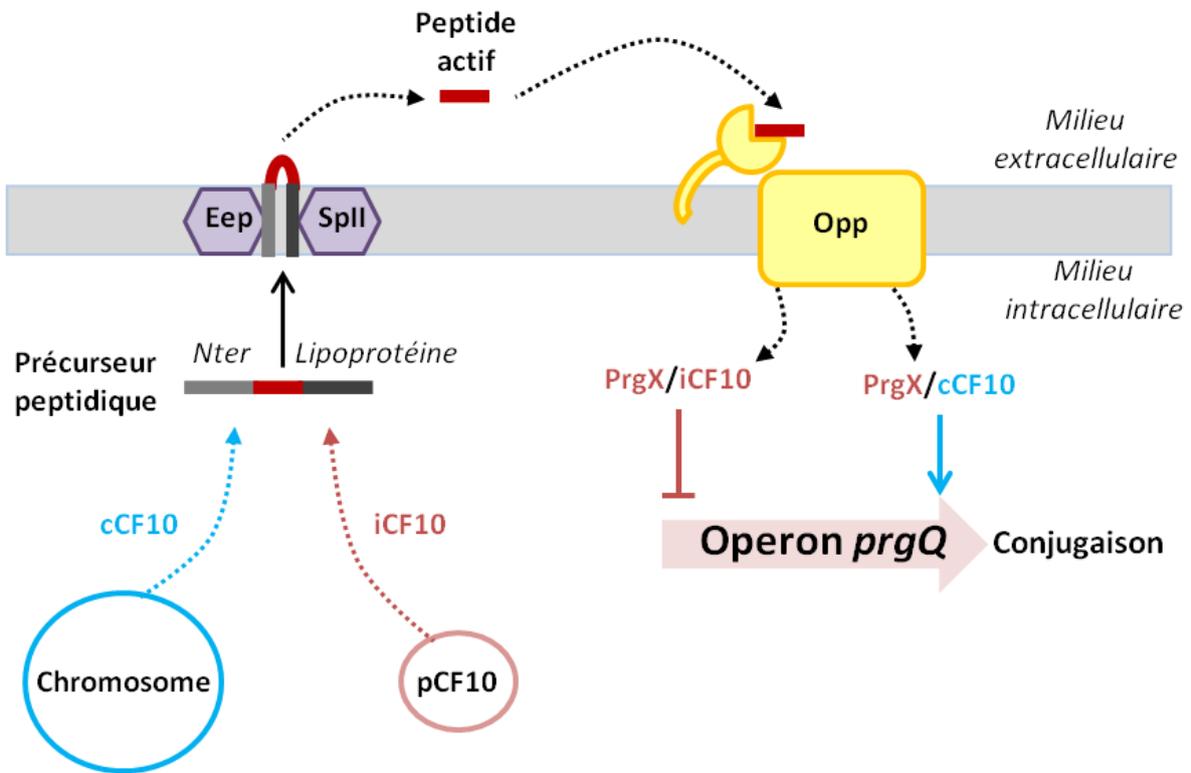


FIGURE 15: Régulation de la conjugaison du plasmide pCF10 chez *E. faecalis*

Le chromosome bactérien exprime le peptide cCF10 alors que le plasmide pCF10 exprime le facteur de transcription PrgX et le peptide inhibiteur iCF10 de l'opéron *prgQ*. Les deux précurseurs peptidiques sont clivés par les protéases transmembranaires Eep et SpII pour être sécrétés sous une forme active, reconnue et réimportée par les oligopeptides perméases (Opp). Les peptides réimportés interagissent avec l'effecteur PrgX. Le complexe PrgX/iCF10 réprime l'expression de l'opéron *prgQ* nécessaire au processus de conjugaison, alors que le complexe PrgX/cCF10 lève la répression.

2. Les membres

a) *PrgX et ses peptides cCF10 et iCF10*

Les bactéries *Entérocoques* sont connues pour leur propension à acquérir et disséminer des facteurs de résistance aux antibiotiques par transfert conjugatif de plasmides (Clewell 1990) (Dunny and Leonard 1997). Chez *Enterococcus faecalis*, PrgX régule la conjugaison du plasmide pCF10 porteur de la résistance à la tétracycline. Le plasmide pCF10 contient également l'opéron *prgQ* (pheromone responsive genes) comprenant les gènes impliqués dans la conjugaison, ainsi que les gènes codant pour PrgX, répresseur constitutif de l'opéron *prgQ*, et iCF10, l'un de ces peptides de signalisation (Dunny and Leonard 1997). Un second peptide spécifique de PrgX, appelé cCF10, est codé par le chromosome bactérien (Dunny and Leonard 1997). Les cellules dépourvues du plasmide pCF10 sont appelées cellules réceptrices. La production et la sécrétion par ces dernières du peptide cCF10 déclenche une réponse chez les cellules possédant le plasmide pCF10, appelées cellules donneuses. En effet, une fois réimporté par la cellule donneuse, le peptide cCF10 interagit directement avec le facteur de transcription PrgX, levant la répression de l'opéron *prgQ* et permettant alors la conjugaison (Chandler and Dunny 2004). La production par le plasmide du peptide iCF10 (AITLIFI), antagoniste de cCF10 (LVTLVFFV) par interaction compétitive avec PrgX, permet de limiter les mécanismes d'auto-induction chez les cellules donneuses et d'éviter ainsi le processus de conjugaison en absence de cellules réceptrices (Nakayama, Ruhfel et al. 1994) (Kozlowicz, Shi et al. 2006). Les peptides cCF10 et iCF10 sont très hydrophobes et leurs précurseurs font partie intégrante des séquences signal appartenant à des lipoprotéines de surface (Clewell, An et al. 2000) (Chandler and Dunny 2004). Les précurseurs sont donc transloqués à la membrane où ils subissent deux clivages. Une signal peptidase de type II clive le peptide en Cter libérant ainsi les 12 à 16 résidus premier résidus (Thoendel and Horswill 2010). Finalement la protéase membranaire Eep exécute un second clivage en Nter pour libérer le peptide mature, non modifié, de 7 aa, qui est par la suite réimporté par les systèmes Opp, **FIGURE 15** ci-contre (Chandler and Dunny 2008)

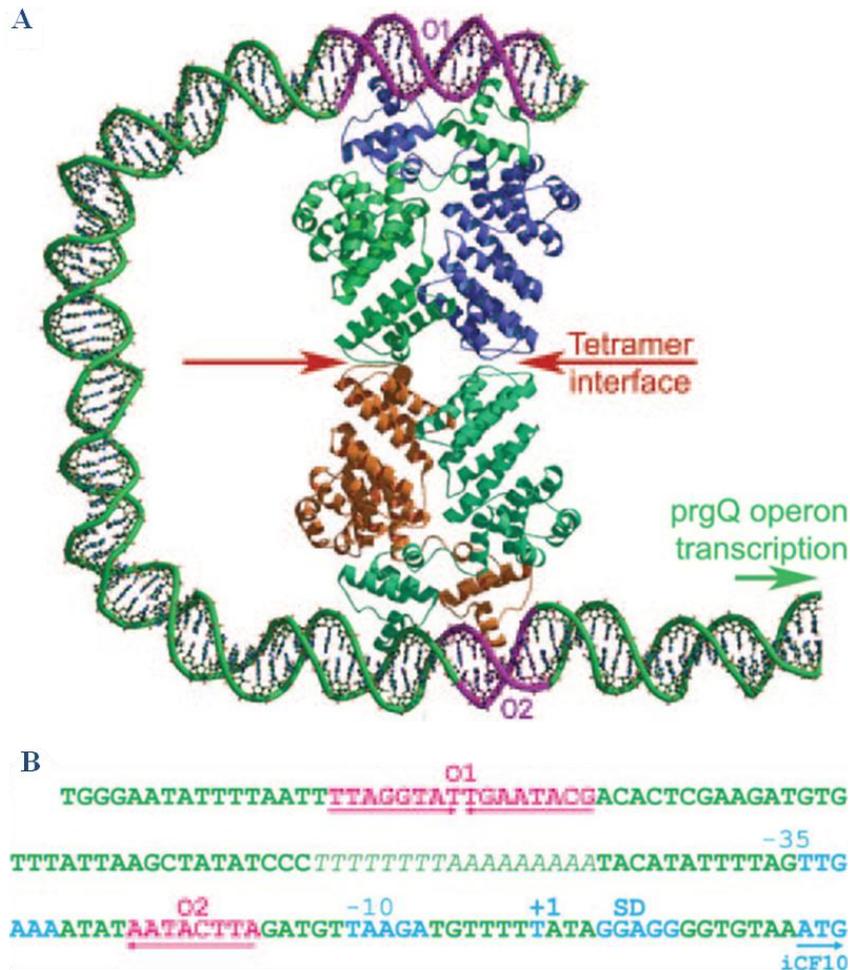


FIGURE 16: Modèle de répression de l'opéron *prgQ* par PrgX

A. Modèle d'interaction du tétramère PrgX, représenté en cartoon et coloré par chaîne, avec les opérateurs O1 et O2 distants de 70 pb sur le plasmide pCF10. La zone d'interaction entre les deux dimères (interface de tétramérisation) est indiquée par des flèches rouges. La double hélice d'ADN, supposée faire une boucle autour de l'effecteur, est représentée en cartoon et colorée en vert.

B. Région intergénique du plasmide pCF10 contenant les sites opérateurs O1 et O2 ciblés par PrgX, en amont de l'opéron *prgQ*. Les boîtes -10 et -35 sont indiquées ainsi que la position +1 et la séquence Shine-Dalgarno (SD).

Figure extraite de l'article : (Shi, Brown et al. 2005)

INRODUCTION

PrgX est une protéine de 33kDa possédant un domaine de liaison à l'ADN à motif HTH en Nter, et un domaine de régulation en Cter composé de 12 hélices α organisées structurellement en 6 motifs TPR (Shi, Brown et al. 2005) (Declerck, Bouillaut et al. 2007). L'étude structurale de PrgX a révélé une conformation Apo sous forme tétramérique (code PDB : 2AXU), où deux dimères typiques de facteurs de transcription à motif HTH sont associés via leurs extrémités Cter (au niveau du dernier motif TPR) (Shi, Brown et al. 2005). Cette organisation permet à PrgX de se fixer sur pCF10 au niveau de deux sites, ce qui pourrait contraindre l'ADN à former une boucle autour du tétramère de PrgX, voir [FIGURE 16-A](#) ci-contre (Bae, Kozlowicz et al. 2002) (Shi, Brown et al. 2005). En effet, plusieurs sites de fixation de PrgX ont été identifiés sur pCF10 dans la région intergénique entre *prgX* et *prgQ* : le site palindromique O1 pour lequel PrgX présente une forte affinité et le site O2 qui ne contient qu'un demi-site de reconnaissance se trouvant entre les régions -35 et -10 du promoteur *prgQ* ([FIGURE 16-B](#)). PrgX interagit donc avec l'ADN sous la forme d'un tétramère où la fixation d'un premier dimère de PrgX sur O1 augmente l'affinité d'un second dimère pour O2, réprimant ainsi l'expression de *prgQ*.

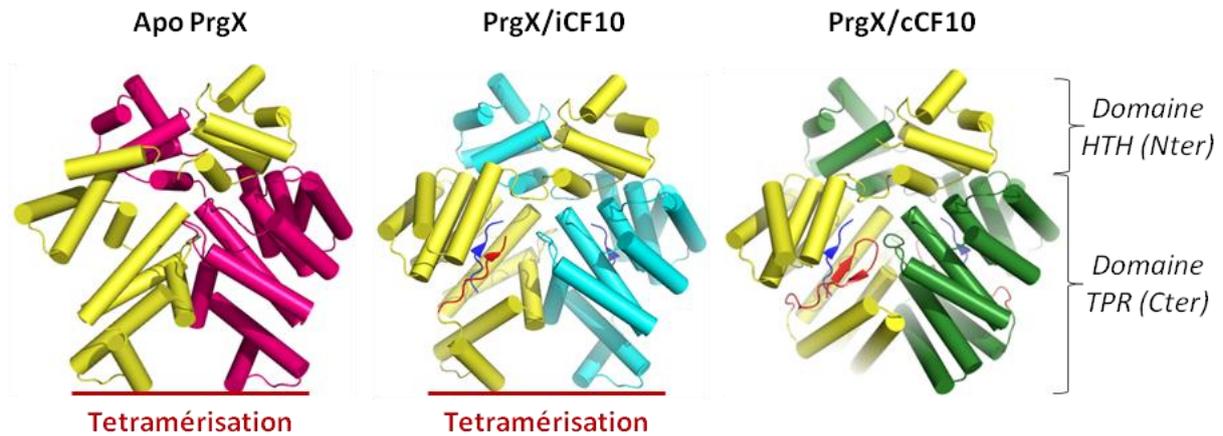


FIGURE 17: Mécanisme de régulation de l'activité de PrgX par ces peptides de signalisation

Les unités dimériques de PrgX dans sa conformation Apo, en complexe avec iCF10 et en complexe avec cCF10 sont représentées en cartoon et coloré par chaîne. Les peptides iCF10 et cCF10 fixé sont représentés en cartoon et colorés en bleu. Les surfaces de tétramérisation des dimères Apo et du complexe PrgX/iCF10 sont indiquées en rouge. L'extrémité Cter de PrgX est déstructurée dans la forme Apo de PrgX, mais forme un brin β , coloré en rouge dans le complexe PrgX/iCF10. Dans le complexe PrgX/cCF10, la dernière hélice de PrgX, impliquée dans la formation du tétramère, complète le petit feuillet β formé par le peptide et l'extrémité C-terminal de PrgX.

La fixation du peptide cCF10 (code PDB : 2AXZ) induit une restructuration en 2 petits brins β de la dernière hélice α engagée dans l'interface de tétramérisation de PrgX. Ce changement de conformation résulte en la dissociation du tétramère de PrgX qui perd son affinité pour le site O2 et libère le promoteur, permettant ainsi la transcription du régulateur *prgQ* (Shi, Brown et al. 2005). La fixation de iCF10 (code PDB : 2GRM) dans la même poche de reconnaissance que cCF10 se fait *via* un jeu d'interactions différent, ce qui permet à PrgX de conserver sa structure tétramérique, et son activité de répresseur, voir [FIGURE 17](#) ci-contre (Kozlowicz, Shi et al. 2006).

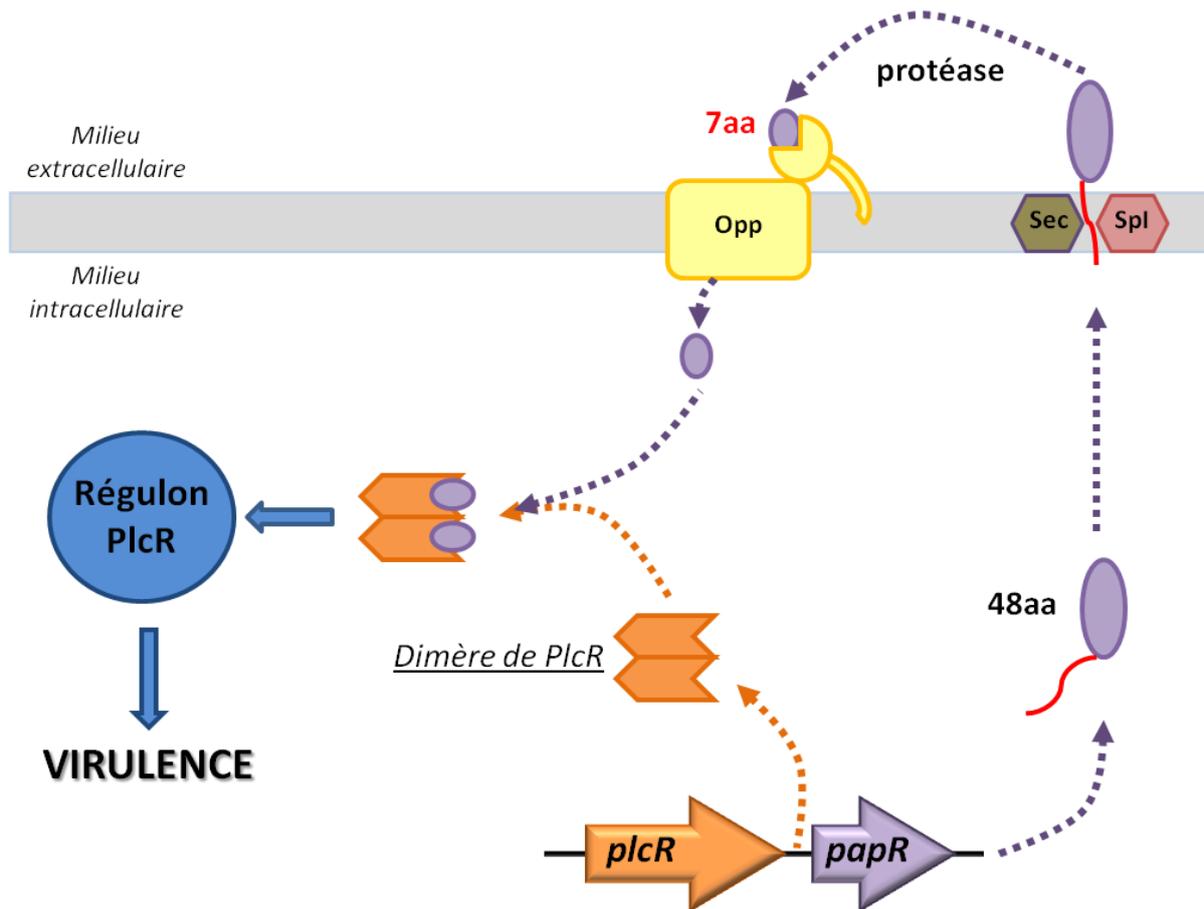


FIGURE 18: Régulation de la virulence bactérienne par le système PlcR/PapR

Les gènes *plcR* et *papR* sont représentés par des flèches colorées respectivement en orange et violet. Le peptide PapR est produit sous une forme précurseur de 48aa exportée par le système de sécrétion Sec. La séquence signal d'exportation du peptide, colorée en rouge, est clivée par la protéase membranaire SpI. Dans le milieu extracellulaire, PapR subit un second clivage, pour libérer une forme mature majoritaire de 7aa réimportée dans la cellule bactérienne par le système Opp. Une fois à l'intérieur de la cellule, le peptide interagit directement avec le dimère de PlcR, activant sa fonction facteur de transcription pour contrôler un régulon impliqué dans la virulence bactérienne.

b) *PlcR et son peptide PapR*

Chez *Bacillus cereus*, PlcR (Phospholipase C Regulator) est un facteur de transcription majeur impliqué dans la virulence bactérienne (Lereclus, Agaisse et al. 1996; Agaisse, Gominet et al. 1999). PlcR active sa propre expression et contrôle celle d'un régulon de 45 gènes qui codent notamment pour des facteurs de virulence sécrétés tels que des hémolysines ou encore des enterotoxines (Agaisse, Gominet et al. 1999) (Gohar, Okstad et al. 2002) (Gohar, Faegri et al. 2008). En début de phase stationnaire et en milieu riche, les produits des gènes du régulon PlcR représentent 80% du sécrétome de *Bc* (Gohar, Okstad et al. 2002). L'analyse des régions promotrices des gènes régulés révèle l'existence d'une séquence consensus palindromique hautement conservée qui représente le site de reconnaissance pour le facteur de transcription et est appelé la PlcR box : TATGNAN₄TNCATA (Agaisse, Gominet et al. 1999) (Slamti and Lereclus 2002). L'activité transcriptionnelle de PlcR est régulée par son peptide de signalisation PapR (Phospholipase activating peptide) (Slamti and Lereclus 2002). Le gène codant pour PlcR est directement suivi par le gène *papR* dont la délétion abolit l'expression du régulon PlcR ce qui a pour conséquence une diminution importante du pouvoir pathogène des bactéries (Agaisse, Gominet et al. 1999). Le gène *papR* code pour un précurseur de 48aa, dont la partie Nter correspond à une séquence signal d'exportation reconnu par le système de sécrétion Sec-A dépendant (Okstad, Gominet et al. 1999). Ainsi, un pro peptide de 27aa est libéré dans le milieu extracellulaire où il est à nouveau clivé par une protéase sécrétée, appelée NprB (Neutral protease B), pour être maturé sous la forme d'un heptapeptide non modifié, ADLPFEF, correspondant à l'extrémité Cter de PapR (Bouillaut, Perchat et al. 2008) (Pomerantsev, Pomerantseva et al. 2009). La forme mature de PapR est finalement réimportée dans la cellule bactérienne via le système Opp où elle interagit directement avec PlcR et active ainsi la fonction facteur de transcription de l'effecteur, voir **FIGURE 18** ci-contre (Gominet, Slamti et al. 2001) (Declerck, Bouillaut et al. 2007). Slamti et Lereclus ont également mis en évidence dans la cellule, deux autres formes actives minoritaires de PapR : une forme minimale de 5aa (LPFEF) et une forme plus longue de 9aa (LASDMPFEF).

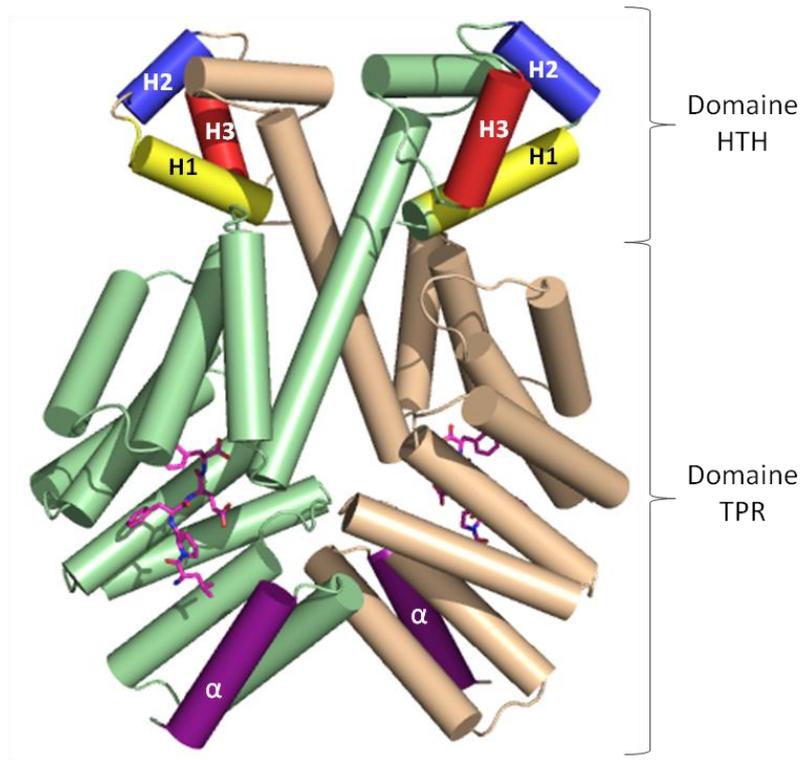


FIGURE 19: Structure du complexe PlcR/PapR5

Le dimère PlcR est représenté en cartoon et coloré par chaîne (vert et beige). La dernière hélice α qui coiffe le domaine TPR est colorée en violet. Les peptides PapR5 fixés au cœur des domaines TPR (1peptide/chaine) sont représentés en sticks et colorés en fuchsia. Les hélices H1 et H2 du domaine HTH sont respectivement colorées en jaune et bleu. L'hélice de reconnaissance de l'ADN H3 colorée en rouge n'est pas orientée correctement pour interagir avec l'ADN. Cette structure du complexe est dans une conformation inactive.

INTRODUCTION

PlcR est une protéine de 34 kDa, son domaine HTH est directement lié au premier motif TPR. Le TPR1 présente une hélice HA plus longue que les autres hélices du domaine. Ce dernier se compose de 5 motifs TPRs et est coiffé d'une hélice α en Cter (Declerck, Bouillaut et al. 2007). La structure cristalline de PlcR en complexe avec la forme minimale active PapR5 (code PDB : 2QFC) révèle un dimère dans lequel les domaines HTH de l'effecteur ne sont pas dans une orientation compatible avec la fixation de l'ADN, [FIGURE 19](#) ci-contre (Declerck, Bouillaut et al. 2007). Des expériences de SAXS (Small Angles Xray Scattering) sur les formes complexées de PlcR avec, respectivement, PapR5 et PapR7, ont permis de confirmer la structure cristalline du complexe PlcR/PapR5 en solution et démontre que le complexe PlcR/PapR7 conserve la même structure que PlcR/PapR5. L'étude de la forme Apo-PlcR par SAXS a montré qu'en absence de PapR, PlcR est dimérique et pourrait avoir une structure proche de celle du complexe avec le peptide mais qui diffèrerait par un réarrangement des domaines HTH (Declerck, Bouillaut et al. 2007). Ces premiers résultats structuraux n'ont pas permis d'élucider clairement le mécanisme d'activation de PlcR par PapR, une étude structurale complémentaire est actuellement en cours au laboratoire.

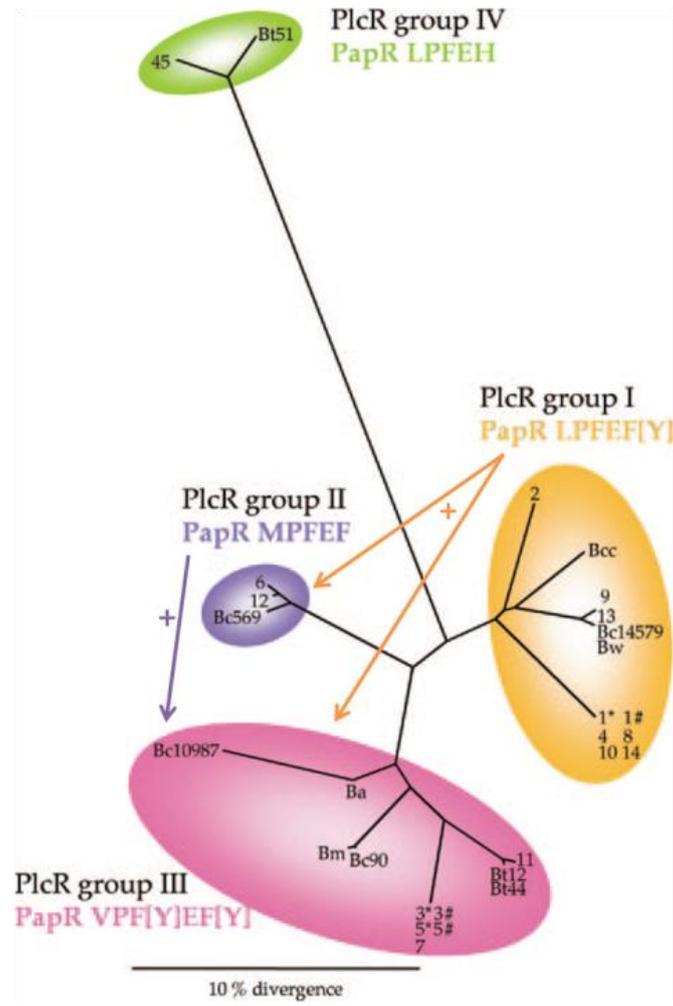


FIGURE 20: Activations croisées dans le système PlcR/PapR

Les effecteurs PlcR des groupes I et IV (colorés en orange et vert) ne sont pas sujets à des activations croisées. Le groupe II (en violet) peut être activé par les peptides PapR du groupe I. Le groupe III (en rose), moins sélectif, peut être activé par les peptides des groupes I et II.

Figure extraite de l'article : (Bouillaut, Perchat et al. 2008)

INRODUCTION

Des analyses phylogénétiques ont permis de classer les systèmes PlcR/PapR en quatre groupes spécifiques : le groupe I auquel appartient le système PlcR/PapR étudié, et les groupes II, III et IV (Slamti and Lereclus 2005). Des tests d'activité in-vivo chez une souche mutante *Bt407* ($\Delta plcR \Delta papR$) ont permis de mettre en évidence des phénomènes d'activation croisées entre certains groupes (Bouillaut, Perchat et al. 2008). En effet, alors que PlcR-I et PlcR-IV sont strictement activés par leur peptides apparentés PapR-I et PapR-IV respectivement, PlcR-II peut être activé par PapR-I et PlcR-III quant à lui peut être activé à la fois par PapR-I et PapR-II, voir [FIGURE 20](#) ci-contre.

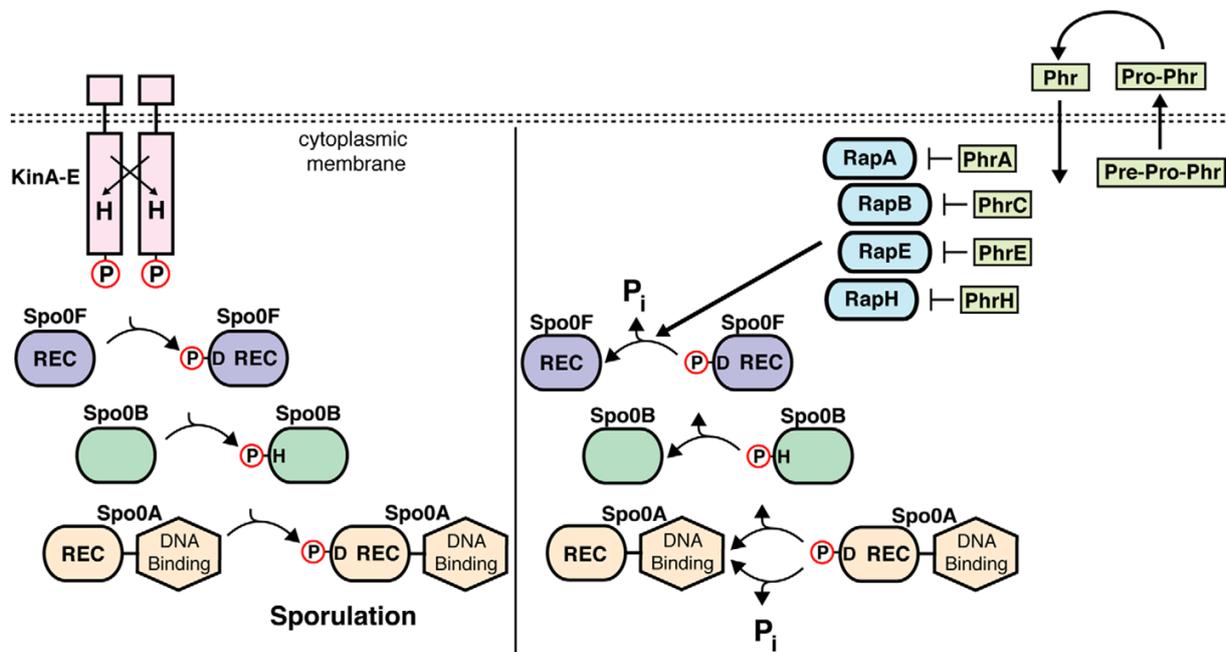


FIGURE 21: Régulation de l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis*

L'initiation du processus de sporulation (partie gauche de la figure) est régulée par un phosphorelais Histidine-Aspartate (système HAP), mettant en jeu des récepteurs membranaires à activité Histidine kinase (KinA-E en rose), les deux phosphorelais Spo0F (en violet) et Spo0B (en vert) et un régulateur transcriptionnel Spo0A activé par phosphorylation. Les protéines Rap A, B, E et H (bleu ciel) ciblent Spo0F pour interrompre la cascade de phosphorylation et empêcher ainsi l'activation de Spo0A (partie droite de la figure). L'activité des Rap est inhibée par leur peptide de signalisation Phr respectif. Rap B ne possède pas de PhrB et est régulé par PhrC.

Figure extraite de l'article : (Parashar, Mirouze et al. 2011)

c) *Les Rap et leurs peptides Phr*

Bacillus subtilis est une souche modèle chez laquelle les systèmes Rap/Phr sont le plus étudiés. Les protéines Rap (Response-regulator aspartate phosphatases) sont au nombre de 11 (RapA→K) et présentent diverses fonctions impliquées dans différents processus bactériens comme la sporulation et la compétence (Dunny and Leonard 1997). L'activité des Rap est négativement régulée par les peptides de signalisation de la famille des Phr (Phosphatases regulator) (Perego and Brannigan 2001).

Chez *Bacillus subtilis*, l'initiation de la sporulation se fait à travers un système de transduction du signal à plusieurs composants (Perego and Hoch 1996) mettant en jeu:

- Cinq récepteurs membranaires à activité histidine kinase (KinA→E)
- Deux phosphorelais (Spo0F et Spo0B)
- Un régulateur transcriptionnel activé après phosphorylation (Spo0A)

Spo0A est un facteur de transcription qui une fois phosphorylé active l'expression du régulons *spoIIA* comprenant les gènes essentiels à l'initiation de la sporulation (Sonenshein 2000). Le taux de Spo0A-P est contrôlé par deux activités antagonistes : les kinases qui favorisent la phosphorylation du régulateur et les phosphatases qui induisent sa déphosphorylation. Chez *B. subtilis*, les protéines Rap A, B, E et H sont des P-Asp phosphatases qui déphosphorylent spécifiquement Spo0F-P (Perego and Brannigan 2001). Ces phosphatases empêchent les bactéries d'entrer en sporulation mais lorsque le quorum sensing est atteint, les Rap sont inhibées par leur peptides Phr et les bactéries peuvent alors entrer en sporulation, voir [FIGURE 21](#) ci-contre (Perego and Hoch 1996).

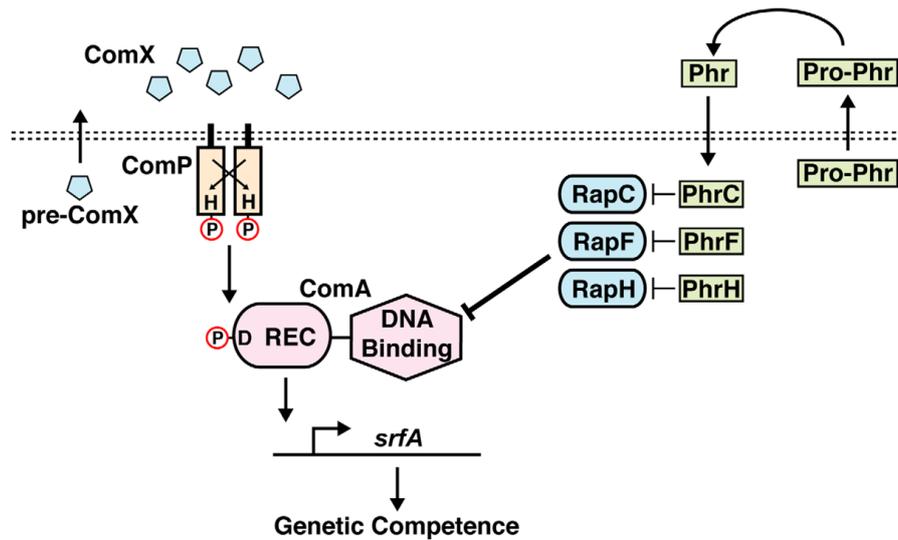


FIGURE 22: Régulation de la compétence chez *B. subtilis*

Chez *B. subtilis*, le processus de compétence est initié par le système quorum sensing indirect de type HAP, ComA/ComP/ComX. Le peptide de signalisation ComX est reconnu par le récepteur membranaire à activité histidine kinase ComP. Ce dernier s'autophosphoryle puis transfère son phosphate au domaine REC du facteur de transcription ComA qui régule l'expression de l'opéron *srfA* impliqué dans la synthèse de la surfactine (antibiotique) et le développement de la compétence génétique. Les protéines RapC, F et H régulent négativement ComA en séquestrant son domaine de fixation à l'ADN. Les Rap sont elles-mêmes inhibées par leurs peptides de signalisation respectifs PhrC, F et H.

Figure extraite de l'article : (Baker and Neiditch 2011)

INTRODUCTION

La compétence est un processus biologique antérieur et qualifié d'antagoniste à la sporulation (Dubnau 1991) (Perego, Hanstein et al. 1994). Chez *B. subtilis*, la compétence est régulé positivement par un système de quorum sensing indirect, ComA/ComP/ComX (Dubnau, Hahn et al. 1994), et négativement par un système de quorum sensing direct Rap/Phr (Solomon, Lazazzera et al. 1996). Le système ComA/ComP/ComX implique un peptide de signalisation secrété ComX, reconnu par un récepteur transmembranaire à activité histidine kinase ComP. En réponse à l'interaction avec le peptide, ComP s'autophosphoryle et transfère son phosphate à ComA (Solomon, Magnuson et al. 1995). Le régulateur transcriptionnel ainsi activé ComA-P, induit l'expression de gènes nécessaires à la compétence. Le système Rap/Phr comprend les Rap C, F et H et leurs peptides apparentés PhrC, PhrF et PhrH et ont pour cible ComA, voir [FIGURE 22](#) ci-contre (Bongiorni, Ishikawa et al. 2005) (Smits, Bongiorni et al. 2007). Les complexes Rap/ComA préviennent la fixation de ComA à l'ADN et inhibent ainsi son activité facteur de transcription (Core and Perego 2003) (Baker and Neiditch 2011).

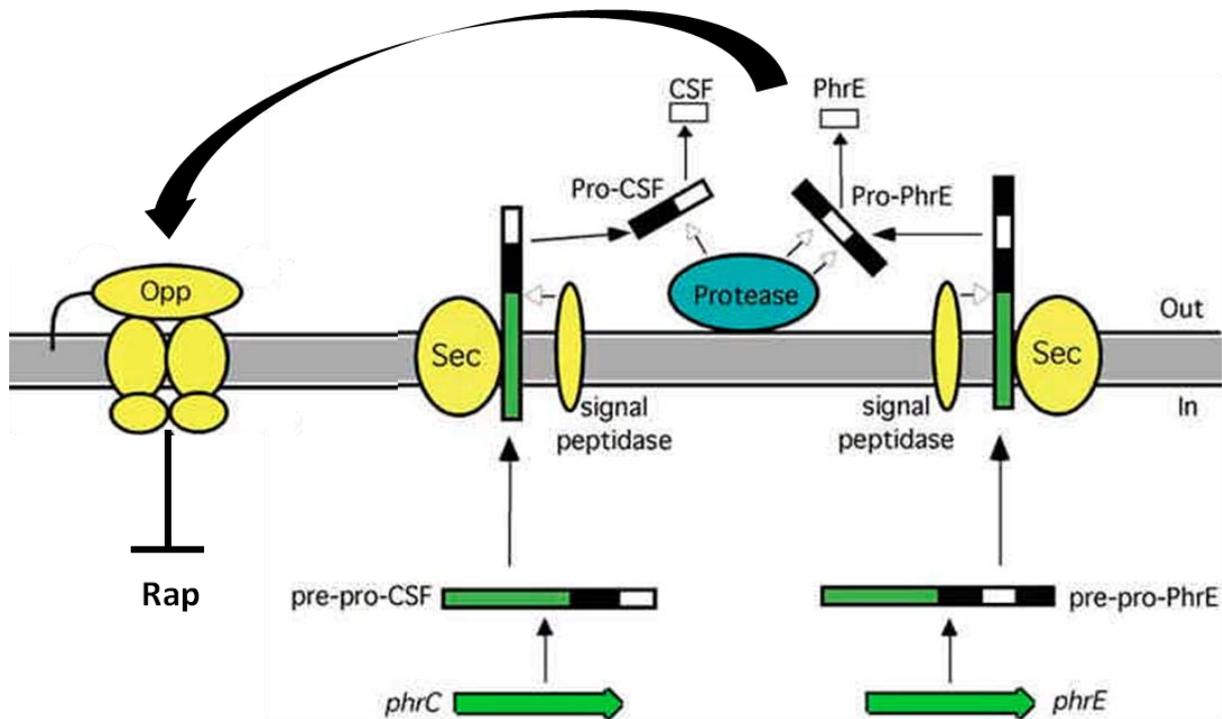


FIGURE 23 : Maturation des peptides Phr

Les pré-pro-peptides Phr sont exportés par le système Sec. Leur séquence d'exportation (en vert) est clivée par une signal peptidase. Les pro-peptides sont maturés dans le milieu extérieur par des protéases extracellulaires qui libèrent leur séquence active (en blanc). Les peptides ainsi maturés sont réimportés par le système Opp à l'intérieur de la cellule où ils ciblent leur protéine Rap spécifique qu'ils inhibent. La majorité des Phr, tel PhrC aussi appelé CSF, présente leur séquence active en Cter, Le peptide PhrE a la particularité de ne pas avoir sa séquence active à l'extrémité de la chaîne peptidique.

Figure adaptée de l'article : (Pottathil and Lazazzera 2003)

INRODUCTION

Les précurseurs des Phr font de 38 à 44 aa et leur partie Nter correspond à une séquence signal d'exportation prise en charge par la voie d'export Sec-dépendante (Pottathil and Lazizzera 2003). Entre la partie Nter et Cter du pré-pro-peptide se trouve un site de clivage de type AxA caractéristique des Signal peptidases de Type I (Stephenson, Mueller et al. 2003; Thoendel and Horswill 2010). La portion Cter sécrétée, le pro-peptide, est ensuite clivée par des protéases à Sérine extracellulaires telles que la Subtilisine, et les protéases Epr et Vpr, pour libérer la forme mature du peptide de 5 à 6 aa (Lanigan-Gerdes, Dooley et al. 2007) (Thoendel and Horswill 2010). Les Phr ainsi maturés et n'ayant subi aucune modification post-traductionnelle sont ensuite réimportés, au moyen du système Opp, à l'intérieur des cellules où ils interagissent avec leurs protéines Rap apparentées pour les inhiber, voir [**FIGURE 23**](#) ci-contre.

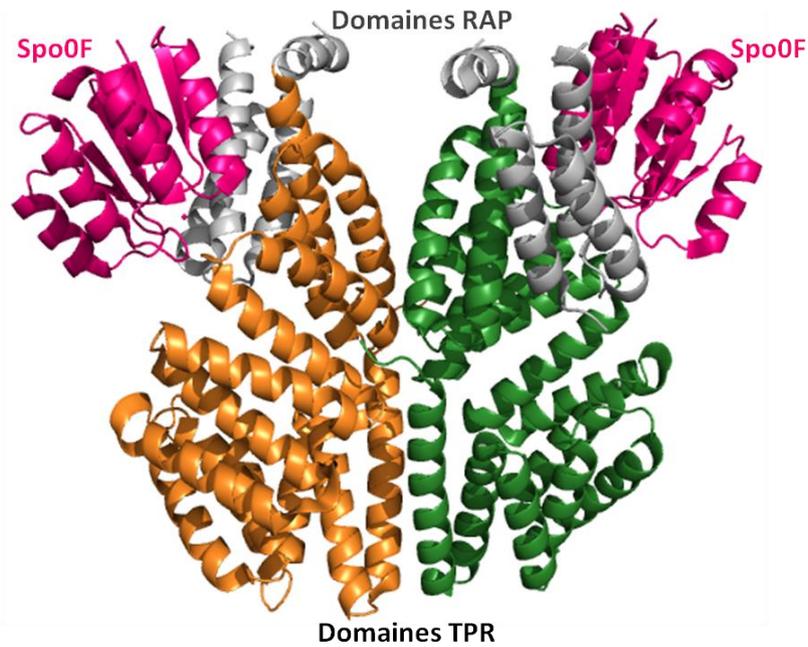


FIGURE 24: Structure du complexe RapH/Spo0F

Le dimère RapH est représenté en cartoon et coloré par chaîne (orange et vert), les domaines RAP sont colorés en gris. Le partenaire Spo0F est représenté en cartoon et coloré en fuchsia, ce dernier interagit essentiellement avec le domaine RAP.

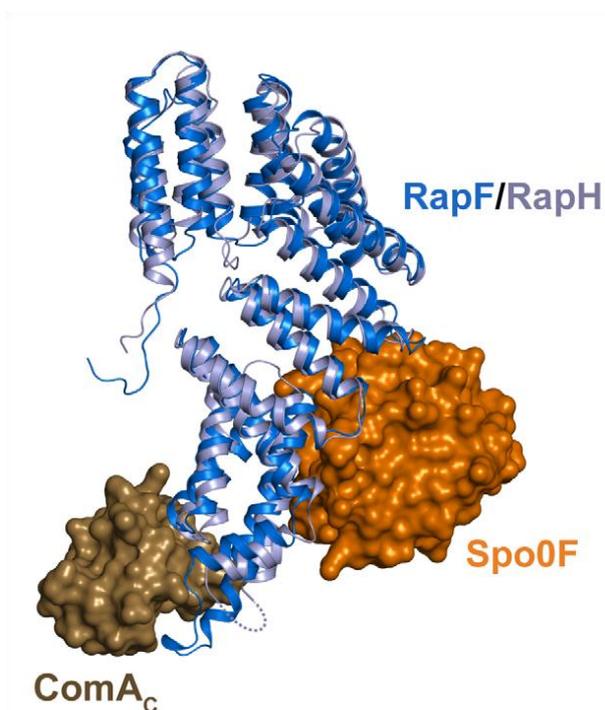


FIGURE 25: Une structure conservée entre RapH et RapF

Les chaînes RapF (bleu) et RapH (gris) sont représentées en cartoon. Leur superposition révèle une structure conservée. Les surfaces d'interaction avec leurs cibles respectives, ComAc (surface marron) et Spo0F (surface orange) sont différentes.

Figure extraite de l'article : (Baker and Neiditch 2011)

INRODUCTION

Ce n'est que récemment que les Rap ont commencé à être étudiées à un niveau structural. En 2011, la structure du complexe RapH/Spo0F (code PDB : 3Q15) de *B. subtilis* a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action des Rap phosphatases sur le processus de sporulation (Parashar, Mirouze et al. 2011). La structure globale d'un monomère de RapH (44kDa) se compose d'un domaine Nter (domaine RAP) composé de 3 hélices α antiparallèles suivies d'un linker flexible et d'une 4^{ème} petite hélice α connectée au domaine Cter composé de 7 motifs TPR (Parashar, Mirouze et al. 2011) (D'Andrea and Regan 2003). RapH forme un dimère ou chaque protomère est en interaction avec un monomère de Spo0F, voir [FIGURE 24](#) ci contre. Bien que le complexe ait été cristallisé avec Spo0F sous sa forme non phosphorylé, cette étude structurale combinée à une analyse par mutagénèse a permis d'identifier les résidus essentiels à l'activité phosphatase (Parashar, Mirouze et al. 2011). La surface d'interaction mise en jeu par Spo0F dans le complexe avec RapH étant identique à celle impliquée dans les complexes Spo0F/recepteurs kinase et Spo0F/Spo0B, une activité de séquestration a également été proposée pour expliquer l'activité de RapH (Parashar, Mirouze et al. 2011). Cette activité de séquestration a par la suite été décrite au niveau structural pour RapF (46kDa) dont l'architecture est identique à RapH. En effet, la structure du complexe RapF/ComAc (code PDB : 3ULQ), où ComAc correspond au domaine HTH du facteur de transcription ComA, montre que la surface de RapF impliquée dans l'interaction mime l'ADN pour inhiber ComA (Baker and Neiditch 2011). RapF et RapH interagissent avec leurs protéines cible respectives principalement via leur domaine RAP bien que les zones d'interaction soient différentes, voir [FIGURE 25](#) ci-contre. A ce jour, il n'existe pas de structure résolue de complexe Rap/Phr et le mécanisme d'inhibition des Rap par les Phr est encore incompréhensible.

d) *NprR et son peptide NprX*

Au démarrage de ma thèse, les effecteurs Rap, PlcR et PrgX étaient bien documentés sur le plan fonctionnel et seuls les systèmes PlcR/PapR et PrgX/cCF10/iCF10 étaient décrits à un niveau structural alors que le système NprR/NprX était très peu connu. L'analyse de séquence des RNPP montre que NprR s'organise en trois domaines: un domaine HTH en Nter commun à PlcR et PrgX, un domaine central que l'on retrouve chez les Rap (le domaine RAP) et un domaine TPR à 7 motifs en Cter. Ces observations suggèrent que NprR pourrait posséder deux activités fonctionnelles : une activité facteur de transcription portée par son domaine HTH et une activité commune au Rap. Les premières analyses fonctionnelles de nos collaborateurs (Unité de génétique microbienne et environnement, INRA) ont permis de conforter cette hypothèse.

Comme PlcR, NprR se retrouve uniquement dans le groupe bactérien *B. cereus*. Les gènes *nprR* et *nprX* sont organisés en cassette et sont suivis par le gène *nprA* qui code pour une métalloprotéase sécrétée, décrite comme un facteur de virulence capable de cliver des composants tissulaires tels que la fibronéctine, la lamine et le collagène (Chung, Popova et al. 2006). Dans des conditions favorisant la sporulation, NprA et InhA1 (une autre métalloprotéase) représentent 90% du sécrétome de *B. anthracis* et il a été montré que NprA est nécessaire aux spores pour échapper aux macrophages (Chitlaru, Gat et al. 2006). Plus généralement, on retrouve NprA dans les surnageant de cultures des souches *B. cereus*, à l'exception de la souche *B. cereus ATCC 14579* dans laquelle le gène *nprR* est interrompu (Ivanova, Sorokin et al. 2003; Gohar, Gilois et al. 2005). Nos collaborateurs ont donc cherché à vérifier si l'expression de *nprA* était bien sous le contrôle du système NprR/NprX. Par des expériences de complémentation sur la souche mutante *Bt 407 (ΔnprRΔnprX)* où les gènes *nprR* et *nprX* ont été délétés, ils ont montré que l'expression de *nprA* en milieu favorisant la sporulation, n'est rétablie qu'en présence du système complet NprR/NprX, en effet, la complémentation par un vecteur portant uniquement le gène *nprR* ou le gène *nprX* n'induit pas l'expression de *nprA* (Perchat, Dubois et al. 2011). Depuis, il a été montré que le système NprR/NprX régule de manière directe ou indirecte 41 gènes impliqués dans la résistance au stress, l'import de peptides (système Opp) et dans la virulence bactérienne (enzymes dégradatives, toxines ...) (Dubois, Faegri et al. 2012).

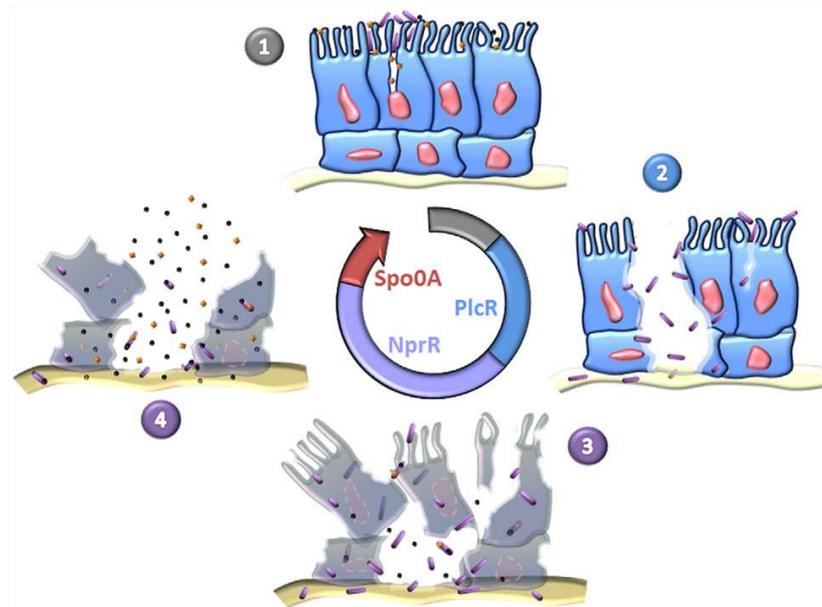


FIGURE 26: Cycle infectieux de *B. thuringiensis*

Phase 1 : après ingestion par l'insecte, les spores atteignent l'épithélium intestinal où elles induisent la lyse des cellules pour favoriser le processus de germination. **Phase 2** : Le facteur de transcription PlcR est activé, les facteurs de virulence produits attaquent la barrière intestinale pour accéder à la circulation sanguine et aux tissus profonds. **Phase3** : Le facteur de transcription NprR est activé, les facteurs produits dégradent les tissus pour survivre dans l'insecte mort jusqu'à sporulation. **Phase4** : Les spores sont disséminées dans l'environnement.

Figure extraite de l'article : (Dubois, Faegri et al. 2012)

INRODUCTION

B. thuringiensis est une souche pathogène pour les insectes. PlcR représente le régulateur transcriptionnel principal en début de phase stationnaire dans un milieu riche où il contrôle l'expression de gènes impliqués dans la virulence bactérienne et qui provoquent la mort de l'hôte. A contrario, NprR devient le régulateur transcriptionnel majeur en fin de phase stationnaire dans un milieu favorisant la sporulation et permet à *Bt* de survivre après la mort de l'insecte (Dubois, Faegri et al. 2012). En effet, le régulons *nprR* comprend des enzymes dégradatives telles que NprA mais également des chitinases qui dégradent l'exosquelette des insectes et permettent ainsi la dissémination des spores de *Bt* dans l'environnement (Dubois, Faegri et al. 2012), [FIGURE 26](#) ci-contre.

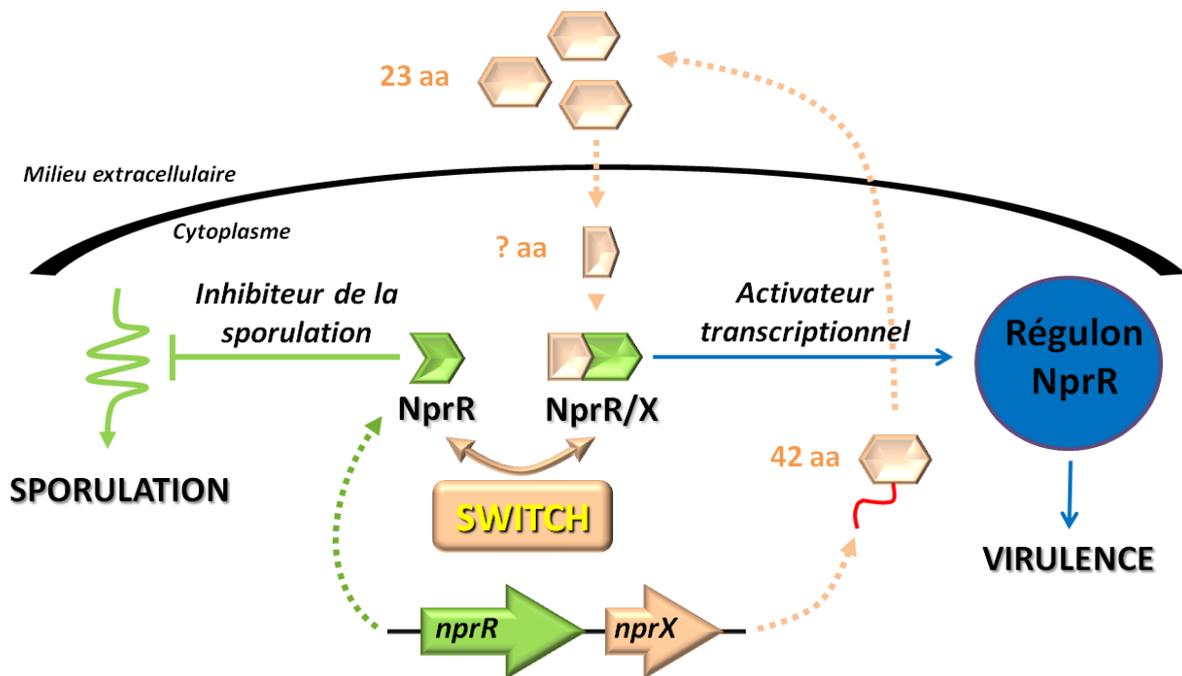


FIGURE 27: Régulation par le système NprR/NprX chez *B. cereus*

Les gènes *nprR* et *nprX* sont représentés respectivement par des flèches de couleur verte et beige. Le pré-pro-peptide NprX de 42aa est sécrété après coupure de sa séquence d'exportation (en rouge). Le pro-peptide libéré dans le milieu extracellulaire, qui fait 23aa, est réimporté dans la cellule sous une forme mature qui reste encore à caractériser. Une fois dans la cellule, le peptide actif interagit avec son effecteur NprR, qui adopte alors une fonction d'activateur transcriptionnel régulant la synthèse de gènes de virulence. Hors conditions quorum sensing, en absence de peptide, l'effecteur régule négativement la sporulation bactérienne.

De manière intéressante, l'analyse des séquences de NprX révèle la présence d'un motif conservé de 5aa, SKPDI, qui a été défini comme apparenté à la famille des Phr (Pottathil and Lazazzera 2003), ce qui supporte l'hypothèse d'une relation fonctionnelle entre NprR et les Rap. Nos collaborateurs ont testé un possible effet de NprR sur la sporulation des bactéries. Des expériences de complémentation sur la souche mutant *Bt407 ΔnprR/ΔnprX* cultivée en milieu riche pendant 72h ont permis de mettre en évidence une déficience de la sporulation induit par l'effecteur seul alors que la présence du peptide rétablit un taux de spores similaire à celui de la souche sauvage (résultats non publiés). La forme libre de NprR, a donc bien un effet négatif sur la sporulation à la manière des Rap (A, B, H et E), suggérant que NprR pourrait posséder une activité phosphatase et déphosphoryler un intermédiaire de la sporulation ou simplement séquestrer cet intermédiaire. De plus il a été montré que cette activité inhibitrice est indépendante de la fonction facteur de transcription. En effet, la forme tronquée de NprR, déletée de son domaine HTH (NprRΔHTH) est incapable d'activer l'expression de *nprA*, mais conserve son effet inhibiteur sur la sporulation.

Des études phylogénétiques suggèrent que les Rap représenteraient le système le plus ancestral parce qu'il forme un groupe hautement diversifié, dépourvu de domaine HTH. Puis, l'association du système Rap au domaine bactérien HTH aboutit à un régulateur transcriptionnel tel que NprR, ayant le même nombre de motifs TPRs que les Rap (7 motifs). Il a été supposé que les motifs TPRs, pas nécessaires pour l'activation transcriptionnelle, ont été progressivement perdus pour générer des régulateurs de transcription spécialisés comme PlcR (5 motifs) (Declerck, Bouillaut et al. 2007). La bi fonctionnalité de NprR est en accord avec ces études phylogénétiques suggérant que ce dernier est un intermédiaire évolutif combinant les caractéristiques des Rap à ceux de régulateur de transcription comme PlcR. La fixation du peptide NprX induit un changement de fonction de NprR, permettant à la bactérie de contrôler l'expression de gènes et de s'engager dans un nouveau programme de développement [FIGURE 27](#).

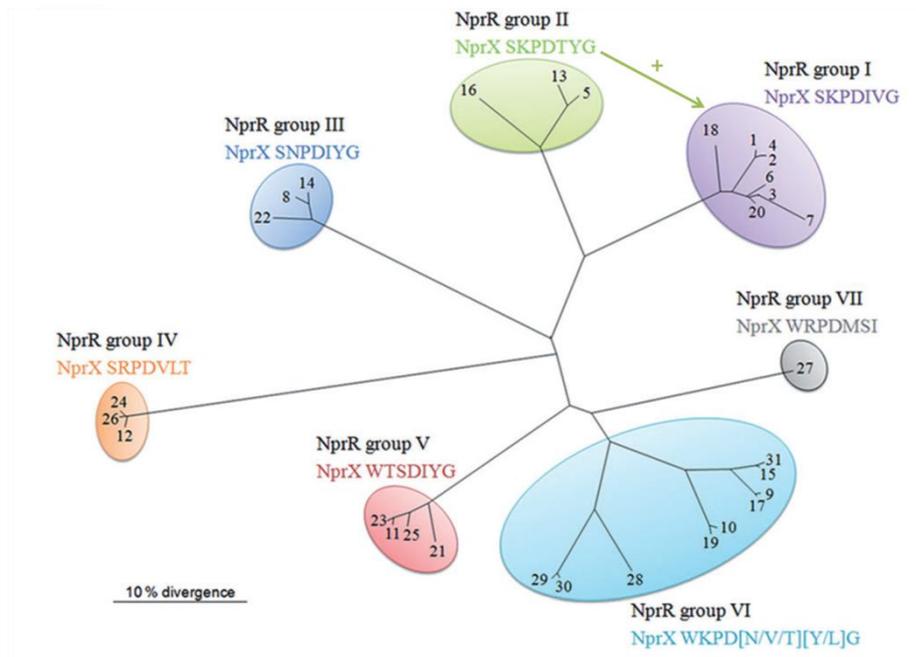


FIGURE 28: Activations croisées dans le système NprR/NprX

L'analyse phylogénétique des séquences de NprR et NprX a permis de distinguer 7 groupes différents.

Parmi les groupes II à VI, seul les peptides du groupe II activent NprR du groupe I.

Figure extraite de l'article : (Perchat, Dubois et al. 2011)

INTRODUCTION

Le gène *nprX* code pour une séquence de 42 acides aminés qui présente une séquence signal d'exportation en Nter lui permettant ainsi d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire sous une forme de 23aa. NprX est réimporté par l'intermédiaire de système Opp (résultats non publiés). Cependant, la maturation du peptide dans le milieu extracellulaire est encore en cours d'investigation. Des tests d'activité réalisés *in vivo* avec différentes formes synthétiques de NprX correspondant à la séquence de 23aa, au motif conservé de 5aa SKPDI et aux séquences de 6aa (SSKPDI et SKPDIV) et de 7aa (SKPDIVG), ont montré que la forme minimale active de NprX correspond à l'heptapeptide SKPDIVG. D'autre part, cette activité est également observée en exprimant l'heptapeptide dans la cellule, confirmant ainsi que NprX-7 interagit directement avec NprR sans autre étape de maturation (Perchat, Dubois et al. 2011).

Une analyse comparative des séquences de NprR et NprX au sein du groupe *B. cereus* a permis de classer les couples effecteur/peptide en sept groupes différents (ou phénotypes). Le système NprR/NprX sur lequel nous travaillons, issu de la souche *Bt407*, représente le groupe I. Pour étudier la possibilité d'activation croisée entre les différents groupes, nos collaborateurs ont testé l'activation de NprR du groupe I (NprR-I) en tant que facteur de transcription par les heptapeptides des autres groupes (NprX-II à NprX-VII). Ainsi, NprR-I peut être activé par NprX-II alors que les peptides des groupes III à VII sont sans effets, [FIGURE 28](#) ci-contre, (Perchat, Dubois et al. 2011).

C. Projet

Le but de mon projet de thèse était d'élucider les mécanismes moléculaires régissant les fonctions de NprR. Il s'inscrivait dans le cadre d'une étude plus large réunissant trois laboratoires :

- L'unité Génétique microbienne et Environnement, INRA (Didier Lereclus), principalement en charge des études génétiques du système NprR/NprX qui consistent à déterminer le rôle fonctionnel du régulateur contrôlé par NprR/NprX et à caractériser les réseaux de régulation contrôlant leur propre expression.
- L'unité Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA (Josef Deutscher) chargée des analyses biochimiques de NprR afin de caractériser des cibles potentielles pour sa fonction inhibitrice de la sporulation.
- Le Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale, CNRS (Sylvie Nessler), où j'ai mené les études structurales du système NprR/NprX.

Pour comprendre complètement ce système, il fallait résoudre les structures cristallographiques de NprR sous toutes ses conformations fonctionnelles, à savoir :

- NprR et NprR/NprX, dont la comparaison me permettra d'expliquer le switch fonctionnel.
- NprR/NprX/ADN qui décrit la fonction facteur de transcription.
- NprR/Cible qui décrit la fonction inhibition de la sporulation.

A ce jour, la recherche du partenaire ciblé par NprR dans sa fonction d'inhibiteur de la sporulation est restée infructueuse. Les résultats présentés dans ce qui suit concernent donc l'élucidation du switch moléculaire ainsi que la compréhension de la fonction facteur de transcription.

II. MATERIELS ET METHODES

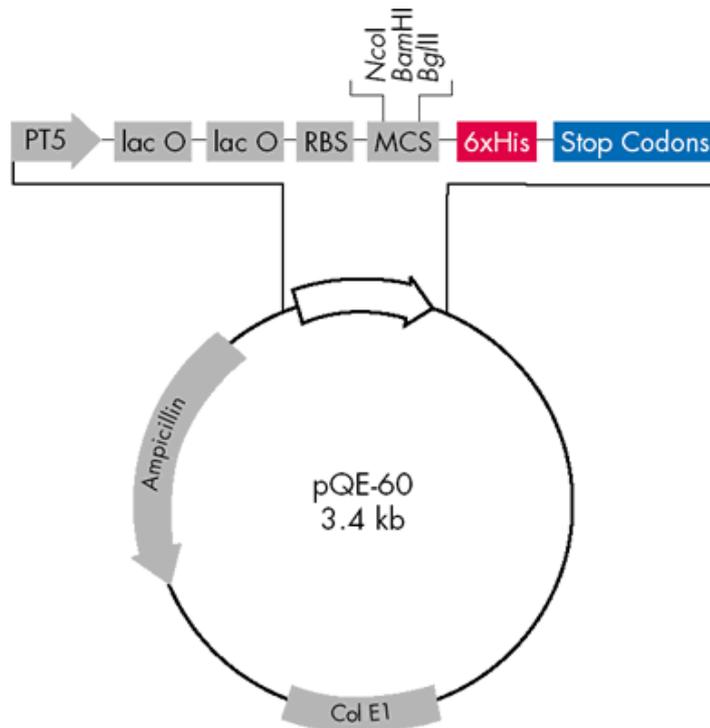


FIGURE 29: Système d'expression pQE60

Le gène d'intérêt est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible fort, le promoteur du phage T5, reconnu par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'expression est régulée par l'opéron *lac* (ici en double copie). En effet, en présence de glucose (phase de croissance des bactéries en milieu LB) le répresseur LacI se fixe sur l'opéron *lac* empêchant ainsi la transcription. L'analogue non hydrolysable du lactose, l'IPTG, se fixe sur LacI libérant l'opéron et permettant ainsi à l'ARN polymérase de se fixer au promoteur T5 et donc d'induire l'expression du gène d'intérêt.

A. Expression des protéines

1. NprR et NprR Δ HTH natives

Le gène *nprR* de *Bacillus thuringiensis* a été cloné par S. Perchat (INRA) dans le vecteur d'expression pQE60 portant une résistance à l'Ampicilline (QIAGEN) pour être exprimé avec une étiquette histidine C-terminale dans *E. coli* ([FIGURE 29](#)). Une seconde construction, *nprR Δ HTH*, a été préparée de la même façon pour exprimer une forme délétée du domaine à motif HTH en N-terminal. La souche d'*E. Coli* M15 pRep4, résistante à la Kanamicyne, a été transformée par les vecteurs pQE60-*nprR* et pQE60-*nprR Δ HTH* portant respectivement l'insert codant pour NprR (431aa, 51339.43Da) ou NprR Δ HTH (372aa, 44494.41Da), voir [ANNEXES A](#). Des pré-cultures sont préparées à partir de 50ml de milieu LB à 25 μ g/ml de Kanamicyne et 100 μ g/ml d'Ampicilline ensemencées à partir de stocks glycérol des souches transformées, conservées à -80°C. L'incubation se fait sur la nuit à 37°C et sous agitation constante. Le lendemain, les souches sont mises en culture en reprenant 10ml de pré-culture dans 1l de milieu LB frais ([Kanamicyne] = 25 μ g/ml ; [Ampicilline] = 100 μ g/ml). Les cultures sont incubées à 37°C, sous agitation constante, jusqu'à atteindre une DO_{600nm} = 0.6 à 0.8 Elles sont ensuite refroidies à 30°C pour induire l'expression pendant 4h avec 0.5mM d'IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside). Chaque litre de culture est ensuite centrifugé à 5000rpm, 4°C, pendant 20min et les culots bactériens résultant sont pesés et congelés à -20°C.

2. NprRΔHTH marquée au sélénium

La souche d'*E. coli* M15 pREP4 transformée par le plasmide pQE60-*nprRΔHTH* est mise en culture à 37°C toute une journée dans 50ml de milieu LB dans les mêmes conditions d'antibiotiques que celles utilisées pour la production des formes non marquées de la protéine. La culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 10min à température ambiante et le culot bactérien est resuspendu dans un litre de milieu M9-Met. Il s'agit d'un milieu minimum supplémenté par les acides aminés Lys, Thr et Phe à 100mg/L et Leu, Ile, Val et Met à 50mg/L. La souche bactérienne est ainsi mise en culture sur la nuit à 28°C sous agitation constante. Au matin, si la $DO_{600nm} = 0.7$ à 1.3, la culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 20min à température ambiante. Le culot bactérien est alors resuspendu dans le milieu M9-SeMet dans lequel la méthionine est substituée par de la sélénométhionine (SeMet). L'expression est induite avec 1mM d'IPTG pendant 4h à 37°C. La composition des milieux de culture est donnée dans l'**ANNEXE B**. La suite du protocole d'expression est similaire à celui des formes natives.

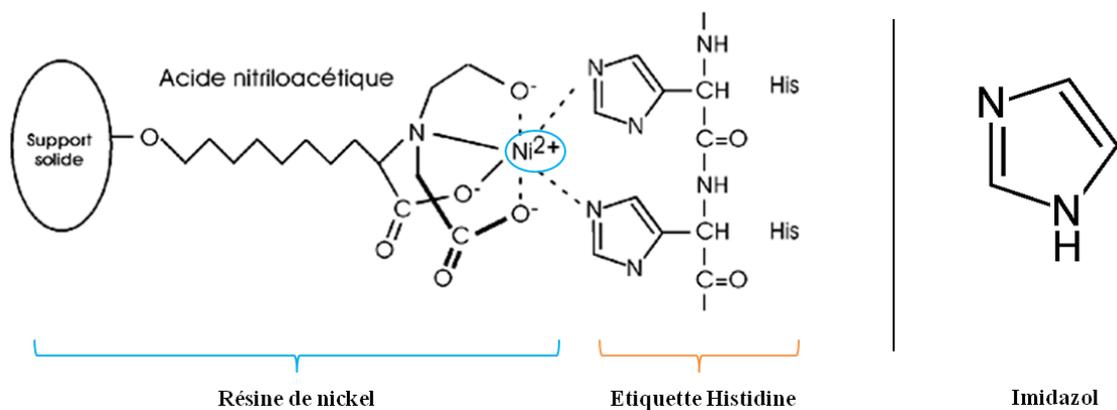


FIGURE 30: Principe de la chromatographie d'affinité IMAC

L'ion nickel (Ni) est immobilisé par un bras NTA (NiTriloacetic Acid). L'ion nickel peut faire 6 liens de coordinations, 4 étant déjà sollicités par la résine. Il dispose donc de 2 liens pour interagir avec le cycle imidazole des résidus Histidine de l'étiquette de la protéine à purifier. L'utilisation d'une solution concentrée en imidazole (compétiteur des résidus Histidine) permet d'éluer les protéines retenues sur la colonne.

B. Purification

Les purifications se font sur un système FPLC (Akta Purifier, *Amersham Pharmacia*), thermostaté à 8°C en armoire froide. Les protéines NprR et NprRΔHTH ayant un point isoélectrique d'environ 6, les tampons utilisés sont à pH8. A ce pH, les protéines sont chargées et les résidus Histidine de l'étiquette Cter ne sont pas réduits. Les concentrations ([c]) sont déterminées grâce à la loi de Beer-Lambert : $A_{280} = \varepsilon \times l \times [c]$, en prenant comme coefficient d'extinction, la valeur théorique calculée à partir de la composition en acides aminés de la protéine ($\varepsilon = 1.3 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour NprR et NprRΔHTH), (ANNEXE C).

Les absorbances à 280 nm (A_{280}) sont mesurées en nano gouttes sur un spectrophotomètre NanoVue (GE Healthcare).

1. Extraction

Les culots bactériens sont resuspendus (10ml de tampon/g de culot) dans du tampon A (25mM Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 20mM Imidazole) supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (SIGMA). Les bactéries sont lysées par sonication (Sonicator 4000, Misonix) dans la glace : 30% d'amplitude, 9 cycles de 20sec et pause de 20sec entre chaque cycle. Après la lyse, le matériel nucléaire est dégradé en ajoutant de la benzonase à 10 U/ml (NOVAGEN). Finalement le lysat est centrifugé à 15000g, 4°C pendant 40min et le surnageant filtré (0.20µm) avant purification.

2. Chromatographie d'affinité IMAC

Les échantillons sont purifiés par une première étape de chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Deux colonnes d'1ml de résine NTA-Nickel (HisTrap HP) sont montées en série sur l'Akta et équilibrées dans le tampon A. Le lysat bactérien filtré est alors injecté sur les colonnes, qui une fois chargées, sont lavées de manière extensive au tampon A jusqu'au retour du signal d'absorbance à 280 nm au niveau de la ligne de base. La protéine d'intérêt est finalement éluée avec du tampon B (25mM Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 300mM Imidazole) (FIGURE 30).

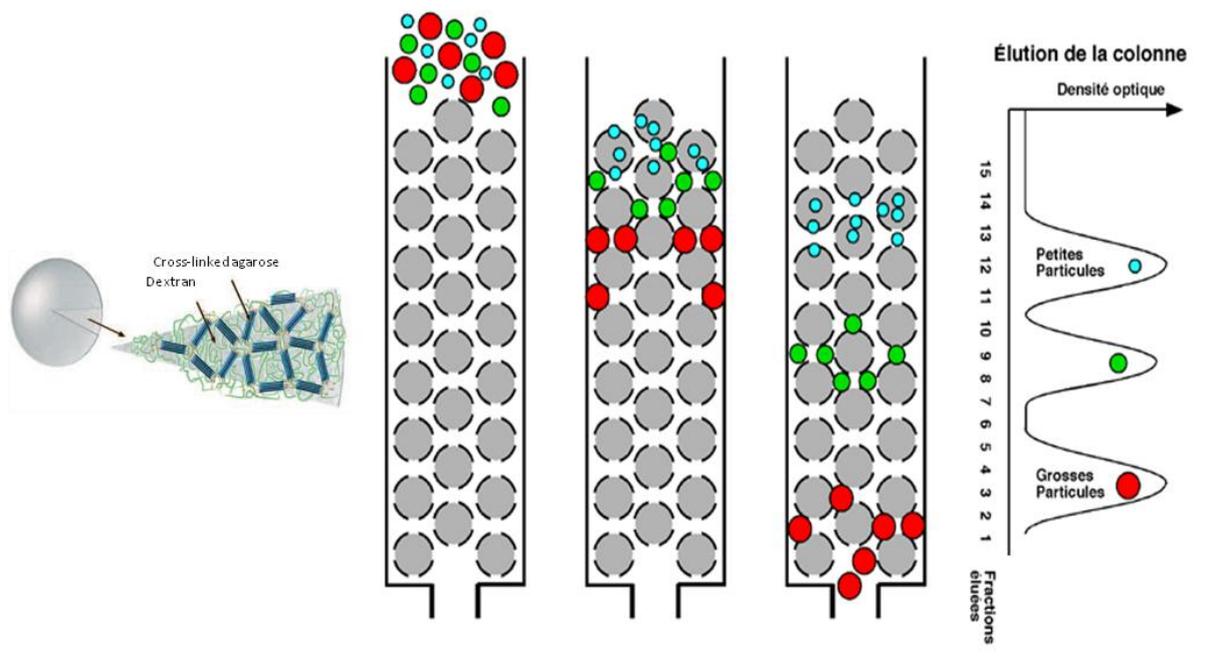


FIGURE 31: Principe de la chromatographie par exclusion de taille

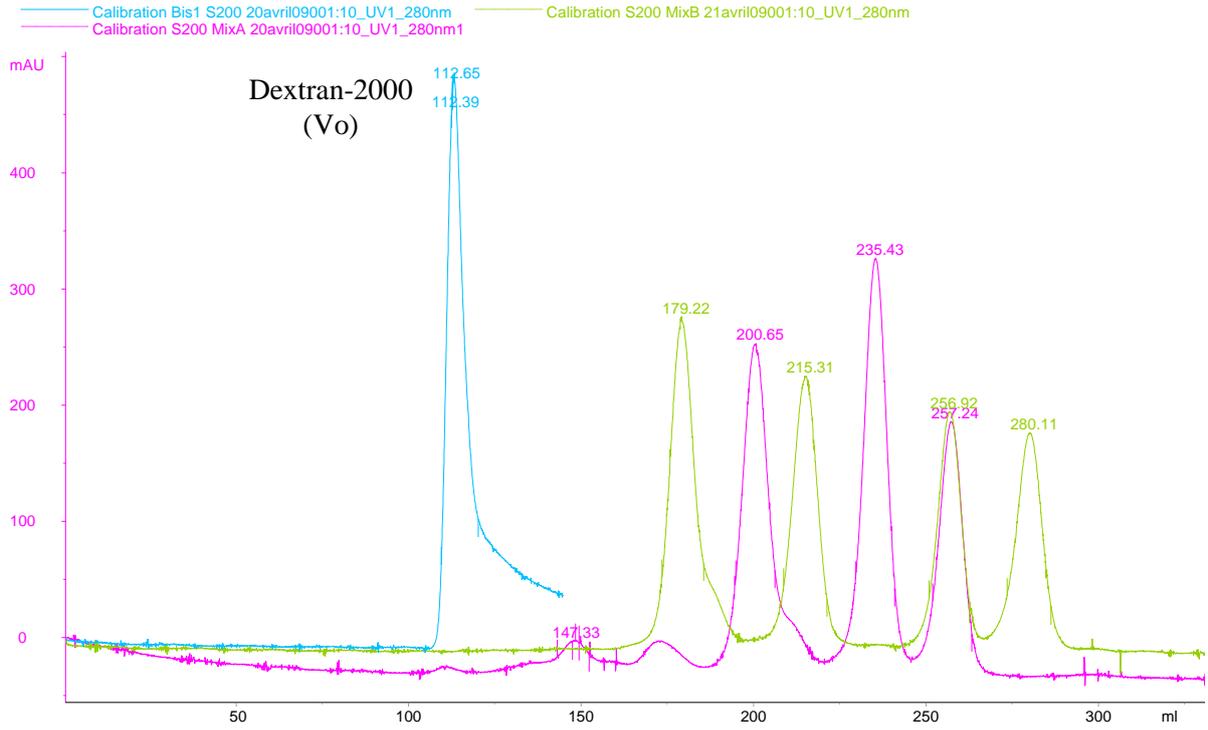
La colonne S200-26/60 est composée de billes de Superdex constituées d'un mélange de polymères réticulés de Dextran et d'agarose. La porosité de cette matrice est telle que les molécules de tailles supérieures aux pores ne pénètrent pas à l'intérieur des billes. Elles sont exclues et vont être éluées de la colonne en premier, dans le volume mort (V_0). Les plus petites molécules qui s'insèrent dans les billes vont être retenues et éluées plus tardivement.

3. Chromatographie d'exclusion par la taille

Sans attendre, afin d'éviter une précipitation de la protéine en présence d'imidazole 300mM, les fractions du pic d'élution de la colonne IMAC sont regroupées et filtrées (0.20µm). Un volume maximum de 10ml est injecté sur une colonne de filtration sur gel de type Hiload 26/60 Superdex 200 (GE HealthCare) équilibrée en tampon E (20mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl). L'échantillon est élué dans le même tampon (**FIGURE 31**). Les fractions des pics d'élution sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE (12,5%). Celles du pic contenant la protéine d'intérêt sont regroupées et concentrées par ultrafiltration à 4°C et 7000g sur des unités Vivaspin-30kDa (Sartorius stedium biotech). L'échantillon est finalement aliquoté par 50µl et congelé à -20°C.

4. Analyse par SDS-PAGE

Les échantillons (10µl) sont dénaturés à 100°C pendant 5min en présence de 2.5mM β-Mercaptoethanol (agent réducteur) et de SDS 10% (détergent anionique). Ce traitement permet de s'affranchir des effets de forme et de charge. Les protéines sont séparées en fonction de leur masse sur un gel SDS-PAGE à 12.5%. La migration se fait à 180V jusqu'à ce que le bleu de charge sorte à peine du gel. Ce dernier est coloré dans une solution de bleu de Coomassie puis rincé dans une solution décolorante pour ne révéler que les bandes de protéines marquées. La composition des solutions utilisées est détaillée en **ANNEXE D**.



Protéines étalon	PM (Da)	Ve (ml)
Ferritine	440000	147,5
Aldolase	158000	179,22
Conalbumine	75000	200,66
Ovalbumine	43000	215,31
Anhydrase Carbonique	29000	235,48
RibonucléaseA	13700	257
Aprotine	6500	280,11

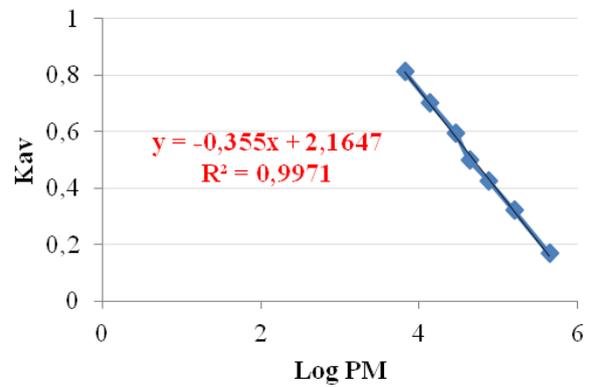


FIGURE 32: Calibration de la colonne Superdex S200-26/60

5. Etalonnage de la colonne Superdex S200-26/60

Pour déterminer la courbe de calibration de la colonne utilisée (Superdex S200-26/60) les kits d'étalonnage LMW (Low Molecular Weight) et HMW (High Molecular Weight) distribués par GE-Healthcare ont été utilisés. Il s'agit d'observer l'élution de différents mélanges de protéines étalon. Le volume mort de la colonne (V_0) est déterminée grâce à l'élution du Blue DEXTRAN-2000, un complexe de polysaccharides ayant une masse approximative de 2000kDa. Ainsi, à partir des différents volumes de rétention (V_e) observés, il est possible de calculer les coefficients de partage de chaque protéine éluée :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Où V_c correspond au volume total de la colonne (320ml pour la S200-26/60), V_e le volume d'élution de l'échantillon et V_0 le volume mort (environ 113ml). Finalement la représentation graphique des coefficients de partage K_{av} en fonction du logarithme des poids moléculaires (PM) permet de tracer la droite étalon décrite par l'équation affine (**FIGURE 32**):

$$K_{av} = -0.355x + 2.1647$$

A partir de cette équation il est possible de calculer le poids moléculaire théorique pour un volume d'élution donné. Voici comme exemple NprRΔHTH (45kDa) qui présente un $V_e = 195\text{ml}$:

$$K_{av} = \frac{195 - 113}{320 - 113} = 0.396$$

$$\text{Log}PM = \frac{0.396 - 2.1647}{-0.355} = 4.982253521$$

$$PM = 10^{4.982253521} = 95996 \text{ Da}$$

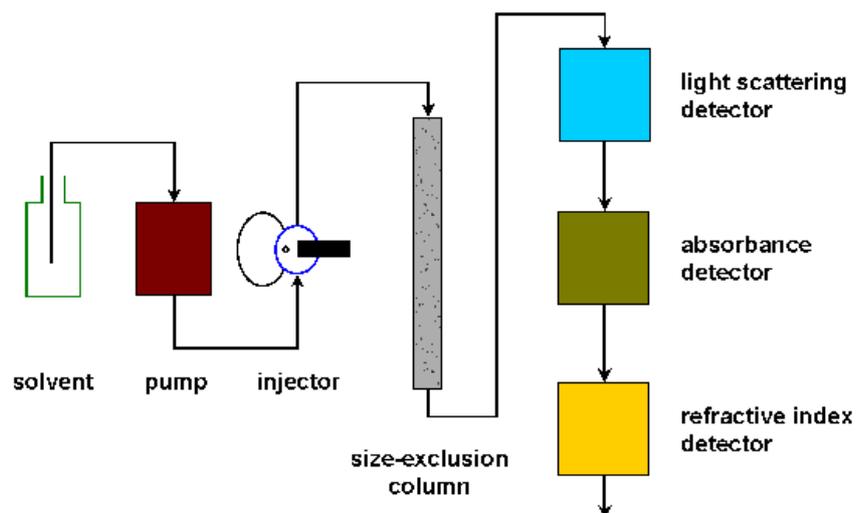


FIGURE 33: Système SEC-MALS classique

Le SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography – Multi Angles Light Scattering), est une méthode combinant une séparation par gel filtration à un système de détection multiple comprenant notamment un détecteur d'indice de réfraction et un détecteur de diffusion de lumière à différents angles. La diffusion de la lumière par une particule est proportionnelle au produit de sa concentration et de sa masse moléculaire. La concentration de l'échantillon peut être directement mesuré par son absorbance ou son indice de réfraction. Ainsi en mesurant la lumière diffusée par l'échantillon et connaissant sa concentration, il est possible de mesurer la masse moléculaire de chaque pic élué en sortie de colonne SEC. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que l'on s'affranchit de la dépendance au volume d'élution. En effet, la rétention d'une protéine dépend de sa masse moléculaire mais aussi de sa forme et de son affinité pour la matrice de la colonne.

6. Caractérisation par SEC-MALS

Les mesures de SEC-MALS (**FIGURE 33**) ont été effectuées par Nourredine Lazar à l'IBBMC à Orsay. Les protéines diluées à 2mg/ml (40 μ M environ) dans du tampon E ajusté à pH7.5. Les échantillons ont été centrifugés à 13400 rpm pendant 20min à 4°C pour éliminer toutes impuretés qui pourraient endommager le système. Les échantillons ont été injectés à un volume de 100 μ L sur la colonne analytique Superdex S200-10/300, préalablement équilibrée dans le tampon E pH 7.5.

C. Préparation des ligands

1. Les peptides

Les peptides utilisés ont été commandés auprès du fournisseur Genscript à une échelle de synthèse de 10 à 14mg pour une pureté >95% (contrôle qualité par HPLC et SM). Les échantillons lyophilisés ont été resolubilisés dans le tampon de conservation de la protéine (tampon E) à des concentrations moyenne de 25mM, puis aliquotés par 30 μ l et congelés à -20°C.

2. Les oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés ont été commandés auprès du fournisseur Eurofins-MWG, à des échelles de synthèse allant de 0.01 à 0.2 μ mol (contrôle qualité par HPLC et SM). Les échantillons lyophilisés ont été resolubilisés dans le tampon E à une concentration finale de 1mM. Les brins complémentaires ont été mélangés en équimolaire puis chauffés à 95°C pendant 30min pour les dénaturer. Enfin, pour permettre l'hybridation, les échantillons ont été enveloppés dans du papier aluminium pour refroidir lentement sur la paillasse jusqu'à température ambiante. Les doubles brins d'ADN ainsi formés ont été utilisés tels quels pour les mesures d'interactions en ITC et DSC. En revanche, ils ont été tamponnés à pH8 pour les tests de co-cristallisation. Les échantillons ont été congelés pour être conservés à -20°C.

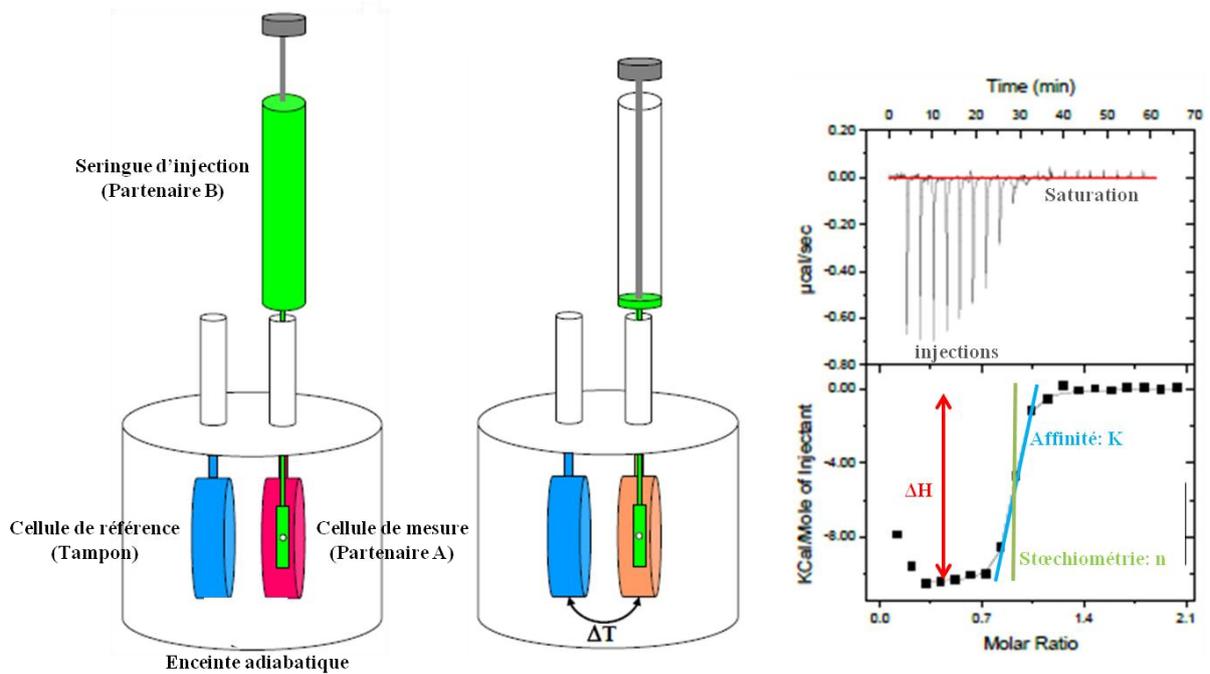


FIGURE 34: Principe de la microcalorimétrie isotherme

La plupart des réactions chimiques, comme les phénomènes d'interaction, dégagent ou absorbent de la chaleur (réaction exo ou endothermique). L'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) est une méthode permettant de mesurer les variations de chaleur d'un échantillon de protéines sous l'effet de l'ajout d'un ligand. Une cellule de référence contenant le tampon des échantillons, et une cellule de mesure contenant un des deux partenaires (par exemple la protéine) sont placées dans une enceinte adiabatique maintenant les deux cellules à la même température. A l'aide d'une seringue, l'autre partenaire (le ligand) est injecté régulièrement (x volume/min) dans la cellule de mesure. S'il y a interaction, il se produit alors un dégagement ou une absorption de chaleur qui crée une différence de température (ΔT) entre la cellule de mesure et la cellule de référence. L'intégration des pics de chaleur enregistrés à chaque injection, permet d'obtenir une courbe ITC à partir de laquelle il est possible de déterminer le profil thermodynamique d'une interaction, c'est-à-dire, de déterminer la constante de liaison K , la stœchiométrie (n) et l'enthalpie ΔH .

D. Caractérisation des interactions entre l'effecteur et ses ligands

1. Mesures de microcalorimétrie isotherme

Les analyses d'interaction par microcalorimétrie (**FIGURE 34**) ont été réalisées par Magali Nicaise, à l'IBBMC, sur un microcalorimètre de titration isotherme VP-ITC (MicroCal) qui permet d'utiliser de petits volumes réactionnels : 400µl de partenaire A dans la cellule de mesure et 100µl de partenaire B dans la seringue d'injection. Les données ont été traitées par le programme Origin ITC200 (Microcal).

Pour les mesures d'interaction avec les peptides, les concentrations utilisées sont de 25 à 50 µM pour la protéine dans la cellule et 250 à 500 µM pour le peptide dans la seringue. Les stocks concentrés ont été dilués dans le tampon E (pH8) et la température fixée à 20° C. Le peptide a été ajouté dans la cuve de mesure (agitée à 1000rpm) par une première injection de 0.4µl suivie de 36 injections successives de 1 µl et espacées de 180 sec.

Pour les mesures d'interactions avec l'ADN, la protéine, seule ou en complexe équimolaire avec le peptide NprX7, a été placée dans la cellule de mesure à une concentration de 10 ou 30µM. Les oligonucléotides ont été placés dans la seringue à des concentrations de 120 ou 330µM et ajoutés dans la cellule de mesure par 20 injections de 2 µl espacées de 180 sec

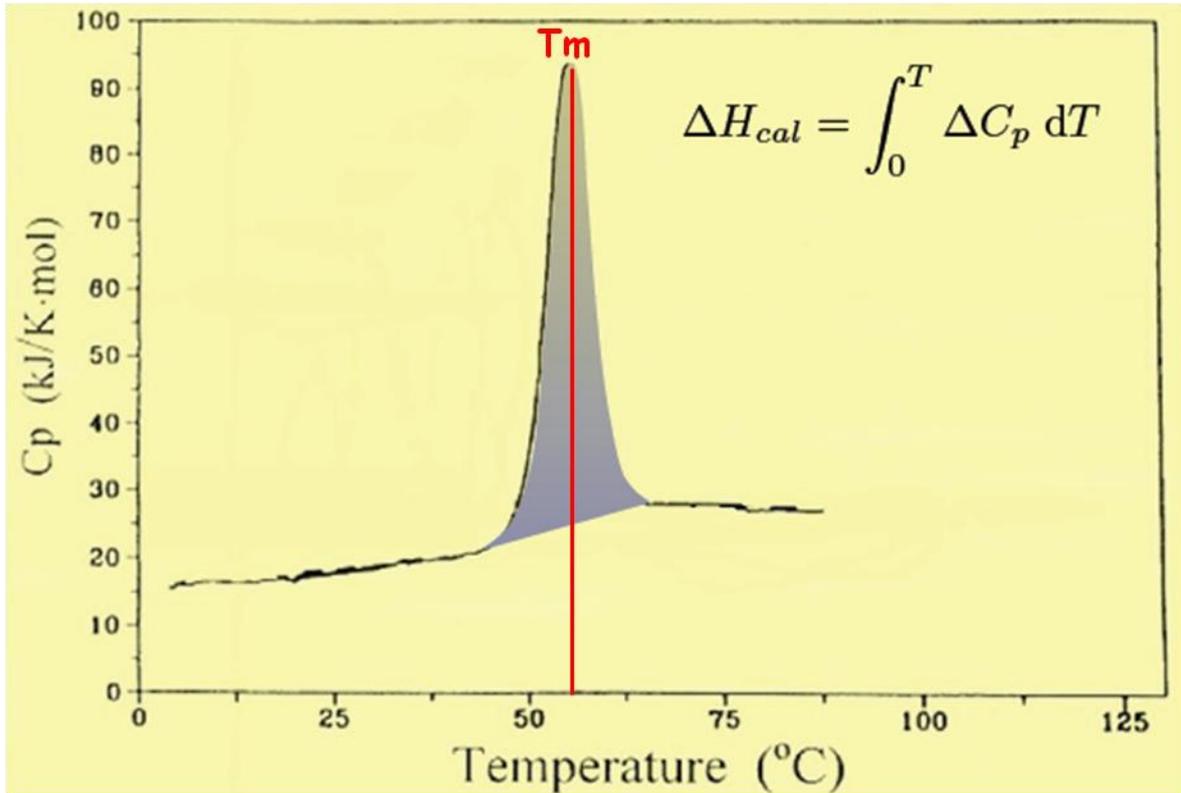


FIGURE 35: Principe de la microcalorimétrie à balayage.

La DSC (Differential Scanning Calorimetry) est une méthode permettant de mesurer des transitions thermiques en fonction d'une variation de température. Contrairement à l'ITC, où les mesures se font à température constante, en DSC, on observe l'effet d'une augmentation de température sur le profile thermodynamique de l'échantillon. Il est donc possible de suivre la dénaturation thermique d'un échantillon de protéine et de mesurer son Tm (melting Temperature), température à laquelle la moitié de l'échantillon est dénaturé.

2. Mesures de calorimétrie à balayage différentiel

Les études de la stabilité thermique par calorimétrie à balayage différentiel (**FIGURE 35**) de NprR ont été réalisées par Magali Nicaise, à l'IBBMC, sur un microcalorimètre VP-DSC (MicroCal). La protéine a été diluée dans du tampon E à une concentration finale de 9.6µM. en absence ou en présence de ligands (peptide à 9.6µM et ADN à 4.8µM). L'échantillon, placé à une température initiale de 20°C, a été chauffé jusqu'à une température finale de 80°C et ce avec une vitesse de chauffe de 1°C/min. Chaque mesure a été précédée par un scan du tampon E seul pour établir une ligne de base. Les données ont été traitées à l'aide du programme ORIGIN.

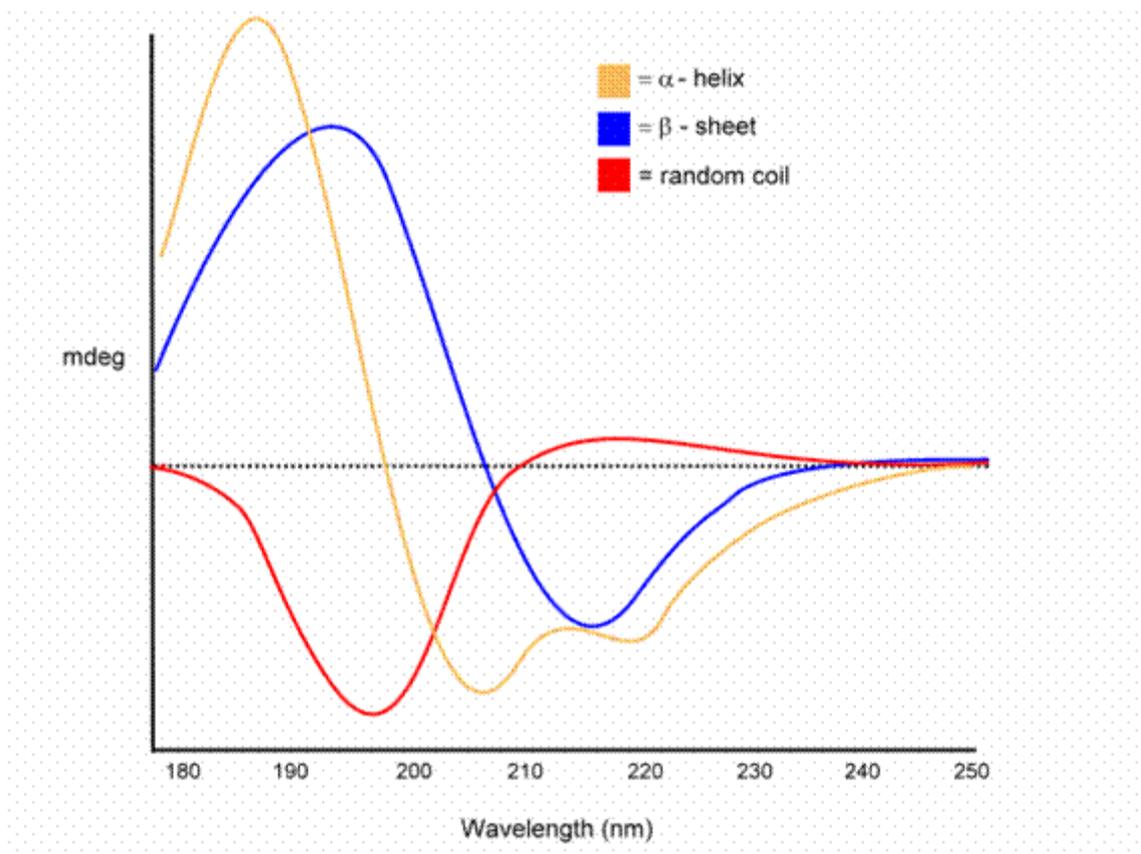


FIGURE 36: Spectres CD de référence

Le CD (Circular Dichroism) est une méthode spectroscopique basée sur la différence d'absorbance de la lumière polarisée gauche et de la lumière polarisée droite par une molécule chirale. Dans la gamme de longueur d'onde 190-250nm (UV lointain), le signal mesuré correspond à la liaison peptidique. Celle-ci absorbe différemment selon qu'elle se trouve dans une hélice α , dans un brin β ou encore dans une région déstructurée. Le spectre CD d'une structure en hélice α (courbe jaune), présente un maximum à 192nm et deux minima à 209 et 222nm. Dans une conformation en feuillet β (courbe bleu) on peut observer un maximum à 196 nm et un minimum à 218 nm, alors que le spectre d'une protéine non structurée (courbe rouge) présente un minimum à 195 nm et un maximum à 212 nm. Ainsi le spectre CD d'une protéine permet d'évaluer sa composition en structures secondaires.

E. Etude du switch moléculaire

1. Mesures de dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire (**FIGURE 36**) ont été enregistrées à 20°C sur un spectropolarimètre JASCO J810, sur une gamme de longueurs d'ondes allant de 185 à 260 nm, dans une cuve en quartz de 0,01cm pour un volume total de 30µl. Afin d'éliminer le chlorure contenu dans le tampon de conservation des protéines, les échantillons ont été dialysés toute une nuit à 4°C contre un tampon Phosphate à pH 7.8 (50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.8, 50mM NaF) sur des unités de filtration (Thermo Scientific Pierce) d'un seuil de 10kDa. En effet, l'absorbance du chlorure de sodium dans l'UV lointain n'est pas négligeable, contrairement à celle du fluorure de sodium. Les échantillons ont été dilués à 5mg/ml ce qui correspond à une concentration molaire d'environ 100µM. A cette concentration, le signal est suffisamment fort sans pour autant saturer le photomultiplicateur. Les complexes avec le peptide ont été préparés à des concentrations effecteur/peptide de 100µM/500µM. La ligne de base pour les spectres CD a été enregistrée avec du tampon Phosphate seul. Les spectres ainsi corrigés ont été traités par le programme de dé-convolution en ligne Dichroweb selon la méthode CONTIN en utilisant comme référence la base de données SP175 comprenant 68 structures de protéines issues de la PDB (Whitmore and Wallace 2004).

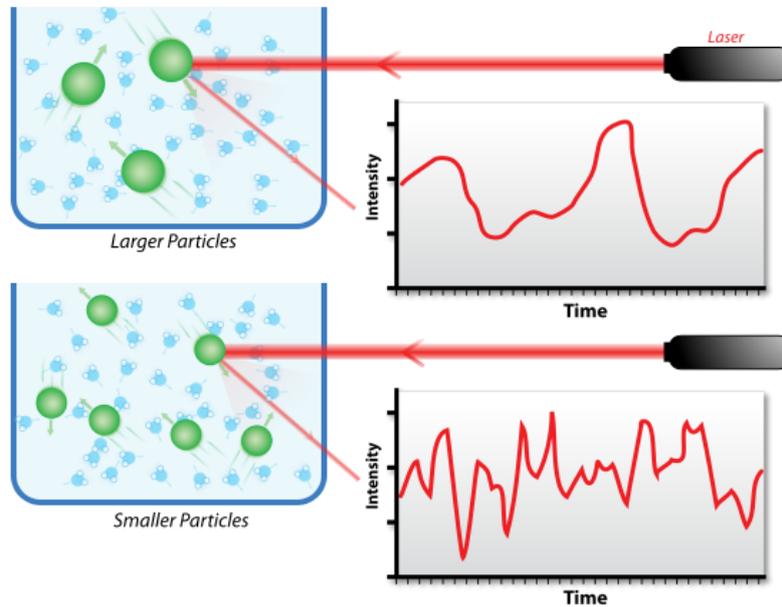


FIGURE 37: Principe de la DLS

La DLS (Dynamique Light Scattering) est une méthode permettant de mesurer la taille des particules composant un échantillon. Il s'agit de mesurer au cours du temps (quelques millisecondes à microsecondes) les variations d'intensité de la lumière diffusée par un échantillon. Ces variations sont le reflet de la dynamique des particules en solution (mouvements browniens dus à l'agitation thermique) et permettent de déterminer les coefficients de diffusion de ces particules. Plus une particule est petite, plus elle est mobile et se déplace donc plus rapidement qu'une particule de plus grande taille. Ainsi, il est possible de calculer le rayon hydrodynamique des particules observées à partir des coefficients de diffusion mesurés.

2. Gels natif

Les échantillons de 10 μ l contenant environ 15 μ g de protéine (1.5 mg/ml = 30 μ M) seule ou saturée en peptide à 1 ou 2mM sont chargés sur des gels d'acrylamide à 8%. Les échantillons ne sont pas chauffés avant dépôt et les solutions sont dénuées de SDS (**ANNEXE D**). Dans ces conditions non-dénaturantes, la mobilité électrophorétique des protéines dépend de leur masse moléculaire et de leur charge. La migration est effectuée à température ambiante, à 100V pendant 2h30 et les gels ont été colorés au bleu de Coomassie.

3. Mesures de diffusion dynamique de la lumière

Les mesures de DLS ont été faites à partir des protéines diluées dans du tampon E, à une concentration finale de 1mg/ml (20 μ M environ). Pour les mesures avec les complexes, le peptide a été ajouté à une concentration finale de 200 μ M. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15000g pendant 10 min à 4°C pour se débarrasser des agrégats et poussières pouvant perturber le signal. Les mesures de variation d'intensité de la lumière diffusée (**FIGURE 37**) sont effectuées dans des cuves plastiques UVette (Eppendorf) pour des volumes de 100 μ l sur un appareil DynaPro NanoStar (Wyatt technology) à 20°C. Une série de 20 acquisitions de 5 msec sont enregistrées pour chaque échantillon, Les données sont traitées par le programme DYNAMICS (Wyatt technology) qui calcule la taille des particules observées ainsi que la polydispersité de l'échantillon.

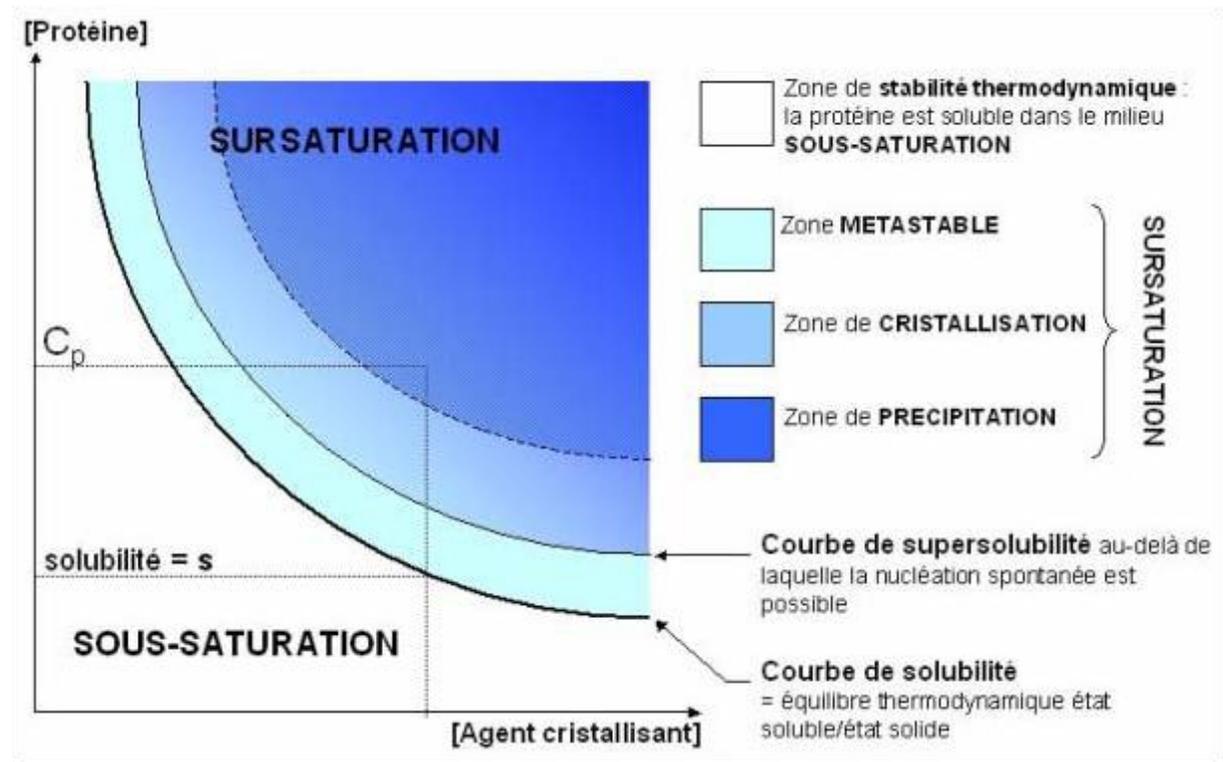


FIGURE 38: Diagramme de phase

Cristalliser une protéine consiste à diminuer sa solubilité pour l'amener vers un état de sursaturation pouvant donner lieu à l'apparition de germes cristallins. Pour atteindre la zone de sursaturation, il faut favoriser les interactions inter-protéiques aux dépens des interactions avec le solvant. Ainsi, on ajoute à l'échantillon des molécules affines pour l'eau comme les solvants organiques, des composés qui modifient la force ioniques tels que les sels, ou d'autres qui entrent en compétition avec la protéine dans le processus de solvation comme les polyéthylène glycols.

F. Cristallisation

1. Criblage robotisé

Le criblage des conditions de cristallisation a été réalisé par diffusion de vapeur en gouttes assises (**FIGURE 38 et 39**) sur un robot (Cartesian) de la plateforme LEBS/IMAGIF. Des plaques de 96 puits (Greiner) sont pré remplies (100µl/puits) avec des kits commerciaux de solutions de cristallisation (QIAGEN). Chaque puits contient trois cupules où l'on peut déposer trois échantillons protéiques différents composés d'un mélange de 100 nl de protéine et de 100nl de solution du puits. On peut ainsi tester $3 \times 96 = 288$ conditions par plaque. Ces dernières sont scellées sous film transparent et laissées à équilibrer à 18°C pour permettre la croissance cristalline. L'apparition des cristaux a été surveillée régulièrement durant les semaines suivantes par observation des plaques à la loupe binoculaire.

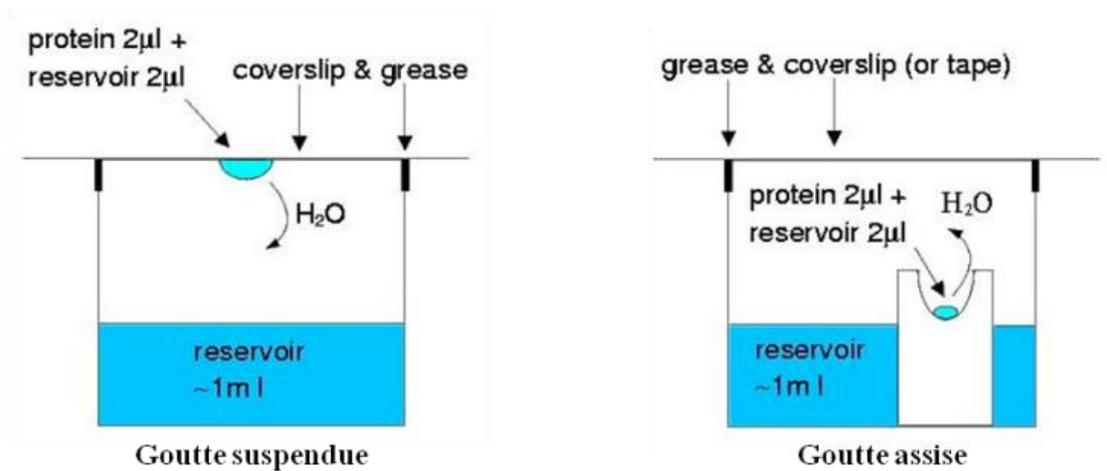


FIGURE 39: Méthode de cristallisation par diffusion de vapeur

Une petite goutte constituée d'un mélange protéine/agent cristallisant est mise à équilibrer au dessus d'un puits contenant un grand volume de solution de cristallisation. La concentration en agent cristallisant dans la goutte est donc diluée comparée à celle du réservoir. Les gouttes peuvent être suspendues ou assises. Dans un système hermétiquement fermé, il se produit un échange sous phase vapeur des composés volatiles, essentiellement l'eau, jusqu'à équilibration des concentrations en agent cristallisant présent dans la goutte et dans le puits. Cela entraîne une diminution du volume de la goutte. Il en résulte une augmentation des concentrations en agent cristallisant et en protéine, favorable à la cristallisation.

2. Reproduction manuelle et optimisation

En routine, les conditions de cristallisation ayant donné des cristaux lors du criblage robotisé en nano-gouttes sont reproduites manuellement en microgouttes suspendues dans des boites de 24 puits avec des solutions « maison ». Afin d'obtenir des cristaux plus gros et de meilleure qualité, les conditions de cristallisation sont affinées en faisant varier les paramètres autour de la condition du kit commercial (pH, concentration en agent précipitant et en protéine ...). Les boites sont conservées à 18°C et l'apparition de cristaux est surveillée à la loupe binoculaire pendant plusieurs jours à plusieurs semaines. Des essais d'optimisation ont également été effectués à 4°C.

Pour certaines formes cristallines, difficiles à reproduire ou de trop petites tailles pour être testées en diffraction, des techniques d'ensemencement ont été tentées (kit Seed Bead, HAMPTON Research). Il s'agit d'inoculer des gouttes de cristallisation pré-équilibrées par des germes cristallins qui serviront de base à la croissance cristalline.

Des essais d'optimisation en gel d'agarose ont également été réalisés. Le principe consiste à ralentir la diffusion des molécules et donc la croissance cristalline afin d'éviter les défauts d'empilement (Lorber, Sauter et al. 2009). Cette technique nécessite l'utilisation d'un agarose ayant de faibles températures de fusion ($T_m < 50^\circ\text{C}$) et de gélification ($T_g < 20^\circ\text{C}$) (SIGMA). Un stock d'agarose est préparé à 0.4% final (m/v dans de l'eau) et 2 μl de ce stock sont déposés sur une goutte protéine/précipitant (1 μl /1 μl) pour une concentration finale à 0.2%.

MATERIELS ET METHODES

Des essais d'optimisation par pontage au glutaraldéhyde ont également été réalisés. Cette technique consiste à stabiliser les cristaux déjà formés en renforçant les interactions entre protéines. Il s'agit de déposer, à proximité de la goutte où les cristaux se sont formés, 1 μ l d'une solution de glutaraldéhyde (volatile) à 0.2% (m/v dans de l'eau) et de laisser incuber de 20min à 2h.

Plus généralement, des tests de déshydratation ont été menés sur les différentes formes cristallines. Le but ici est de diminuer le taux de solvant des cristaux et donc la dynamique des protéines à l'intérieur de ces derniers. Pour ce faire, les cristaux ont été transférés graduellement vers des solutions de plus en plus concentrées en précipitant dans lesquelles ils séjournèrent de 30min à 24h. Une autre façon de faire, consiste à laisser sécher la goutte de cristallisation quelques minutes à l'air libre, juste avant de congeler les cristaux (Heras, Edeling et al. 2003).

Finalement j'ai testé lors de la collecte des données de diffraction la technique du recuit des cristaux (annealing). Il s'agit d'interrompre brièvement, juste avant la collecte des données, le flux d'azote qui maintient le cristal congelé. Cette technique permet parfois d'améliorer l'empilement cristallin (Newman 2006)

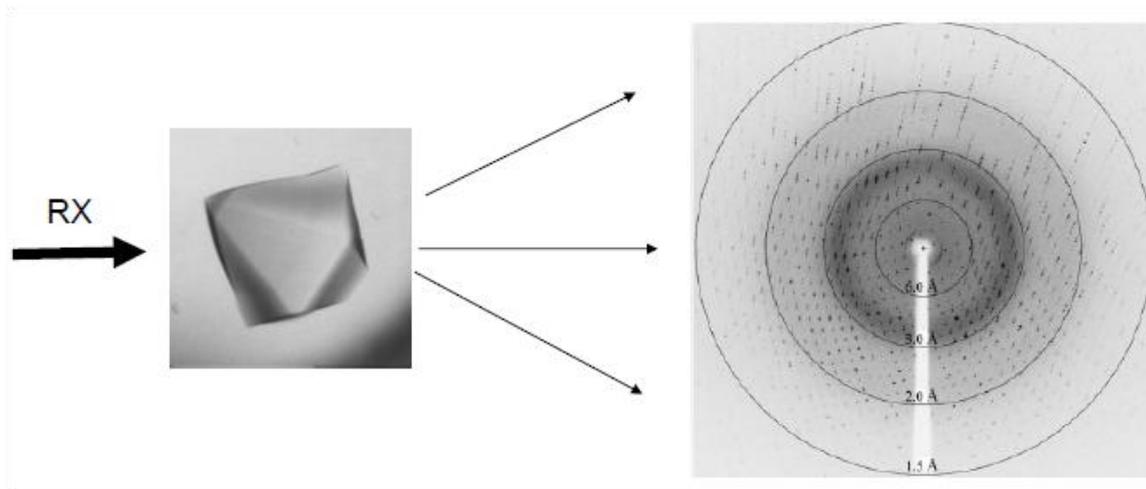


FIGURE 40: Diffraction des rayons X par un cristal de protéines

La diffraction des rayons X par un cristal est enregistrée sur un détecteur en 2D. L'intensité des taches de diffraction mesurées est proportionnelle à l'amplitude des ondes diffusées.

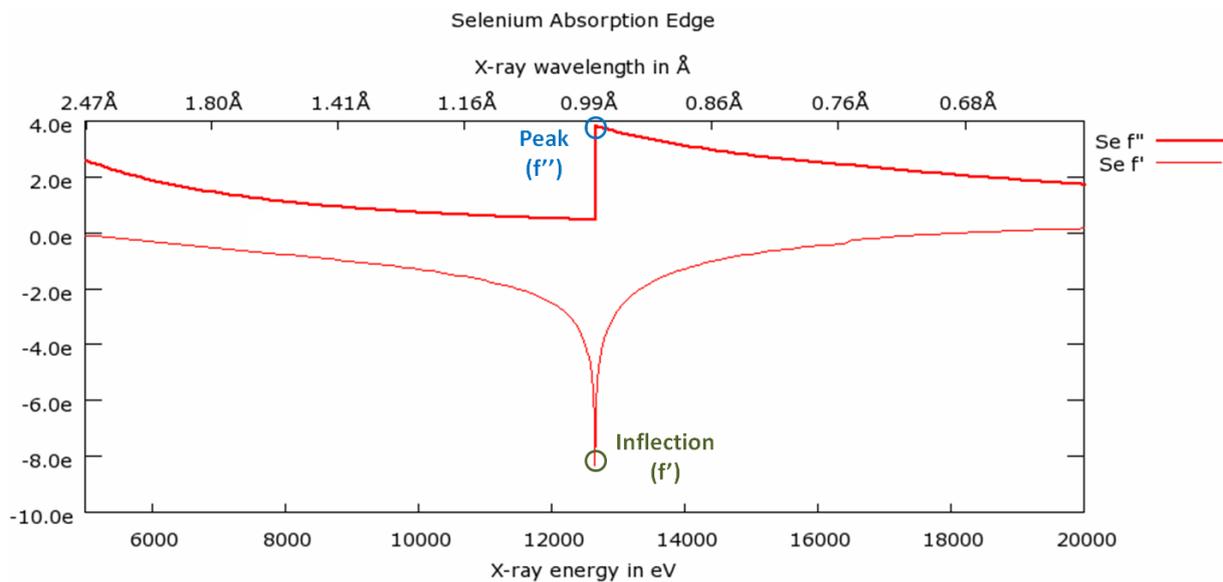


FIGURE 41: Dispersion anormale du sélénium

La diffusion anormale se produit lorsque la longueur d'onde utilisée correspond à la raie d'absorption d'un atome lourd. Dans ce cas les rayons X sont réémis par les atomes lourds avec un changement de phase comparé aux atomes « légers » de la protéine (N, C et O). A cause de cette différence anormale, les intensités des réflexions équivalentes par centrosymétrie (paires de Friedel) ne sont plus égales.

3. Cryoprotection et collecte des données

Pour limiter les dommages provoqués par les rayons X, les cristaux ont été congelés dans de l'azote liquide puis maintenus sous un flux d'azote gazeux pendant la collecte des données de diffraction. Afin d'éviter que l'eau contenu dans les cristaux ne forme de la glace, les cristaux ont, au préalable, été transférés soit directement dans une solution cryoprotectante (par exemple de l'huile de paraffine ou d'aluminium), soit graduellement dans des solutions contenant des concentrations croissantes d'agent cryoprotectant tel que le glycérol, l'éthylène glycol (EtGly), le 2-Methyl-2, 4-PentaneDiol (MPD) ou les PolyEthylèneGlycol (PEG) de petites masses molaires (200 à 400).

Pour chaque cristal testé, 4 images sont enregistrées à 90° d'intervalle afin d'estimer la qualité de la diffraction (**FIGURE 40**). Dans notre cas, typiquement, chaque image correspond à 1° d'oscillation pour un temps d'exposition de 0.5 à 1 sec. La distance cristal-détecteur est ajustée en fonction de la résolution à laquelle les cristaux diffractent. Pour les jeux de données enregistrés sur des cristaux natifs, la longueur d'onde utilisée avoisinait les 12 keV ($\approx 1 \text{ \AA}$). Pour les jeux de données SAD enregistrés avec les cristaux de protéine marquée au sélénium, l'énergie est ajustée pour se placer au maximum du facteur de diffusion anormale f'' . Cette valeur est déterminée par un scan de fluorescence des cristaux réalisé sur la ligne de lumière avant le paramétrage de la collecte (**FIGURE 41**).

Si le cristal diffracte suffisamment bien, les données sont analysées par le programme EDNA (à l'ESRF) ou XDS (à Soleil). Après avoir localisé les tâches de diffraction, le programme détermine automatiquement les paramètres de maille et les symétries du cristal et propose une stratégie de collecte (oscillation, temps d'exposition, angle de départ et nombre d'images) afin d'obtenir un jeu de données complet et de bonne qualité en un minimum d'images. Les jeux de données SAD nécessitant un ajustement de la longueur d'onde ont été collectés soit sur la ligne de lumière Proxima-1 au synchrotron Soleil (Gif-sur-Yvette), soit sur la ligne ID-29 à l'ESRF (Grenoble). Les jeux natifs ont été collectés soit sur Proxima-1 soit sur les lignes ESRF ID14-2, ID23-1 et la ligne microfocus ID23-2.

G. Résolution des structures cristallographiques

1. Traitement des données

Les jeux de données ont été traités par le programme XDS (Kabsch 2010). XDS analyse les pixels des clichés de diffraction pour dans un premier temps, discriminer les taches de diffraction du bruit de fond du détecteur. Dans un deuxième temps, le programme localise les positions des taches de diffraction à partir d'un échantillon d'images pour déterminer les relations de symétrie qui les lient et ainsi attribuer un groupe d'espace et des paramètres de maille qui rendent compte de l'organisation du cristal. Après avoir intégré les intensités de toutes les réflexions du jeu de données, le programme affine les paramètres de maille et corrige les intensités mesurées. Les statistiques permettant de juger de la qualité des données sont calculées. La résolution maximale du jeu de données est ensuite ajustée en fonction de critères statistiques comme la complétude qui indique si le jeu est complet et doit être > 95%, le facteur R_{sym} qui indique l'écart d'intensité entre les taches équivalentes par symétrie et surtout le rapport $I/\delta(I)$ qui représente le rapport signal sur bruit. Dans notre cas, nous avons coupé les jeux de données à une résolution telle que le rapport $I/\sigma(I)$ soit ≥ 2 . Enfin, le programme effectue la mise à l'échelle et la réduction du jeu de données en combinant en une réflexion unique les observations équivalentes par symétrie. Les intensités des taches mesurées correspondant aux ondes diffractées par le cristal sont finalement converties en module des facteurs de structure.

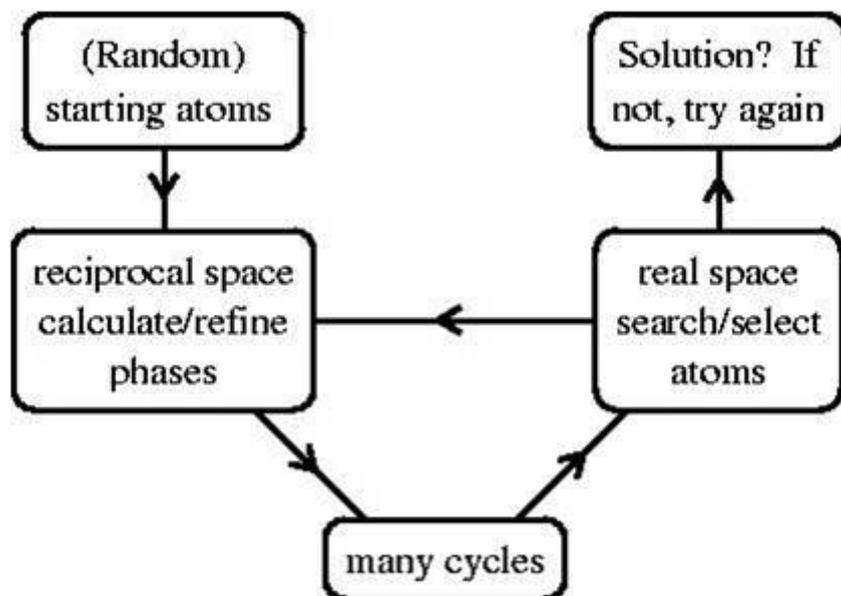


FIGURE 42: La méthode Shake & Bake

Cette méthode de phasage directe alterne affinement de phases dans l'espace réciproque et modification de densité dans l'espace réel pour proposer une sous-structure contenant les atomes lourds. La procédure est basée sur l'utilisation de structures initiales générées de manière aléatoire.

2. Phasage

a) SAD

Les données SAD obtenues à partir des cristaux marqués au sélénium ont permis de déterminer les positions des atomes lourds, ou sous-structure, à l'aide de la suite de programmes Shelx (Sheldrick 2008). Le programme utilise la méthode de phasage directe dite de Shake and Bake pour localiser les sites de sélénium ([FIGURE 42](#)). Il en résulte donc une liste de coordonnées atomiques xyz correspondant aux atomes de sélénium (fichier au format PDB) qui est utilisé par le programme de phasage expérimental PHASER (McCoy 2004) pour estimer les phases de la structure entière et calculer une première carte de densité électronique. Cette dernière a été améliorée par la technique d'aplatissement de solvant dans le programme RESOLVE (Terwilliger 2000) et utilisée par le programme de construction automatique Buccaneer (Cowtan 2006) pour construire un premier modèle (partiel) de la protéine.

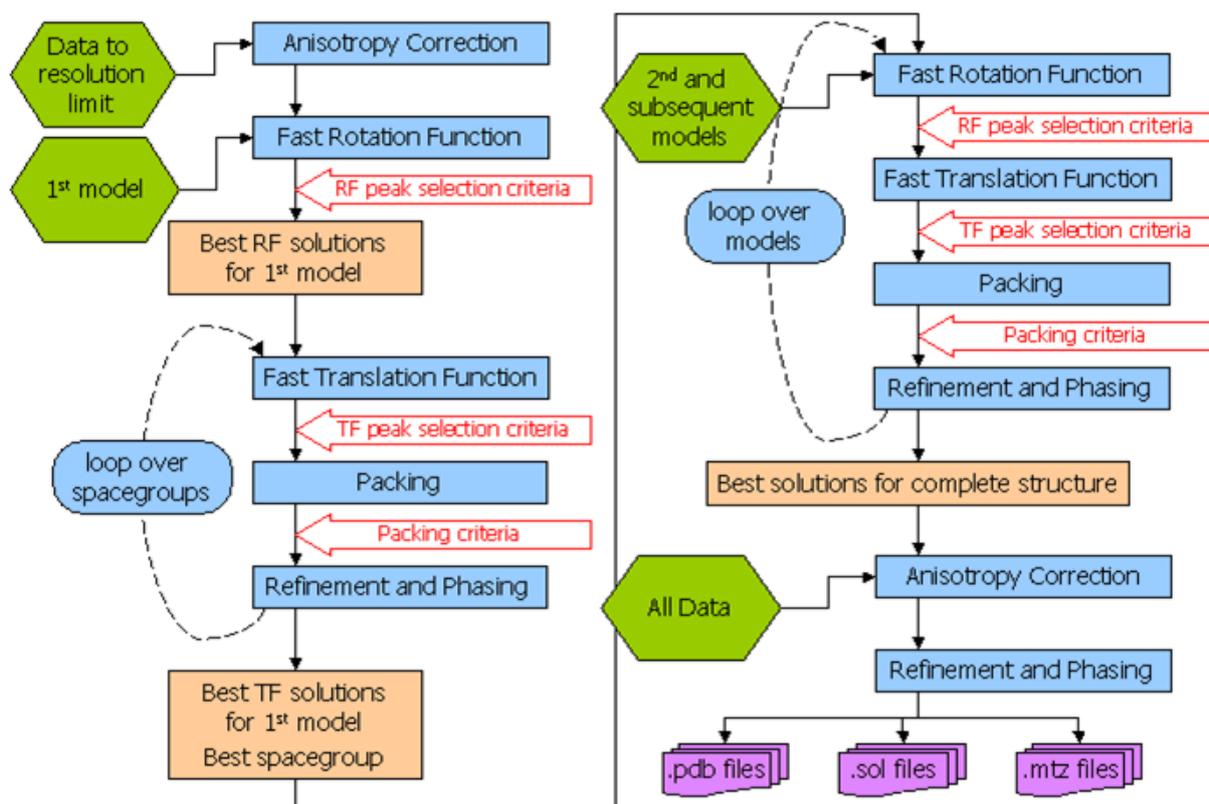


FIGURE 43: Principe du remplacement moléculaire

Le modèle initial est orienté par une fonction de rotation puis positionné dans l'espace par une fonction de translation jusqu'à trouver les coordonnées qui rendent compte au mieux du jeu de données expérimentales. Les calculs se font dans l'espace réciproque, par autocorrélation des fonctions de Patterson calculées à partir des modules de facteurs de structures observés d'une part et des coordonnées atomiques du modèle (dans différentes conformations) d'autre part. La méthode est basée sur le calcul du maximum de vraisemblance.

b) Remplacement moléculaire

Le phasage par remplacement moléculaire (**FIGURE 43**) a été réalisé par le programme PHASER (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) en utilisant comme modèle initial la structure de NprRΔH₇TH en complexe avec NprX₇. Le programme Matthews (CCP4suite) a été utilisé pour déterminer le nombre de molécules (protéine seule ou en complexe) à positionner dans l'unité asymétrique. La similarité du modèle avec la structure à résoudre a été indiquée en termes de rmsd (1Å). Les solutions ont été cherchées dans l'ensemble des groupes d'espace appartenant au groupe ponctuel de symétrie identifié lors du traitement des données. Le choix parmi les solutions proposées se fait sur des critères statistiques comme le facteur d'accord Z-score entre la position du modèle et le jeu de données expérimentales, le TFZ-score en particulier doit être > 7 pour considérer la solution comme probable. Ce dernier est calculé en comparant le logarithme de vraisemblance (LLG) de la fonction de translation déterminée à celui d'une fonction de translation aléatoire, ainsi plus le TFZ-score est élevé plus la solution est probable.

3. Affinement et validation

Les coordonnées du modèle initial déterminé par remplacement moléculaire ou par construction automatique dans une carte de densité électronique calculée à partir des positions d'atomes lourds ont été corrigées manuellement en ajustant les positions atomiques dans la carte de densité électronique grâce au programme de visualisation COOT (Emsley and Cowtan 2004) et affinées par le programme BUSTER (Blanc, Roversi et al. 2004). Ce dernier affine les positions atomiques de façon à minimiser l'écart entre les modules des facteurs de structure calculés à partir de ces coordonnées et les modules de facteurs de structure observés, tout en tenant compte des contraintes géométriques. Lorsque l'unité asymétrique contient plusieurs molécules, les symétries non cristallographiques ont été utilisées pour réduire le nombre de paramètres à affiner. Les paramètres de TLS (Translation Libration Screw) ont également été utilisés pour modéliser des mouvements vibrationnels pouvant rendre compte des facteurs d'agitation thermique (Facteurs B) observés. Du fait de la basse résolution des jeux de données (inférieur à 3Å), il n'a pas été possible de modéliser les molécules de solvant. Des cycles itératifs de correction-affinement ont été menés jusqu'à convergence des facteurs d'accord R_{fact} et R_{free} .

Le modèle a été validé grâce aux outils de COOT (qui permettent de vérifier le diagramme de Ramachandran, d'optimiser les rotamères des chaînes latérales...) et au serveur de validation de la Protein Data Bank.

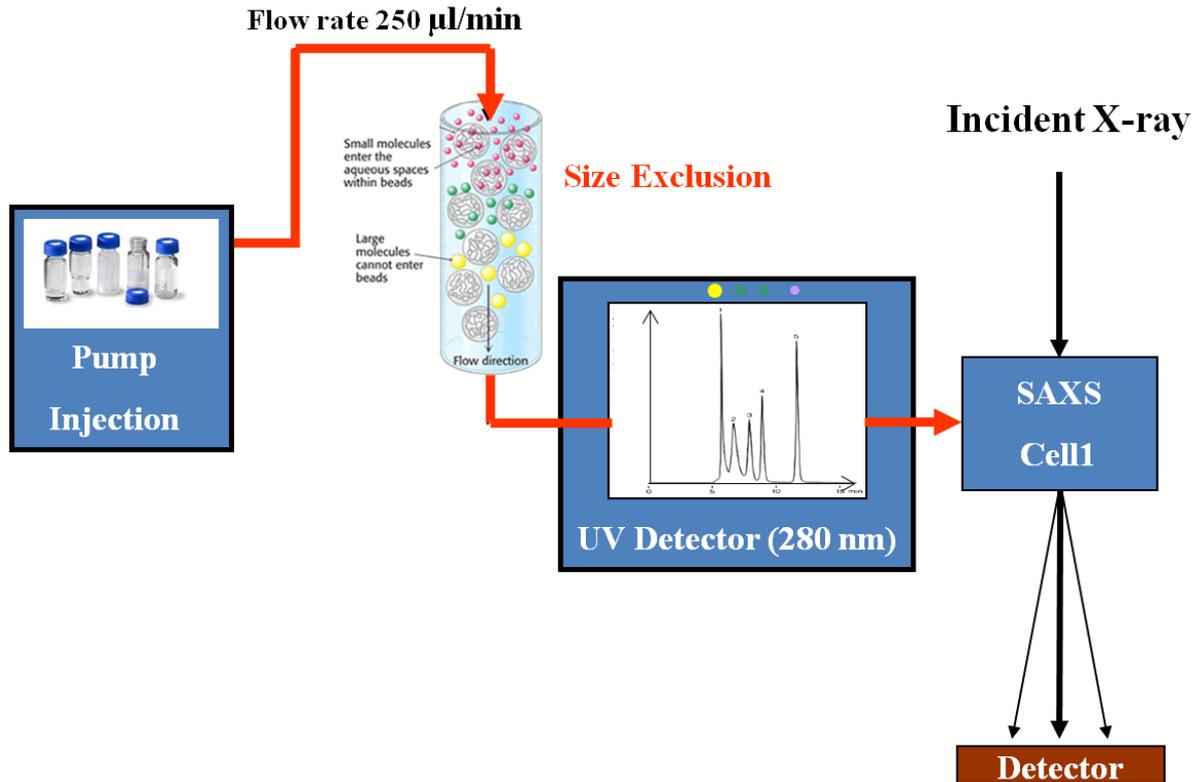


FIGURE 44: Expérience SAXS

Pour mesurer la diffusion des rayons X aux petits angles par un échantillon en solution, il est nécessaire que ce dernier soit pure et monodisperse. Pour ce faire, la ligne de lumière SWING au synchrotron SOLEIL dispose d'un système de gel filtration en HPLC pour séparer et mesurer les différentes espèces moléculaires.

H. SAXS

Les mesures de SAXS ([FIGURE 44](#)) ont été réalisées sur la ligne de lumière SWING (Synchrotron SOLEIL) par Javier Perez. Un volume de 40 μ l de protéines diluées dans du tampon E' (20mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl) à une concentration finale de 10mg/ml (200 μ M), a été injecté sur une colonne analytique d'exclusion de taille (SHOEDEX-KW403) montée sur un système HPLC Agilent© (High Performance Liquid Chromatography). Les échantillons sont élués à 150 μ L/min directement à travers un capillaire en quartz (diamètre 1.5mm) thermostaté à 15°C pour être exposés aux rayons X. La longueur d'onde du faisceau incident est de 1.033Å et le détecteur (Aviex) a été placé à 1.85m de l'échantillon. La gamme du vecteur de diffusion Q observé est de 0.018 à 0.4Å⁻¹. Les données ont été enregistrées avec un temps d'exposition de 2sec par images et un temps mort de 1sec entre chaque image. Les 30 premières images enregistrées correspondant au début de l'élution ont été moyennées pour servir de référence tampon. Lors de l'élution du pic protéique, 255 images ont été enregistrées, les 10 images correspondant au sommet du pic d'élution (plus hautes intensité d'absorbance) ont été moyennées en vérifiant que le Rayon de giration est stable d'une image à l'autre. Les données ont été traitées par le logiciel Foxtrot développé par l'équipe de ligne.

I. Etudes bioinformatiques

1. Analyses des séquences

Le logiciel en ligne ProtParam (site Expasy) a été utilisé pour déterminer les paramètres physico-chimiques des protéines, tel que le point isoélectrique (pI) ou le coefficient d'extinction massique nécessaire au calcul de leur concentration (**ANNEXE C**).

Les alignements de séquences multiples ont effectués *via* le logiciel en ligne ClustalW (Chenna, Sugawara et al. 2003), optimisés manuellement grâce au programme Seaview (Gouy, Guindon et al. 2010) avant d'être injectés dans le logiciel en ligne Esript (Gouet, Robert et al. 2003) pour la superposition des éléments de structures secondaires.

Les recherches de séquences homologues ont été effectuées en utilisant le logiciel psiBLAST avec les paramètres par défaut (site Expasy).

2. Analyses structurales

Les superposition structurales ont été réalisées grâce au programme en ligne PDBeFold (Krissinel and Henrick 2004). Les études d'interactions ont été effectuées à l'aide des programmes en ligne PDBePISA et PDBSum (Krissinel and Henrick 2007) (Laskowski 2009).

III. RESULTATS

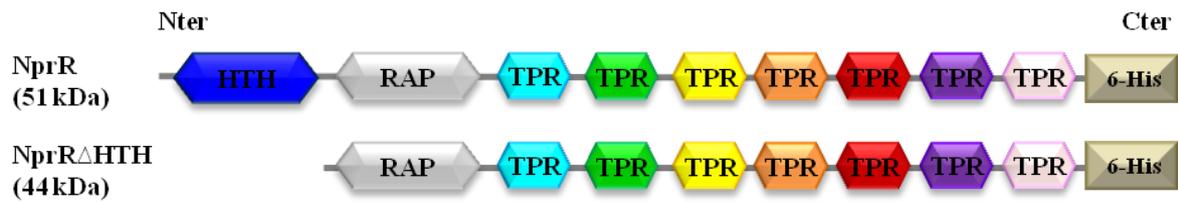


FIGURE 45: Organisation en domaines de l'effecteur NprR basée sur sa séquence

NprR se compose d'un domaine de liaison à l'ADN à motif HTH en Nter, suivi d'un domaine central apparenté aux protéines Rap, ainsi que de sept motifs TPR en Cter. Pour augmenter nos chances d'obtenir des cristaux exploitables, une forme tronquée, où le domaine HTH a été délété, est également étudiée ([ANNEXE A](#)).

A. Production et caractérisations biochimiques de l'effecteur

1. Généralités

Nous travaillons sur la protéine NprR de la souche modèle *Bacillus thuringiensis* 407 appartenant au groupe-I selon le classement phylogénétique réalisé par nos collaborateurs ([FIGURE 28](#), p69) (Perchat, Dubois et al. 2011). Ces mêmes collaborateurs ont préparé deux vecteurs d'expression (pQE60) exprimant respectivement la forme entière de NprR et une forme tronquée, appelée NprR Δ HTH, déletée des 60 résidus N-terminaux correspondant au domaine HTH ([FIGURE 45](#) et [ANNEXE A](#)). En effet, ces domaines sont connus pour être flexibles en absence d'ADN (Lewis, Chang et al. 1996) et pourraient donc rendre difficile la cristallisation de l'effecteur. De plus, afin de résoudre la structure cristallographique de l'effecteur par la méthode de phasage SAD, j'ai également produit la protéine tronquée marquée au sélénium, NprR Δ HTH-SeMet comprenant 11 Méthionines (Matériel & Méthodes p78 et [ANNEXE A](#)). Les protéines recombinantes sont exprimées dans une souche M15 d'*E. coli* avec une étiquette 6-His en Cter permettant de les purifier par une première étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel sans gêner ultérieurement la fixation de la protéine entière NprR à l'ADN.

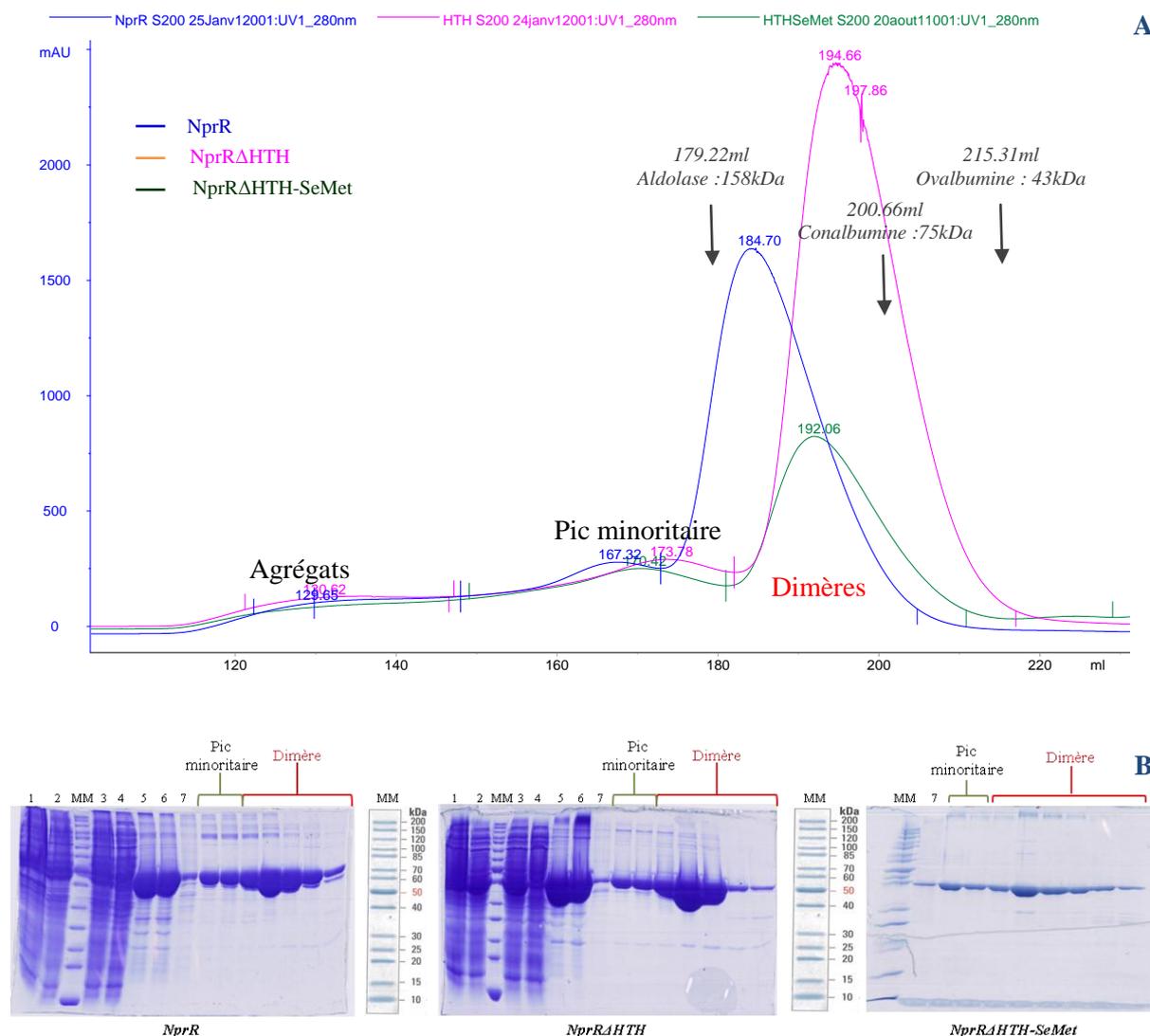


FIGURE 46: Purification des protéines NprR et NprRAHTH

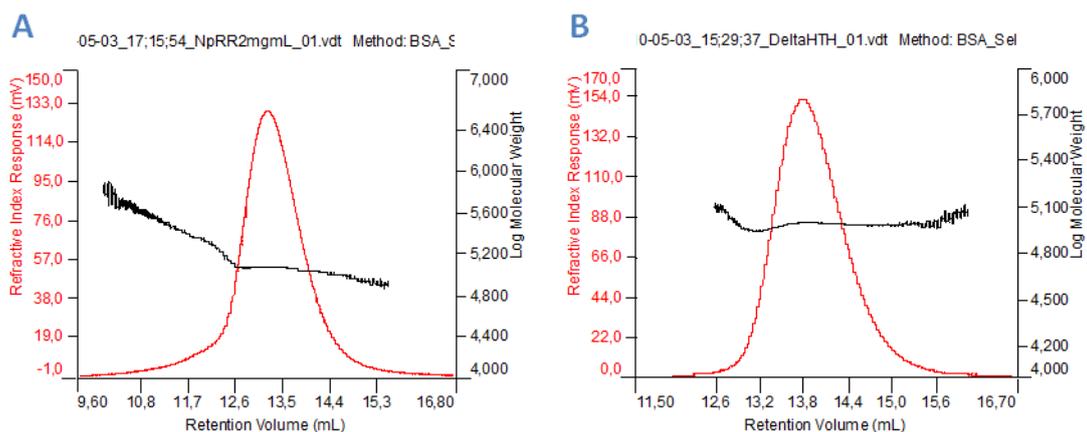
A. Profil d'élution en chromatographie d'exclusion de taille (SEC) : les protéines purifiées en sortie d'IMAC ont été injectées sur une colonne préparatrice SEC (S200-26/60). Les chromatogrammes représentent l'absorbance à 280nm (mAU) en fonction du volume d'élution (ml).

B. Analyse sur gels SDS-PAGE : 10µl d'échantillon ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12.5%. Les puits 1 et 2 représentent respectivement les fractions de lyse totale et soluble. Le puits 3 correspond à l'échantillon injecté sur la colonne IMAC (fraction soluble après filtration). Le puits 4 correspond à une fraction protéique non retenue sur la colonne IMAC durant l'injection. Les puits 5 et 6 correspondent au pic d'élution de la chromatographie IMAC. Enfin, le puits 7 correspond à une fraction élue un peu après le volume mort de la colonne SEC (S200-26/60) pouvant contenir des agrégats. Les puits suivants correspondent aux pics minoritaire et majoritaire de la colonne SEC.

2. Purification des échantillons pour la cristallisation

Les protéines NprR, Npr Δ HTH et Npr Δ HTH-SeMet sont purifiées en deux étapes selon le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes : une chromatographie d'affinité sur résine de nickel suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. J'obtiens les protéines purifiées NprR (51 kDa) et Npr Δ HTH (45 kDa) avec un rendement moyen de 40 mg par litre de culture. Dans les deux cas, les profils d'élution de la colonne d'exclusion de taille présentent un pic majoritaire à des volumes d'élution de 184.70 ml et 194.66 ml respectivement pour NprR et Npr Δ HTH précédé d'un pic minoritaire à des volumes d'élution de 167.32 ml et 173.78 ml respectivement pour NprR et Npr Δ HTH (**FIGURE 46-A**). L'analyse électrophorétique sur gel SDS-PAGE des fractions d'élution montre que les 2 pics contiennent une bande largement majoritaire, de masse correspondant à la protéine purifiée, NprR ou Npr Δ HTH (**FIGURE 46-B**). La pureté des échantillons n'est cependant que relative et on note la présence de contaminants de faibles poids moléculaires ainsi que des contaminants de hauts poids moléculaires, plus importants dans le pic minoritaire que dans le pic majoritaire. D'après la calibration de la colonne (Matériels et Méthodes p84), les pics identifiés correspondent à des tétramères et des dimères. Ainsi, dans les conditions de purification, la forme Apo de l'effecteur NprR est majoritairement sous forme dimérique. Le pic minoritaire suggère l'existence d'un équilibre avec une forme tétramérique minoritaire mais pourrait également s'expliquer par la présence des contaminants de haut poids moléculaire.

Les fractions correspondant au pic majoritaire sont mélangées et concentrées sur des unités de filtration (Vivaspin) ayant un cut-off de 30kDa. Dans le tampon de purification, les échantillons de protéine entière NprR peuvent être concentrés jusqu'à 45 mg/ml (876 μ M) alors que la forme tronquée Npr Δ HTH est plus soluble et supporte une concentration allant jusqu'à 60mg/ml (1.33mM). La protéine tronquée et marquée au sélénium, Npr Δ HTH-SeMet, est également purifiée sous une forme majoritaire dimérique mais un avec rendement de purification moindre (10mg pour 2L de culture) et une solubilité légèrement réduite, l'échantillon marqué pouvant être concentré jusqu'à 20mg/ml.



Paramètres	NprR (2mg/ml)	NprRAHTH (2mg/ml)
Mw théoriques (Da)	51 339	44 490
Mw mesurées (Da)	114 277	96 993
Rh (nm)	4.508	4.353
Concentration (mg/ml)	1.339	1.303
Etat oligomérique	Dimère	Dimère

FIGURE 47: Analyse par SEC-MALS des protéines NprR et NprRAHTH

A. NprR B. NprRAHTH

Les mesures ont été effectuées à partir des protéines diluées à 2mg/ml ($\approx 40\mu\text{M}$) dans du tampon E ajusté à pH7.5. 100 μl d'échantillon sont injectés sur une colonne Superdex S200-10/300, équilibrée donc dans le tampon E pH 7.5. Les chromatogrammes représentent l'indice de réfraction en mV (axe des ordonnées de gauche, courbe rouge) et le logarithme de la masse moléculaire (axe des ordonnées de droite, courbe noir) en fonction du volume d'élution en ml.

3. Analyse par SEC-MALS

Nous avons cherché à confirmer l'état oligomérique des protéines en solution et pour ce faire, nous nous sommes tournées vers le SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography – Multi-Angles Light Scattering). Cette méthode permet de calculer la masse moléculaire des analytes qui composent un échantillon, indépendamment du volume d'élution, grâce à la mesure de leur indice de réfraction. Nous avons analysé les deux formes de l'effecteur à une concentration de 2mg/ml soit 40 μ M et 45 μ M respectivement pour NprR et NprR Δ HTH. Dans les deux cas, la masse moléculaire mesurée est stable sous les pics d'élution ce qui indique que les échantillons sont homogènes. A partir des indices de réfraction, des masses moléculaires de 114 277Da et 96993Da ont été calculées respectivement pour NprR et NprR Δ HTH, ce qui correspond à des formes dimériques des protéines (**FIGURE 47 – A et B**). Ces expériences confirment que la forme Apo de l'effecteur est dimérique en solution.

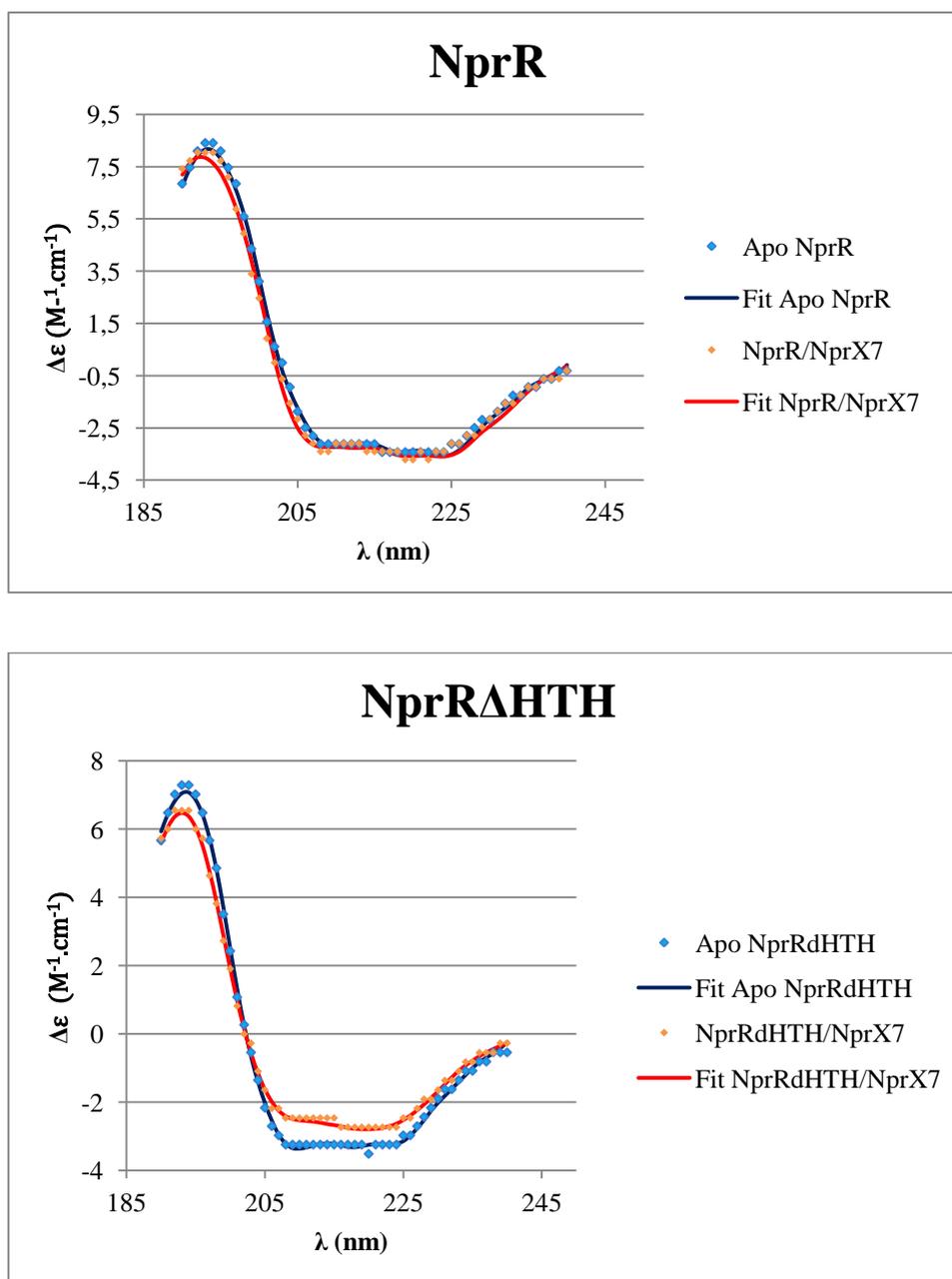


FIGURE 48: Spectres CD des formes Apo et complexées de l'effecteur

Les mesures ont été effectuées à 20°C sur une gamme de longueur d'onde allant de 185 à 260nm, les données traitées ont été réduites à une gamme de 190-240nm. Les protéines ont été diluées à 5mg/ml (100 μ M) dans du tampon Phosphate (50mM, pH7.8, 50mM NaF). Le peptide NprX7 a été ajouté à une concentration de 500 μ M pour mesurer les complexes. Les spectres représentent la différence entre les coefficients d'extinction molaire ($\Delta\epsilon$ en $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) en fonction de la longueur d'onde (λ en nm).

B. Le switch moléculaire

Le but du projet est de comprendre comment NprX fait basculer NprR d'une fonction inhibiteur de la sporulation à une fonction facteur de transcription. J'ai donc cherché à caractériser l'effet de la fixation de NprX sur NprR en solution.

1. Effet du peptide sur la structure secondaire de NprR : mesures en dichroïsme circulaire.

Les spectres CD (Circular Dichroïsme) de NprR et NprR Δ HTH ont été enregistrés sur les protéines seules dialysées dans du tampon phosphate à 50mM pH7.8, 50mM NaF et diluées à 100 μ M. Les spectres présentent un profil typique des structures en hélice α (Matériels et Méthodes p91). J'ai mesuré l'effet du peptide NprX7 à une concentration de 500 μ M sur la structure secondaire observée pour les formes Apo. Les spectres des complexes sont similaires à ceux des formes Apo, indiquant que la fixation du peptide ne modifie pas la structure secondaire globale de l'effecteur (**FIGURE 48**).

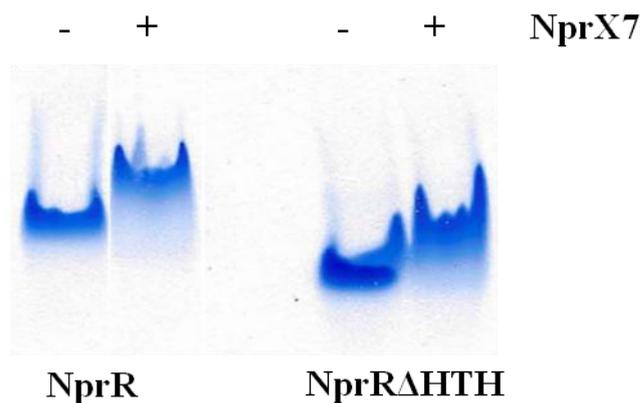
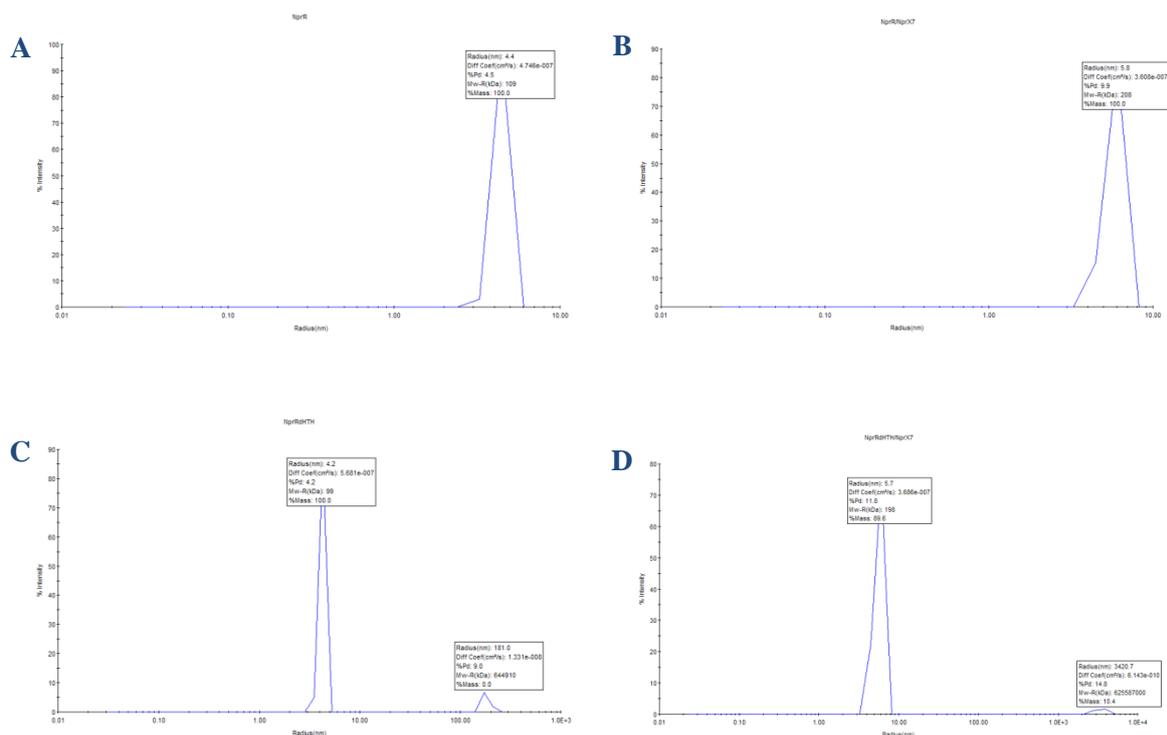


FIGURE 49: Effet de la fixation du peptide sur la migration électrophorétique de l'effecteur

15µg de protéine (10µl à 20µM) ont été déposés sur une gel non dénaturant à 8%. Pour les complexes, le peptide NprX7 est ajouté en large excès à une concentration de 1mM avant dépôt. La migration s'est faite à température ambiante pendant 2h30 à 100V.

2. Effet du peptide sur NprR : électrophorèse en conditions non dénaturantes.

L'électrophorèse en conditions non-dénaturantes est couramment utilisée pour vérifier la pureté et l'homogénéité des échantillons protéiques. C'est une méthode simple qui permet également d'observer un changement de masse ou de charge de la protéine étudiée. J'ai donc testé cette technique pour analyser l'effet de NprX sur NprR. Les deux formes protéiques, entière et tronquée, ont été déposées sur un gel polyacrylamide à 8%, seules ou en complexe avec NprX7. De manière semblable, les complexes NprR/NprX7 comme NprR Δ H7TH/NprX7 présentent une migration électrophorétique moindre que les formes Apo (**FIGURE 49**). Ce shift peut être dû à une hausse du degré d'oligomérisation par rapport à la forme Apo dimérique.



Echantillons	Rh (nm)	Pd (%)	MW (kDa)	ETAT
NprR	4.4	4.5	109	Dimérique
NprR/NprX7	5.8	9.9	208	Tétramérique
NprRAHTH	4.2	4.2	99	Dimérique
NprRAHTH/NprX7	5.7	11.8	198	Tétramérique

FIGURE 50: Mesure en diffusion dynamique de la lumière

Les mesures ont été réalisées avec les protéines NprR (courbe **A**) et NprRAHTH (courbe **C**) diluées dans du tampon E à une concentration finale de 1mg/ml ($\approx 20\mu\text{M}$). Pour les mesures avec les complexes (courbes **B** et **D**), le peptide NprX7 a été ajouté à une concentration finale de 200 μM . Les graphes correspondent à l'intensité (en %) de la lumière diffusée en fonction du rayon hydrodynamique (Rh en nm). Le tableau donne pour chacun des 4 échantillons les masses molaires (MW) calculées à partir des Rh ainsi que le % de polydispersité (Pd) correspondant et l'état oligomérique déduit de la masse moléculaire.

3. Effet du peptide sur l'état oligomérique de NprR : mesures en diffusion dynamique de lumière.

Afin de confirmer que le peptide fait basculer l'effecteur vers une forme oligomérique plus élevée que la forme Apo dimérique, j'ai utilisé la diffusion dynamique de la lumière qui permet de mesurer le rayon hydrodynamique des protéines.

Les formes Apo NprR et NprR Δ HTH présentent des rayons hydrodynamiques de 4.4nm et de 4.2nm respectivement qui correspondent à des poids moléculaires moyen de 100kDa pour une protéine globulaire, comme ce que l'on a pu observer précédemment en SEC-MALS. NprR faisant 51kDa et NprR Δ HTH 45kDa, ces résultats confirment l'état dimérique des formes Apo NprR et Apo NprR Δ HTH en solution. En présence du peptide, les complexes NprR/NprX7 et NprR Δ HTH/NprX7 ont des rayons hydrodynamiques respectifs de 5.8 nm et de 5.7 nm, qui dans ce cas correspondent à des poids moléculaires moyen de 200kDa (**FIGURE 50**). Ces résultats confirment donc que la fixation du peptide induit un changement d'oligomérisation de l'effecteur, le faisant basculer d'une forme Apo dimérique à une forme complexée tétramérique.



FIGURE 51: Séquence du peptide NprX

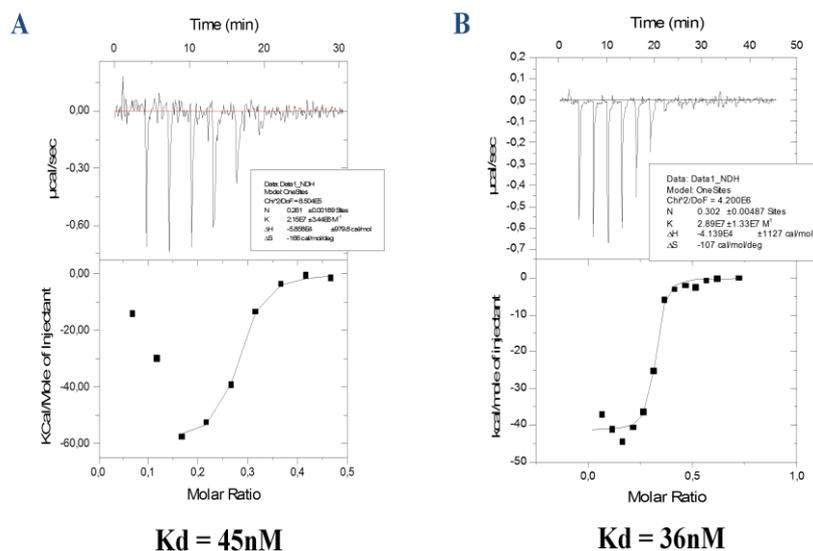


FIGURE 52: Courbes ITC des complexes effecteur/peptide du groupe I

A. Interaction NprR/NprX7 **B. Interaction NprRAHTH/NprX7**

Les fenêtres supérieures représentent la quantité de chaleur dégagée ($\mu\text{cal/sec}$) dans la cellule de mesure en fonction du temps (min) et correspondent aux données brutes. Les fenêtres inférieures représentent la quantité de chaleur dégagée à chaque injection de peptide (kcal/mole de peptide) en fonction du ration molaire peptide/protéine et correspondent aux données traitées.

NprX-I	Kd (NprRAHTH) en μM	n	ΔH (kcal/mol)
7aa : SKPDIVG	0.1 ± 0.014	0.7	-11 ± 0.1
8n : SKPDIVG	0.026 ± 0.01	0.5	-23 ± 0.22
9n : YSSKPDIVG	0.2 ± 0.03	0.6	-12 ± 0.15
8c : SKPDIVGQ	1 ± 0.17	0.4	-5.5 ± 0.55

TABLEAU 2 : Interaction NprRAHTH/NprX du groupe I

Valeurs de la constante de dissociation (Kd), de la stœchiométrie (n) et de l'enthalpie (ΔH) calculées pour les expériences ITC décrites figure 50 avec NprRAHTH et différentes formes du peptide NprX.

C. Caractérisation des interactions entre NprR et ses ligands

1. Interaction entre NprR et son peptide signal NprX

Les différentes étapes de maturation de NprX ([FIGURE 51](#)) étant encore inconnues, nous avons testé la fixation par NprR de la forme minimale active NprX7 (SKPDIVG) mais également des formes plus longues de 8 et 9 aa ainsi que le motif conservé SKPDI (NprX5) (Perchat, Dubois et al. 2011). La mise au point des conditions expérimentales a été effectuée avec NprX7 sur les deux formes de NprR. L'interaction est de type exothermique, avec un ΔH négatif. La forme entière et la forme tronquée ont une affinité similaire pour le peptide, avec une constante de dissociation moyenne à l'équilibre, K_d , d'environ 50nM (Perchat, Dubois et al. 2011) ([FIGURE 52 – A et B](#)). Cependant l'ajout du peptide induit un phénomène de précipitation qui est plus prononcé dans le cas de NprR, c'est pour cette raison que par la suite, toutes les mesures d'interaction avec le peptide ont été faites sur la protéine tronquée NprR Δ HTH.

Aucune interaction n'a été détectée avec le motif conservé SKPDI, expliquant son incapacité à activer la fonction facteur de transcription de NprR (Perchat, Dubois et al. 2011). Ce résultat suggère un rôle essentiel pour la fixation du peptide, des deux résidus manquants en Cter, par rapport à la forme minimale active SKPDIVG, à savoir la Valine et la Glycine. L'allongement du peptide actif NprX7 d'un ou deux résidus en Nter avec NprX8n et NprX9n ne modifie pas notablement l'affinité. Dans cette série d'expérience le K_d du peptide NprX7 est 2 fois plus élevé ($K_d = 100\text{nM}$) que précédemment. Des différences pouvant aller jusqu'à un facteur 4 ont été observées en fonction des lots de protéine. Les comparaisons sont donc faites uniquement entre les mesures effectuées le même jour et sur le même lot de protéine. Le peptide NprX8n présente une meilleure affinité que la forme minimale active NprX7 avec un K_d de 26nM, ce qui peut poser la question quant à la forme physiologiquement mature du peptide. Par contre, un allongement d'un seul résidu en Cter avec NprX8c entraîne une forte baisse d'affinité avec un K_d d'environ 1 μM , ce qui suggère que la forme mature se termine au niveau de la Glycine Cter ([TABLEAU 2](#)).

ADN (3' → 5')	Kd (NprR/NprX7) en μM
A36 : AATATTTGTTTCCTCAAAATCTACAAAAC TTGAGAA	-
A29 : AATATTTGTTTCCTCAAAATCTACAAAAC	-
B34 : TACAAAAC TTGAGAAAA AAAAATTATTTGAATTTTT	5.3 ± 1.8
B30 : TACAAAAC TTGAGAAAA AAAAATTATTTGAAT	3.1 ± 1.0
B26a : ATTCTACAAAAC TTGAGAAAA AAAAATT	2.3 ± 0.7
B26b : TACAAAAC TTGAGAAAA AAAAATTATTT	2.7 ± 1.2
B22 : TACAAAAC TTGAGAAAA AAAAATT	2.7 ± 0.5

TABLEAU 3 : Kd des complexes NprR/NprX7/ADN mesurés par ITC

Les mesures ont été effectuées avec le complexe NprR/NprX7 préformé dans la cellule de mesure à 10 ou 30 μM . Les oligonucléotides dans la seringue (120 ou 330 μM) ont été injectés par une série de 20 injections de 2 μl espacées de 180 sec.

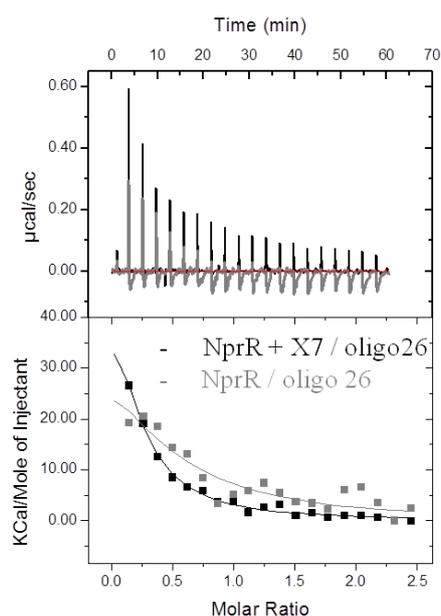


FIGURE 53: Mesures d'ITC des complexes NprR/B26 et NprR/NprX/B26

Superposition des résultats brutes (quantité de chaleur dégagée en fonction du temps) et analysés (quantité de chaleur dégagée en fonction du ratio molaire ADN/protéine) obtenus en injectant l'oligonucléotide B26a dans la cellule contenant NprR seule ou en complexe avec NprX7. Les conditions de mesures sont décrites dans la légende de la FIGURE 50.

2. Spécificité de reconnaissance NprR/ADN et NprR/NprX/ADN

a) Mesures d'ITC

Le régulateur de NprR a récemment été identifié par nos collaborateurs (Dubois, Faegri et al. 2012) mais la boîte NprR de reconnaissance spécifique n'a pas encore été déterminée. Des analyses transcriptomiques suggèrent cependant que le complexe NprR/NprX7 reconnaît la région -35 du promoteur du gène *nprA* (Perchat, Dubois et al. 2011). Afin de préciser la zone de fixation, nous avons testé l'interaction du complexe NprR/NprX7 avec des oligonucléotides soit centrés sur la boîte -35 (colorée en bleu) du promoteur de *nprA* (région B en violet) soit situés juste en amont de cette même boîte -35 (région A en jaune) comme indiqué sur la **FIGURE 54** ci-dessous :

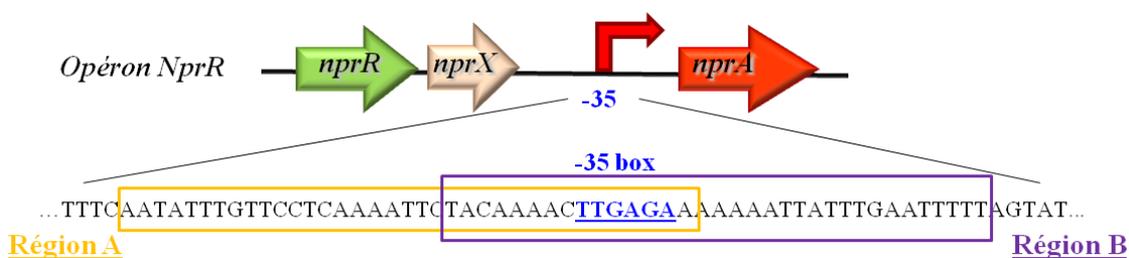


FIGURE 54 : Région promotrice du gène *nprA* contrôlé par NprR/NprX7

Cette première série d'expérience nous a permis de montrer que le complexe reconnaît les oligonucléotides de la région B, centrée sur la boîte -35, avec un Kd d'environ 3 μ M (**TABLEAU 3**) (Perchat, Dubois et al. 2011). Bien que NprR n'active pas la transcription de *nprA* en absence de peptide (Perchat, Dubois et al. 2011), nous avons testé si l'interaction avec l'ADN était possible dans ces conditions. Les mesures d'ITC réalisées avec Apo NprR et les oligonucléotides utilisés dans les mesures précédentes montrent un signal d'interaction, plus faible qu'en présence du peptide avec la région B (**FIGURE 53** ci-contre). De même, nous avons pu observer un signal d'interaction avec les oligonucléotides de la région A sans pour autant pouvoir calculer de Kd significatif. Sachant que la fixation du peptide fait basculer NprR d'une forme dimérique inactive, en tant que facteur de transcription, vers une forme tétramérique active, ces résultats d'ITC suggèrent que NprX influe sur la spécificité de reconnaissance de NprR pour l'ADN en permettant l'interaction simultanée avec deux sites distincts comme cela a pu être observé dans le cas de PrgX (Shi, Brown et al. 2005).

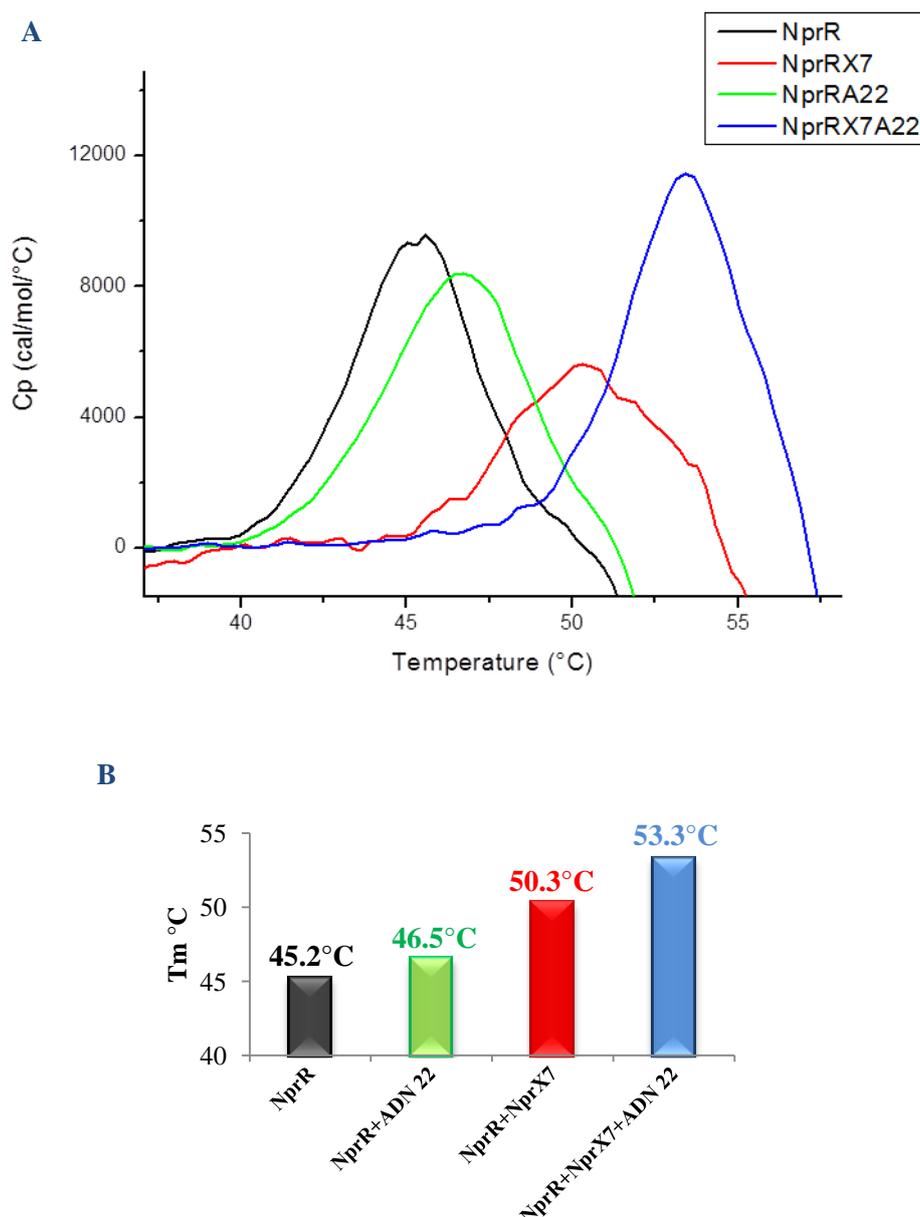


FIGURE 55: Effet de la fixation du peptide et de l'ADN sur la stabilité de NprR

A. Courbes de DSC. **B.** Températures de demi-dénaturation (T_m) mesurées pour chacune des expériences présentées en A.

Les mesures ont été effectuées à des concentrations finales de 9.6µM en protéine, 9.6µM en peptide et 4.8µM en ADN B22. Les échantillons ont été placés à 20°C puis chauffés à une vitesse de 1°C/min jusqu'à une température finale de 80°C. Les courbes représentent la capacité calorifique de la protéine (Cp en cal/mol/°C) en fonction de la température en °C.

b) Mesures de DSC

Pour approfondir l'analyse de l'effet du peptide sur l'interaction de NprR avec l'ADN, nous avons effectué des mesures de calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) avec l'oligonucléotide de 22 pb compris dans la région B (Matériels et Méthodes p 90). Les températures de demi-dénaturation (T_m) de NprR ont été mesurées sur la protéine seule, en complexe binaire avec le peptide ou l'oligonucléotide B22 et finalement en complexe ternaire avec le peptide et l'oligonucléotide (**FIGURE 55 – A et B**). La comparaison de ces expériences permet de rendre compte de la force d'interaction de ces complexes. En présence de peptide, le complexe NprR/NprX a une température de demi dénaturation (T_m) de 50.3°C, soit 5°C de plus que la forme Apo caractérisée par un T_m de 45.2°C. Cela signifie que la présence du peptide stabilise NprR. Par contre, le complexe NprR/B22 présente un T_m de 46.5°C, à peine plus élevé que celui observé pour NprR seul. La présence de l'oligonucléotide n'a donc pas le même effet stabilisant que le peptide, ce qui suggère une interaction non spécifique. En revanche, les mesures effectuées sur le complexe ternaire NprR/NprX/ADN-22 démontrent qu'il est encore plus stable que le complexe binaire NprR/NprX7, avec un T_m de 53.3°C, ce qui supporte l'hypothèse selon laquelle la présence du peptide, est nécessaire pour la formation de complexes spécifiques entre l'effecteur NprR et l'ADN.

NprX	Kd (NprRAHTH) en μM	n	ΔH en Kcal/mol
Groupe I : SKPDI VG	0.12 ± 0.015	0.87	-10.4 ± 0.08
Groupe II : SKP D TYG	0.25 ± 0.04	0.76	-14 ± 0.14
Groupe III : S NPDIYG	0.08 ± 0.02	0.7	-17 ± 0.25
Groupe IV : S RPD V LT	6 ± 0.5	0.45	-5 ± 0.19
Groupe V-VI-VII : W KPD T LG	3 ± 0.3	0.46	-7.8 ± 0.24

TABLEAU 4: Interaction NprRAHTH et NprX des groupes II à VII

Le Kd, la stœchiométrie (n) et l'enthalpie ΔH de l'interaction entre NprRAHTH et les heptapeptides NprX7 des 7 phérogroupe ont été déterminés par des mesures d'ITC réalisées dans les conditions suivantes : protéine à $50 \mu\text{M}$ dans la cellule de mesure et peptide à $500 \mu\text{M}$ dans la seringue d'injection. Les peptides ont été ajoutés dans la cellule de mesure par une première injection de $0.4\mu\text{l}$ suivie de 36 injections successives de $1 \mu\text{l}$, espacées de 180 sec.

D. Activation croisée

1. Spécificité d'interaction

Pour rappel, les couples NprR/NprX ont été classés en 7 groupes et il a été montré qu'en dehors de NprX7-I, seul l'heptapeptide du groupe II active la fonction facteur de transcription de NprR-I (Perchat, Dubois et al. 2011). Afin d'analyser la relation entre activation et fixation, nous avons testé la fixation des heptapeptides des groupes II, III, IV et VI (ce dernier étant également représentatif des groupes V et VII) ([TABLEAU 4](#)). On vérifie ainsi que le peptide actif NprX7-II (SKPD**TYG**) porteur de 2 substitutions en position 5 et 6 par rapport au NprX7-I (SKPD**IVG**) se fixe sur la protéine avec une affinité du même ordre de grandeur ($K_d = 250\text{nM}$ au lieu de 120nM). Ceci suggère que la nature des résidus en positions 5 et 6 de l'heptapeptide n'est pas importante pour l'interaction ni l'activation. De manière plus surprenante, le peptide inactif NprX7-III (SNPDI**YG**) présente également une forte affinité pour NprR-I avec un K_d de 80 nM . La substitution $V \rightarrow Y$ en position 6 étant également présente dans le peptide actif NprX7-II, ce résultat suggère que le résidu K en position 2 de NprX7-I est important pour l'activation mais pas pour la fixation. Une forte baisse d'affinité est observée avec NprX7-IV (SRPD**VLT**) qui présente en plus des 3 positions déjà discutées la substitution $G \rightarrow T$ en position 7. Les mesures d'interaction avec le peptide NprX8c ([TABLEAU 2 p129](#)) ayant déjà montré qu'il n'est pas possible d'allonger le peptide en Cter sans perte d'affinité, ce nouveau résultat montre qu'il est essentiel pour la fixation du peptide sur NprR-I, que le résidu en position 7 soit un G. L'heptapeptide caractéristique des groupes V à VII (WKPD**TLG**) est également beaucoup moins affin que NprX7-I, sans doute à cause d'une gêne stérique introduite par la substitution $S \rightarrow W$ en position 1. La faible affinité des peptides NprX7-IV et NprX7-V-VII pour NprR pourrait expliquer leur incapacité à activer la protéine. La raison pour laquelle le peptide NprX7-III n'active pas NprR reste quant à elle beaucoup moins claire. Il semblerait que NprX7-III se fixe de manière non productive, n'induisant pas la tétramérisation nécessaire à l'activation de NprR.

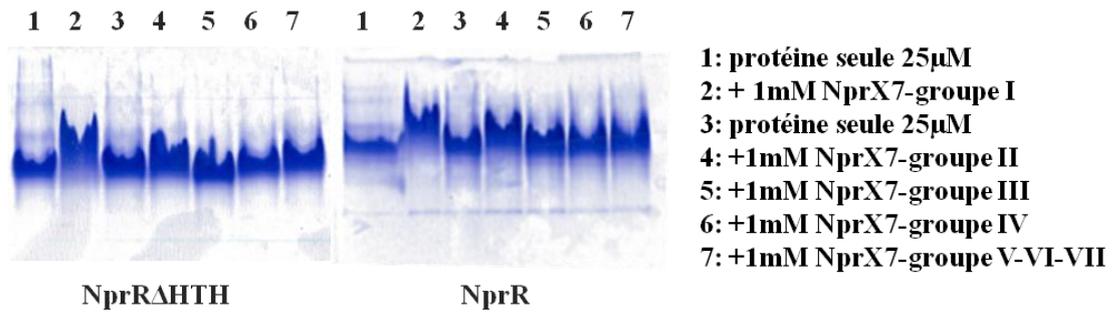


FIGURE 56: Effet de la fixation des peptides des groupes II à VII sur l'effecteur

15µg de protéine (10µl à 20µM) ont été déposés sur une gel acrylamide à 8% en conditions non dénaturantes. Pour les complexes, le peptide NprX7 est ajouté en large excès à une concentration de 1mM. La migration s'est faite à température ambiante pendant 2h30 à 100V.

2. Le switch moléculaire

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai testé l'effet des différents peptides NprX des groupes II à VII sur la migration de la protéine en gel natif. Bien que moins prononcé qu'avec NprX7-I, un shift vers les hauts poids moléculaires est également observé avec le complexe effecteur/NprX-II (**FIGURE 56**). Par contre, la fixation de NprX7-III n'a pas d'effet sur la migration de la protéine qui présente un profil électrophorétique similaire à la forme Apo. Les peptides moins affins des groupes IV à VII ne semblent pas non plus induire le shift révélateur de la tétramérisation. Toutefois, la résolution des gels n'étant pas satisfaisante, il serait plus sûr de vérifier ces résultats en DLS pour confirmer cette hypothèse.

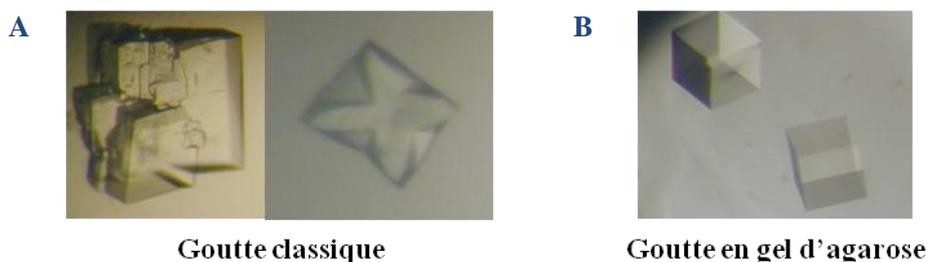


FIGURE 57: Crystallisation du complexe NprRAHTH/NprX

A. Cristaux « maclés » obtenus dans 0.975M NaCit, 0.1M Tris pH 7.6 par la méthode de la goutte suspendue. **B.** Cristaux obtenus par optimisation en gel d'agarose 0.2% dans la même solution de cristallisation qu'en **A** (Matériels et Méthodes p98).

Données structurales	Paramètres	Jeu SAD	Jeu natif
Données collectées	Groupe d'espace	P1	P1
	a, b, c (Å)	121.11, 133.02, 138.52	121.06, 132.88, 137.59
	α, β, γ (°)	108.35, 105.33, 103.24	108.42, 104.7, 103.5
	Résolution (Å)	45-3.5	50-3.1
	Réflexions observées	715919	520.825
	Réflexions uniques	187722	132663
	Complétude (%)	96.2	97
	[(I)/sd(I)] moyen*	10.25 (2.2)	16.87 (1.95)
	R _{sym} (%)*	16.3 (82.8)	8.8 (85.9)
	Sites Sélénium	19.84	20.01
Statistiques d'affinement	R _{crys} (%)	22.59	22.77
	R _{free} (%)	45-3.5	50-3.1
	Molécules/ua	12	12
	Ligands	SKPDI VG	SSKPDI VG

* Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution

TABLEAU 5: Données cristallographiques des structures NprRAHTH-SeMet/NprX7 et NprRAHTH/NprX8n

E. Analyse structurale de la conformation facteur de transcription

1. Les complexes NprR Δ HTH/NprX

a) Cristallisation et traitement des données de diffraction

Les essais de co-cristallisation de la forme entière NprR avec le peptide NprX7 n'ont donné lors du criblage que des aiguilles non reproductibles. Par contre, des monocristaux de complexe ont pu être obtenus avec la forme tronquée NprR Δ HTH dans les conditions de cristallisation suivantes : 0.975M Citrate de Sodium (NaCit) et 0.1M HEPES pH 7.6, [NprR Δ HTH] = 450 μ M et [NprX] = 2mM (**FIGURE 57 - A et B**). Ces cristaux ont diffracté autour de 3.5Å dans le groupe d'espace P1 avec une maille contenant 12 molécules. Les tentatives de remplacement moléculaire en utilisant comme modèle les domaines TPR de PlcR (Declerck, Bouillaut et al. 2007) et PrgX (Shi, Brown et al. 2005) ont été infructueuses. J'ai donc exprimé la protéine en substituant les méthionines par des sélénométhionines (NprR Δ HTH-SeMet) en vue de résoudre la structure par la méthode de phasage SAD. Les cristaux ont été obtenus dans les mêmes conditions que le complexe natif et ont diffracté à la même résolution de 3.5Å, avec un signal anomal à 4.7Å. Lors du phasage, 120 sites sélénium ont été déterminés sur les 132 théoriques (**ANNEXE A**). Seule la SeMet N-terminale n'a pas pu être localisée. Le pic de la SeMet 417, proche de l'extrémité C-terminale, est également de plus faible intensité et n'a été localisé qu'au stade d'affinement. La carte de densité électronique calculée à partir des positions des pics de sélénium a permis, après optimisation par aplatissement de solvant, la construction automatique d'un premier modèle partiel (80 % de la structure). Malgré la basse résolution de la carte de densité, la présence des nombreuses SeMet a permis d'attribuer la séquence au modèle et après quelques cycles d'affinement un premier modèle atomique des 12 chaînes contenues dans l'unité asymétrique a pu être obtenu. Cette structure a ensuite été affinée contre un jeu natif isomorphe obtenu en présence du peptide NprX8n et diffractant à 3.1Å de résolution. Les données cristallographiques de ces deux structures sont détaillées dans le **TABLEAU 5** ci-contre.

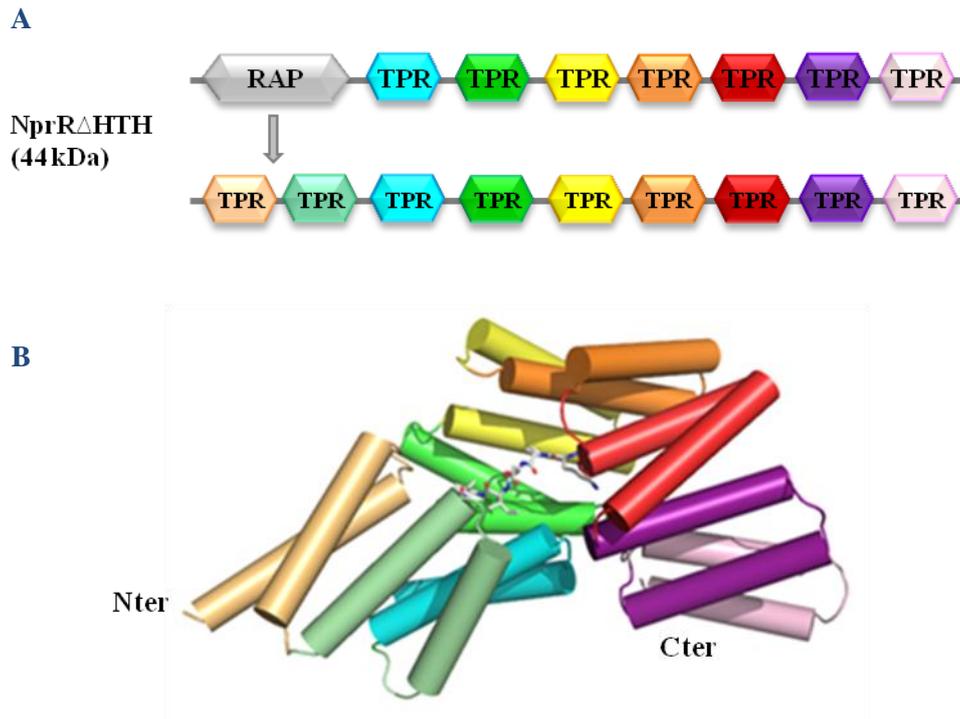


FIGURE 58: Structure globale de NprR Δ HTH en complexe avec NprX

A. Schéma expliquant le code couleur des 9 motifs TPR le long de la séquence de NprR Δ HTH. Le domaine RAP N-terminal correspond aux motifs TPR-1 et TPR-2 (en beige et vert olive). **B.** Structure en cartoon (hélices cylindriques) d'un protomère de NprR Δ HTH colorée selon (A) avec le peptide fixé représenté en sticks.

b) Structure générale

L'unité asymétrique contient donc 12 protomères de NprR Δ HTH, chacun complexé à un peptide NprX. Ces protomères sont équivalents et présentent un RMSD moyen de 0.625Å sur les 354 C α alignés. La structure d'une chaîne polypeptidique se compose de 18 hélices α organisées en 9 motifs TPR. Le domaine RAP N-terminal correspond aux motifs TPR-1 et TPR-2 (**FIGURE 58 – A et B**). L'ensemble de ces 9 motifs TPR forme une superhélice droite caractéristique des domaines TPR.

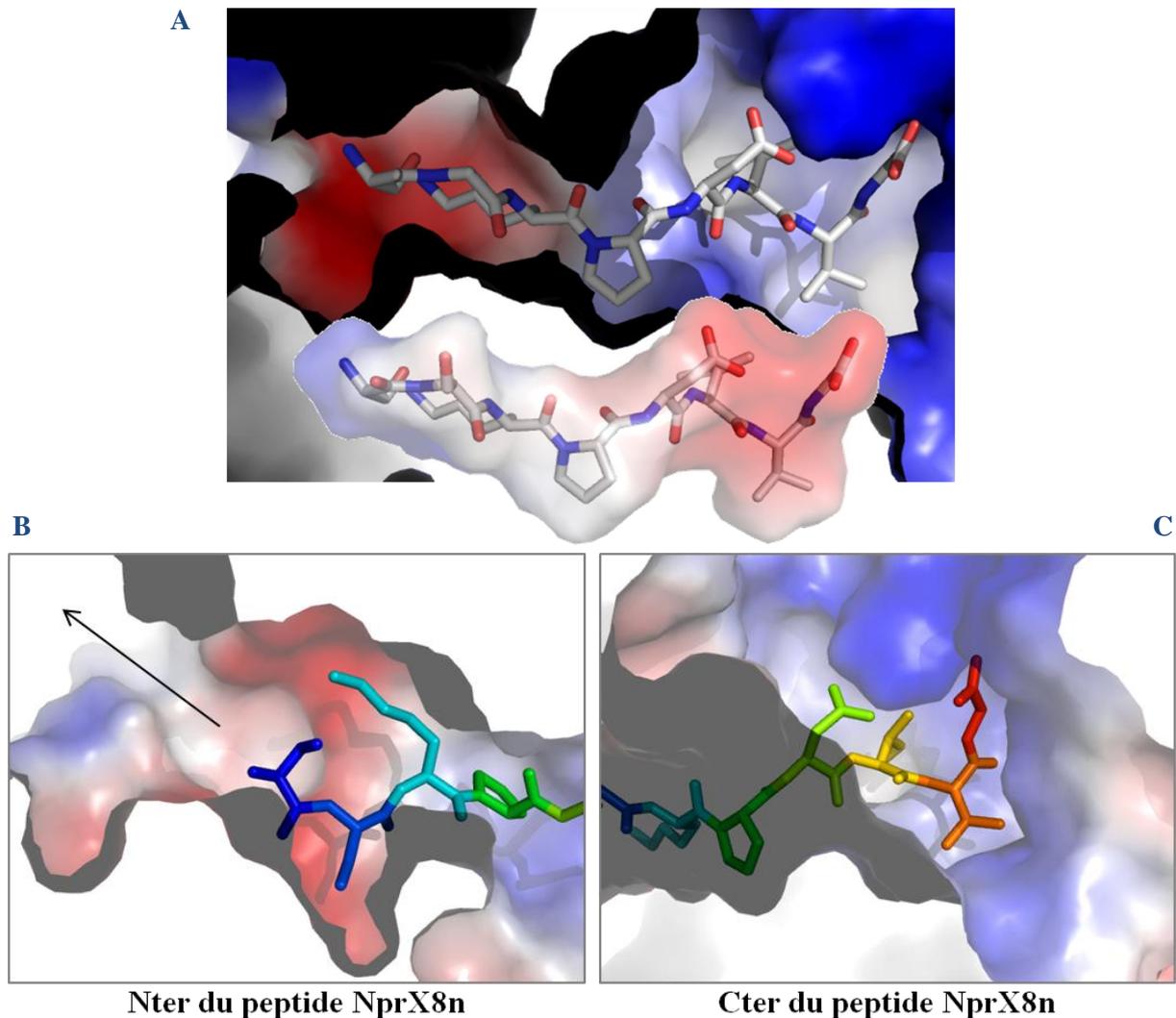


FIGURE 59: Fixation du peptide NprX par NprR

A. Zoom sur la poche de fixation du peptide NprX8n dans NprR Δ HTH : le peptide est représenté en sticks en coloration atomique (C en gris, N en bleu et O en rouge). La protéine est représentée en surface électrostatique (rouge pour acide, bleu pour basique et blanc pour hydrophobe). Le peptide est une seconde fois représenté en sticks sur fond de surface électrostatique transparente pour rendre compte de la complémentarité de surface.

B. Zoom sur la poche de fixation à l'extrémité Nter de NprX8n : le peptide est représenté en sticks et coloré en rainbow (du Nter en bleu au Cter en rouge). L'accessibilité au solvant est indiquée par une flèche noire.

C. Zoom sur la poche de fixation à l'extrémité Cter de NprX8n : Le peptide est représenté en sticks et coloré en rainbow. La région Cter du peptide est enfouie dans la poche.

c) Spécificité d'interaction avec le peptide

Les surfaces d'interaction impliquées sont de 725 \AA^2 ($\Delta G^i = -5.2 \text{ kcal/mol}$) et 756 \AA^2 ($\Delta G^i = -5.6 \text{ kcal/mol}$) respectivement pour NprX7 et NprX8n. La poche de fixation du peptide comprend une zone acide, une zone basique et une zone hydrophobe qui sont parfaitement complémentées par la séquence peptidique de NprX7 et NprX8n (**FIGURE 59-A**). la poche de fixation côté Nter du peptide est plus ouverte vers le solvant et permet donc à la protéine d'accommoder avec un certains degré de liberté des résidus supplémentaires (**FIGURE 59-B**). *A contrario*, la poche de fixation est fermée à l'extrémité Cter du peptide, ce qui peut expliquer la diminution d'affinité observée pour le complexe NprR Δ H Δ HTH/NprX8c où NprX8c est allongé d'un résidu Q en Cter (**FIGURE 59-C**).

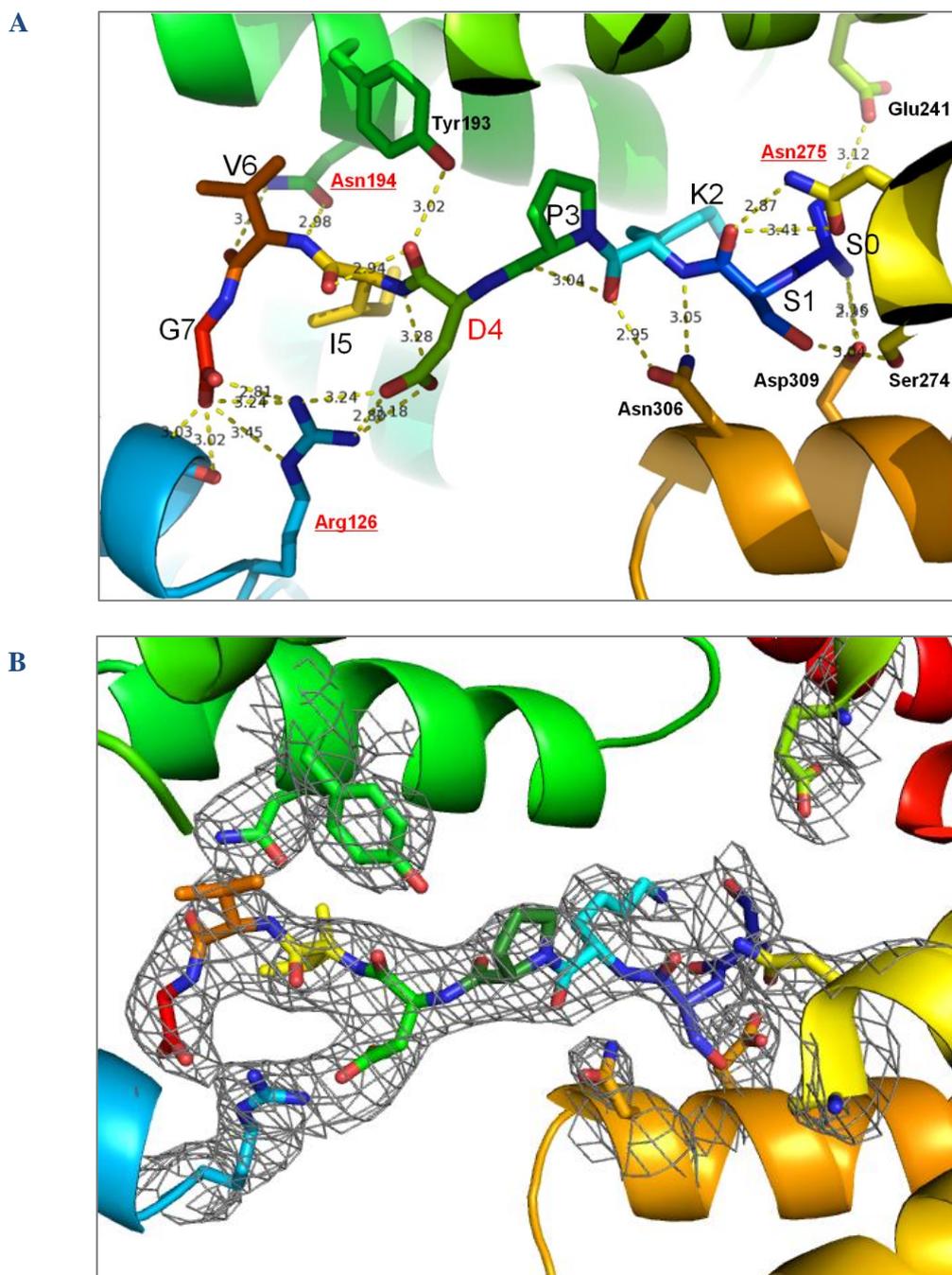


FIGURE 60: Interaction entre NprRAHTH et NprX8n

A. NprRAHTH est représenté en cartoon et coloré en rainbow du Nter en bleu au Cter en rouge. Le peptide NprX8n (numéroté S₀S₁K₂P₃D₄I₅V₆G₇) est représenté en sticks et coloré en rainbow. Les résidus de NprRAHTH impliqués dans l'interaction avec le peptide sont représentés en sticks. Les résidus strictement conservés sont précisés en rouge. **B.** Sur la même vue est représenté la densité électronique du peptide ainsi que celle des résidus de NprRAHTH impliqués dans l'interaction (carte 2Fo-Fc à un contourage de 1.2).

RESULTATS

Le peptide NprX se fixe au cœur des motifs TPR de NprR Δ HTH dans une orientation antiparallèle à l'effecteur (**FIGURE 60**). Globalement, l'interaction repose sur des liaisons hydrogènes et des forces de type Van der Waals entre chaînes latérales de l'effecteur et atomes du squelette peptidique de NprX. Seul le résidu strictement conservé à travers les différents groupes de NprX, le résidu D4, fait une interaction spécifique avec la protéine. En effet, il interagit avec la chaîne latérale de l'Arginine 126 qui est également en interaction avec le groupement carboxylate C-terminal du peptide (**FIGURE 60**). Ainsi, une autre explication pour rendre compte de la moindre affinité du peptide NprX8c, serait la perte d'interaction de l'Arg126 avec le Cter du peptide. Ce résidu Arg126 est également strictement conservé dans les séquences NprR des sept groupes, tout comme deux asparagines interagissant avec la chaîne principale du peptide : Asn194 et Asn275 (**FIGURE 61** ci-dessous).

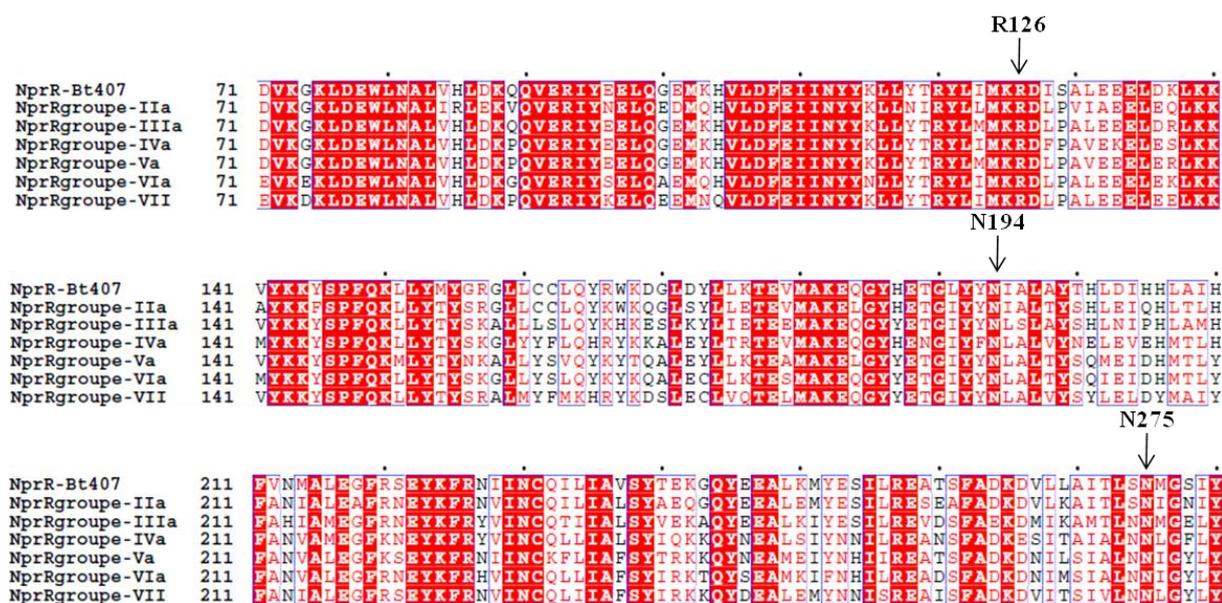


FIGURE 61: Alignement de séquences NprR des groupes I à VII

Les séquences ont été alignées par ClustalW et mises en forme par ESPript. Tous les résidus conservés sont représentés sur fond rouge parmi lesquels les résidus R126, N194 et N275, impliqués dans l'interaction avec le peptide NprX-I sont indiqués par des flèches noires. La numérotation utilisée correspond à la séquence de NprR-Bt407 (NprRgroupe-Ia). Un alignement complet est présenté en

ANNEXE E

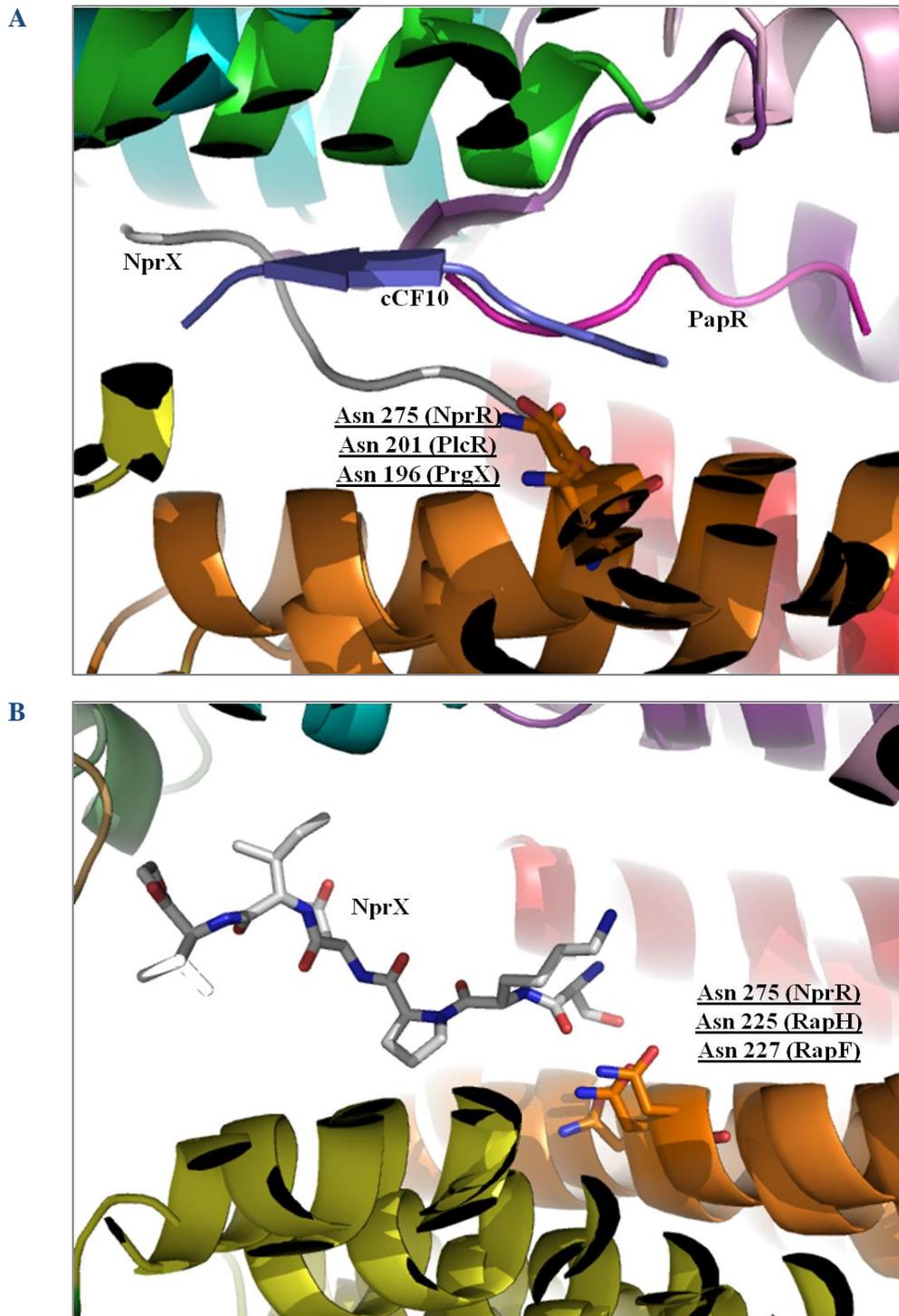


FIGURE 62: Superposition structurale des RNPP

A. Superposition 3D des complexes NprR/NprX, PlcR/PapR et PrgX/cCF10.

B. Superposition 3D du complexe NprR/NprX avec les monomères RapH et RapF.

Les effecteurs sont représenté en cartoon est colorés en rainbow. Dans la figure A, les peptides sont représenté en cartoon, NprX en gris, PapR en fuchsia et cCF10 en violet. Dans la figure B, NprX est représenté en sticks et coloré par atomes. Le résidu Asn conservé est représenté en sticks.

L'alignement de séquences des membres de la famille RNPP défini par les protéines Rap, NprR, PlcR et PrgX a révélé la présence d'un seul résidu conservé, une asparagine. Dans le cas de NprR, il s'agit de l'Asparagine 275, impliquée dans l'interaction avec le peptide NprX comme on l'a vu précédemment. Une partie de l'alignement de séquence est présentée dans la **FIGURE 63** ci-dessous :

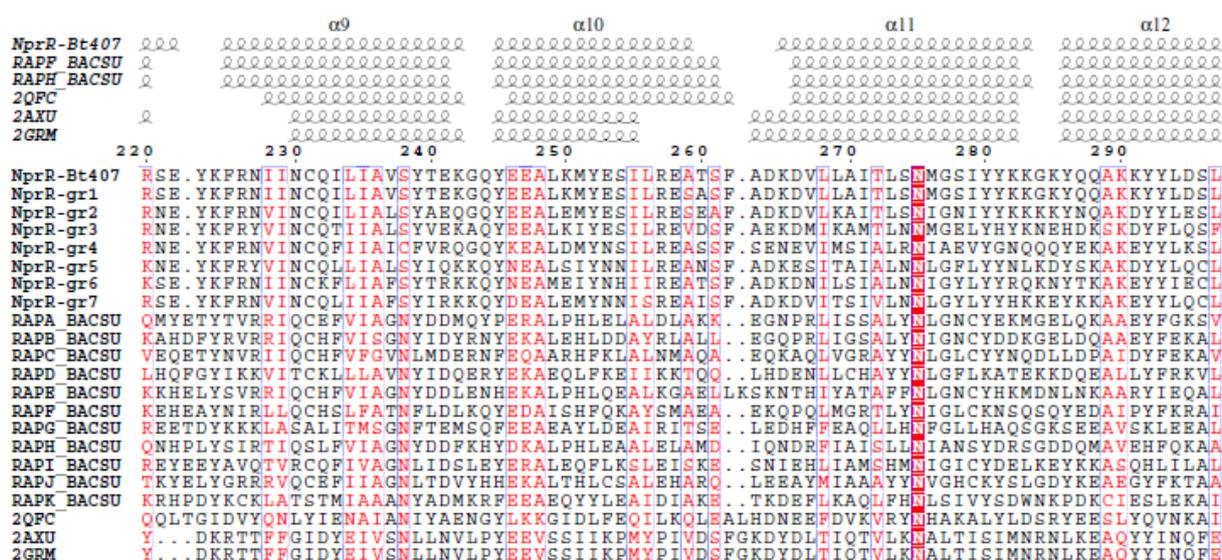


FIGURE 63: Alignement des séquences de la famille RNPP

La séquence de NprR-Bt 407 a été alignée par ClustalW avec celles des NprR des autres phérogroupe ainsi qu'avec celles des différentes protéines Rap de *B. subtilis*, de PlcR (PDB ID 2QFC) et de PrgX (PDB ID 2AXU et 2GRM). Les éléments de structures secondaires ont été ajoutés par le programme ESPript. La numérotation utilisée correspond à la séquence de NprR-Bt407. Seul un zoom autour du résidu strictement conservé est montré ici, l'alignement complet est présenté en **ANNEXE F**.

Ce résidu Asparagine est également conservé à un niveau structurel. La superposition des structures complexées NprRΔH₁TH/NprX, PlcR/PapR et PrgX/cCF10 montre que cette Asparagine se positionne au même endroit, dans la poche de fixation, pour stabiliser le squelette du peptide signal (**FIGURE 62-A**). Bien que n'étant pas en complexe avec leurs peptides Phr, les Rap H et F, possèdent également l'Asparagine en question dans la même orientation (**FIGURE 62-B**).

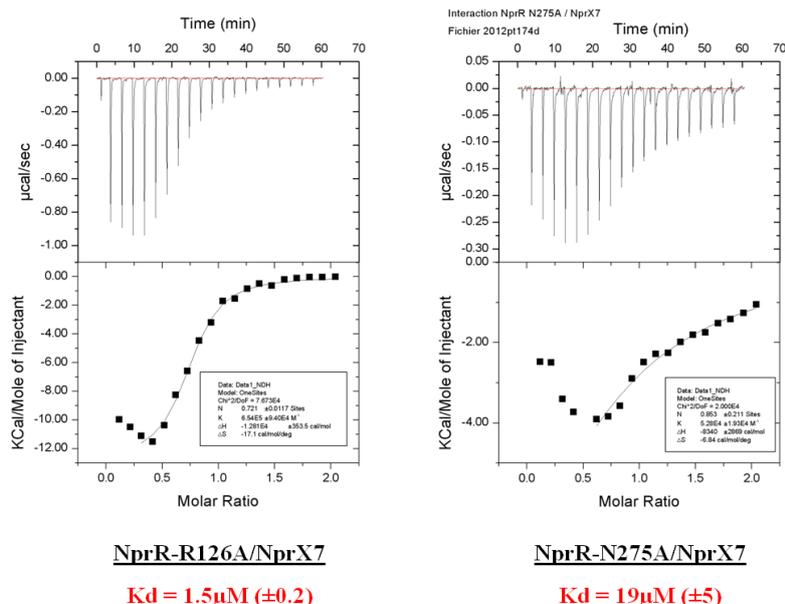


FIGURE 64: Mesure ITC des complexes NprR-R126A/NprX7 et NprR-N275A/NprX7

La quantité de chaleur dégagée (µcal/sec) dans la cellule de mesure en fonction du temps (min) a été mesurée pour 36 injections successives de 1 µl de peptide à 500µM dans la protéine à 50 µM. La variation de la quantité de chaleur dégagée à chaque injection de peptide (kcal/mole de peptide) en fonction du ratio molaire peptide/protéine permet de calculer les valeurs thermodynamiques tel que le Kd, indiqué en dessous de chaque expérience.

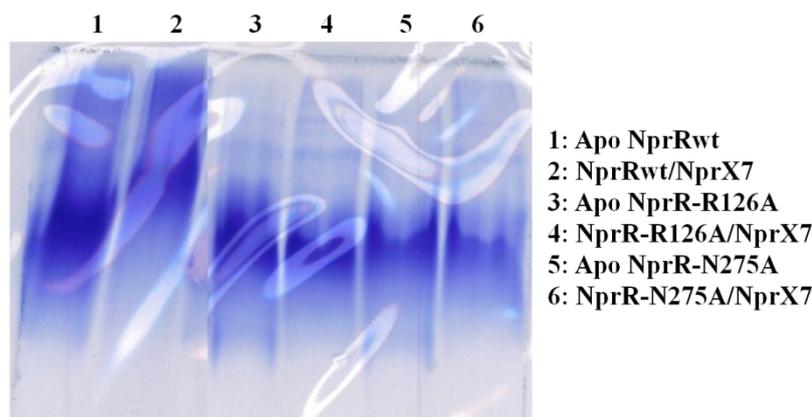


FIGURE 65: Analyses électrophorétiques des mutants NprR-R126A et NprR-N275A

15µg de protéine (10µl à 20µM) ont été déposés sur un gel d'acrylamide à 8% en conditions non dénaturantes. Pour les complexes, le peptide NprX7 est ajouté en large excès à une concentration de 1mM avant dépôt. La migration a été faite à température ambiante pendant 2h30 à 100V.

Nous avons cherché à comprendre le rôle des deux résidus Arg126 et Asn275 dans la régulation par NprX. Ainsi, Stéphane Perchat (collaborateur de l'INRA) a construit les mutants NprR-R126A et NprR-N275A pour tester leur activité de facteur de transcription *in-vivo*. Ses résultats démontrent que les mutants ont perdu leur activité transcriptionnelle (Résultats présentés en **ANNEXE G**). Pour vérifier si cette perte d'activité est due à une perte d'affinité pour le peptide, les mutations ont été introduites dans les vecteurs d'expression pQE60 et j'ai produit les protéines mutées à grande échelle en vue de mesures d'interaction. Les mesures par ITC montrent que le mutant NprR-R126A fixe NprX7 avec un K_d de $1.5 \mu\text{M}$ (± 0.2), ce qui correspond à une affinité environ 10 fois plus faible que la protéine sauvage. Alors que le mutant NprR-N275A a quant à lui quasiment perdu toute affinité pour le peptide avec un K_d de $19 \mu\text{M}$ ($\pm 5 \mu\text{M}$) (**FIGURE 64**). Ces résultats suggèrent que le résidu R126 ne semble pas essentiel pour la fixation du peptide contrairement au résidu N275. Pour vérifier que la perte de l'activité transcriptionnelle des mutants est bien due à la perte du switch dimère \rightarrow tétramère malgré la présence du peptide, j'ai comparé l'effet de l'ajout de peptide sur les profils électrophorétiques en conditions non dénaturantes entre ces mutants et la protéine sauvage (**FIGURE 65**). En absence de peptide, les formes Apo des deux mutants présentent une migration semblable à la protéine sauvage NprR, correspondant à un dimère comme les mesures de SEC-MALS et de DLS l'avaient montré (p 122 et 128). La présence du peptide ne modifie pas le profil de migration des mutants, les complexes mutants/NprX7 ne tétramérisent donc pas et demeurent dans un état dimérique. Cette absence d'activation dans le cas du mutant NprR-N275A peut s'expliquer par sa très faible affinité pour le peptide alors que le résidu R126 semble être essentiel au mécanisme d'activation.

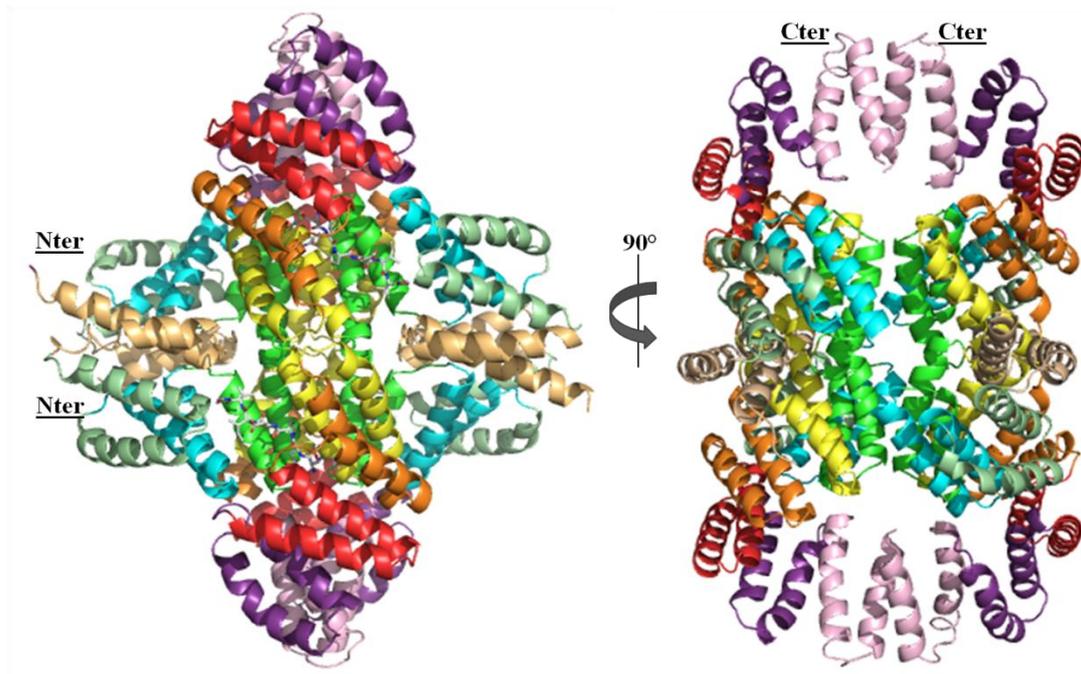


FIGURE 66: Conformation tétramérique du complexe NprRAHTH/NprX

Deux vues à 90° du tétramère NprRAHTH/NprX. Les protomères de NprRAHTH sont représentés en cartoon et colorés selon le code couleur de la [FIGURE 58](#) p141. Les peptides fixés sur chaque chaîne sont représentés en sticks et colorés par type d'atomes.

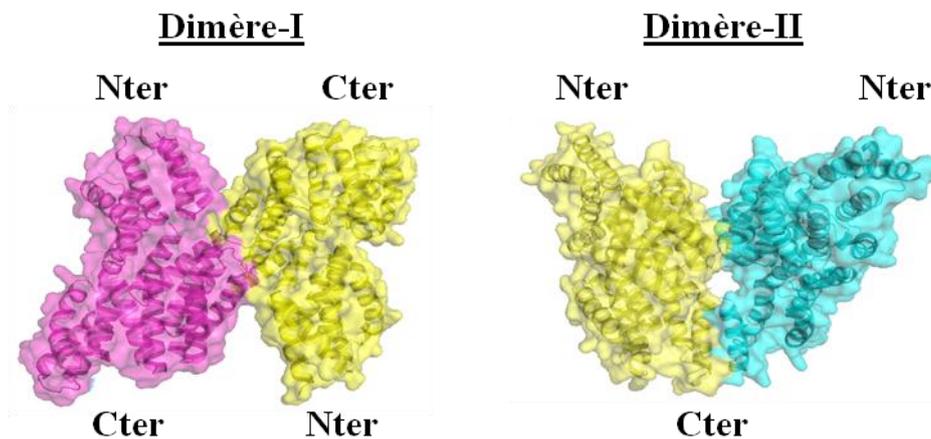


FIGURE 67: Conformations dimériques observées dans le tétramère NprRAHTH/NprX

Les protomères de NprRAHTH sont représentés en cartoon sur fond de surface transparente et coloré par chaîne. Le code couleur est conservé à travers les différents dimères. Ainsi, le monomère jaune impliqué dans le dimère-I est également impliqué dans le dimère-II

d) Le complexe *NprR* Δ HTH/*NprX* forme un tétramère

Les 12 protomères de *NprR* Δ HTH contenus dans l'unité asymétrique forment 3 tétramères équivalents qui présentent un RMSD moyen de 0.95Å sur 1418 Ca alignés (**FIGURE 66**). Le tétramère présente une surface enfouie moyenne de 7700Å² ($\Delta G^i = -45$ kcal/mol) qui se répartie entre 2 surfaces de contact moyennes de 1920 Å² et 1790 Å² avec des énergies libres internes ($\Delta^i G$) de -8.3 kcal/mol et -11.8 kcal/mol qui forment respectivement les dimères de type-I et II (**FIGURE 67**). Aucun de ces deux types de dimères ne ressemble au dimère caractéristique des protéines à domaine HTH permettant la fixation de la protéine sur 2 demi-sites adjacents de l'ADN (INTRODUCTION p42). Cependant, au sein du tétramère, l'extrémité Nter d'une chaîne du dimère I se trouve à environ 35Å de l'extrémité Nter d'une chaîne du dimère II et *vice versa*. Cela m'a permis de proposer un modèle de la protéine entière fixée à l'ADN, **FIGURE 68** ci-dessous, en juxtaposant à ces 2 extrémités N-terminales la structure du complexe Cro-ADN (code PDB : 3CRO), paradigme des protéines à domaine HTH. Ce modèle met en évidence la possibilité pour le tétramère du complexe *NprR*/*NprX* de fixer simultanément l'ADN sur deux sites distincts.

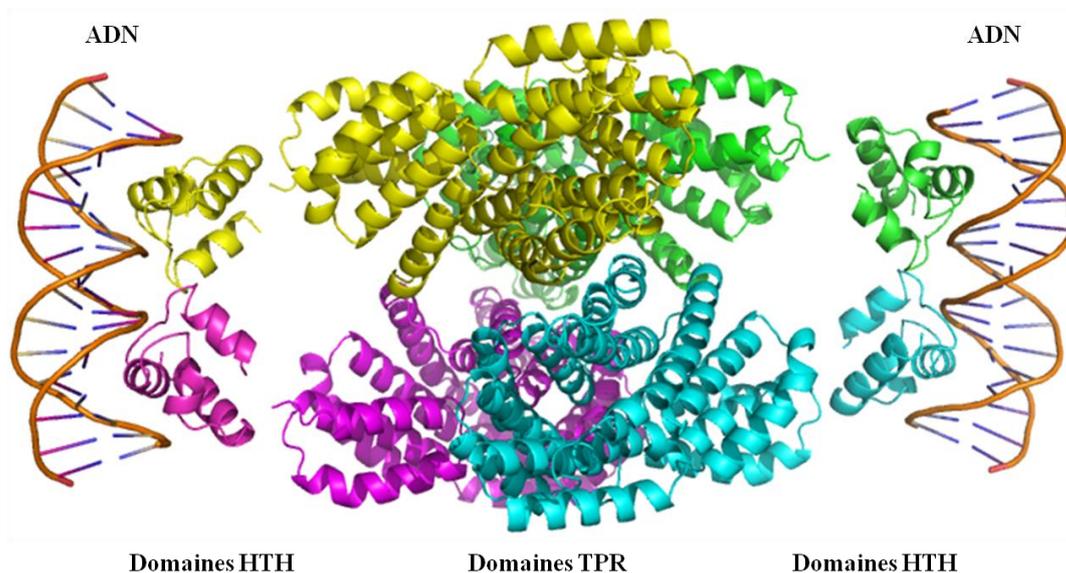


FIGURE 68: Model proposé pour la fonction facteur de transcription

Le tétramère de *NprR* Δ HTH est représenté en cartoon et coloré par chaîne. Les domaines à motif HTH manquants ont été modélisés par le complexe Cro/ADN (code PDB : 3CRO) et sont représentés en cartoon en conservant le code couleur des chaînes *NprR* Δ HTH.

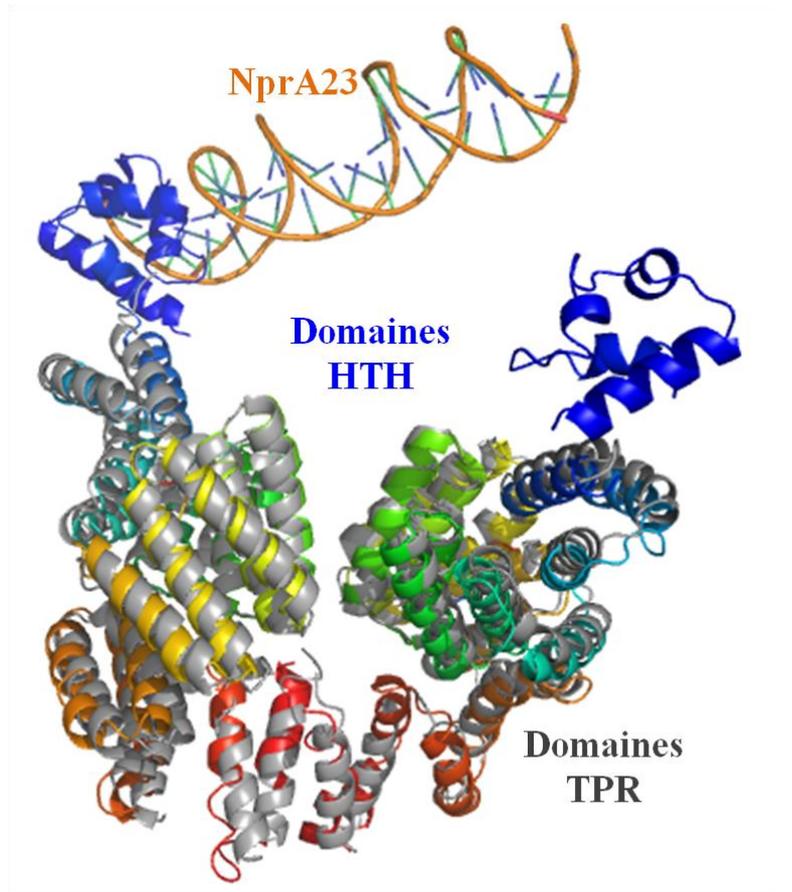


FIGURE 69: Contenu de l'unité asymétrique du jeu de données NprR/NprX/ADN

Les protomères de NprR sont représentés en cartoon et colorés en rainbow. Les domaines TPR de NprR Δ HTH ayant servi au remplacement moléculaire sont colorés en gris. La molécule d'ADN NprA-23pb en complexe avec NprR/NprX δ n est colorée en orange.

2. Le complexe NprR/NprX/ADN

a) *Cristallisation et données de diffraction*

Afin de vérifier le modèle proposé ci-dessus, j'ai initié des essais de co-cristallisation du complexe NprR/NprX avec les différentes séquences d'oligonucléotides testées par ITC dans les expériences d'interaction. J'ai récemment obtenu des cristaux avec le peptide NprX8n et un oligonucléotide pseudo-palindromique de 23pb contenant la boîte -35. La condition de cristallisation utilisée contient 20% PEG 3350, 0.1M HEPES pH 7.8 et 0.2M Acétate de Sodium. Les cristaux diffractent à 3.9Å de résolution dans le groupe d'espace P3₁21 avec 2 molécules par unité asymétrique. Un jeu de données complet a pu être enregistré et malgré la mauvaise résolution, j'ai réussi à phaser par remplacement moléculaire en utilisant la structure précédemment résolue du complexe NprRΔHTH/NprX8n, comme modèle du domaine TPR et le domaine à motif HTH de PlcR (Code PDB : 2QFC). Deux domaines TPR mais un seul domaine HTH ont été placés par le programme PHASER. J'ai positionné manuellement, le second domaine HTH dans la carte de densité électronique ainsi qu'un fragment d'ADN de 23 pb grâce au programme de visualisation COOT, (**FIGURE 69**). L'affinement de la structure est encore en cours. Les dernières statistiques R_{fac}/R_{free} étant de 24% et 28% respectivement.

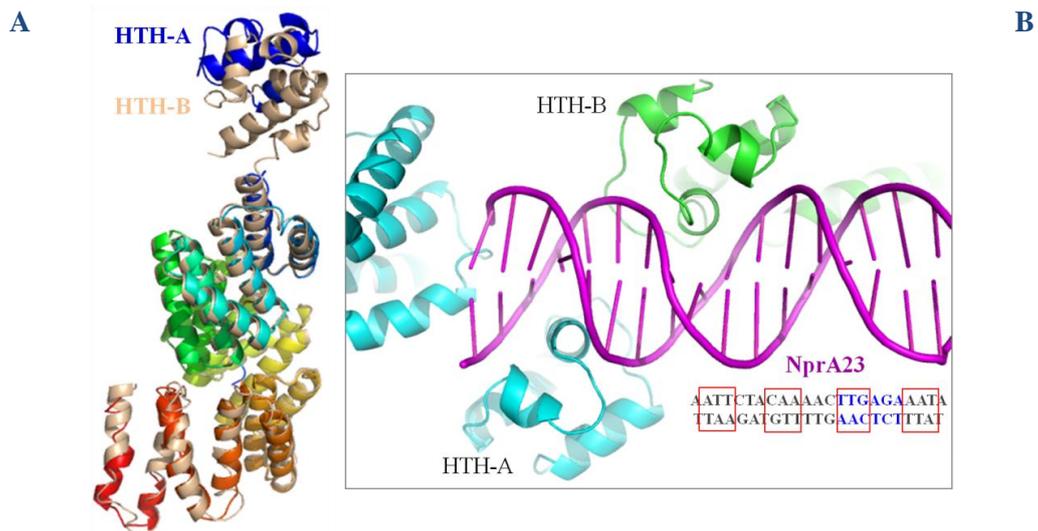


FIGURE 70: Conformation des domaines à motif HTH

A. *Superposition des chaînes A et B de NprR* : Les protomères sont représentés en cartoon, la chaîne A est colorée en rainbow et la chaîne B est colorée en beige.

B. *Zoom sur la fixation de domaines HTH à l'ADN* : Les protomères NprR sont représentés en cartoon. La chaîne A est coloré en cyan et la chaîne B en vert. La molécule d'ADN, NprA-23, est colorée en violet. La séquence de 23pb est indiquée avec la boîte -35 en bleu et les palindromes encadrés en rouge.

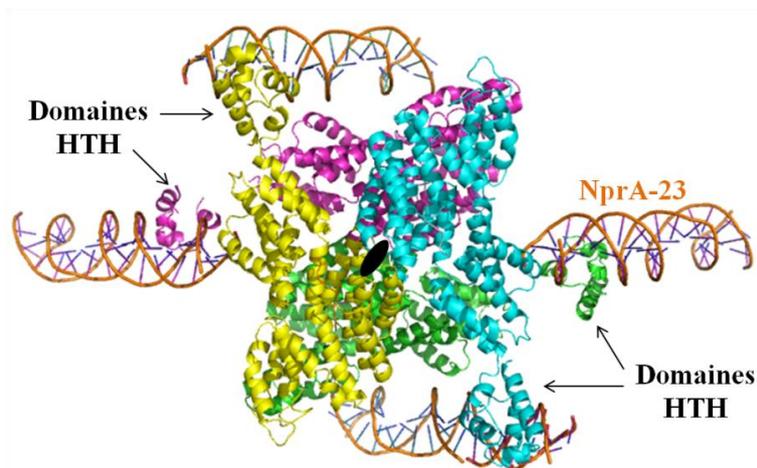


FIGURE 71: Conformation tétramérique du complexe NprR/NprX8n/ADN

Les protomères de NprR sont représentés en cartoon et colorés par chaîne (jaune, vert, bleu et rose). Les domaines HTH qui sont en interaction avec les molécules d'ADN colorées en orange (NprA-23) sont indiqués par des flèches. L'u.a. est représentée par les protomères jaune et rose, l'axe d'ordre 2 permettant de générer le tétramère est représenté par un symbole noir au centre du complexe.

b) Interaction avec l'ADN

Les domaines TPR de l'unité asymétrique forment le dimère-II du complexe binaire NprRΔHTH/NprX avec un rmsd d'environ 1.5Å sur 665 Cα alignés. Le domaine HTH de la chaîne entière A interagit *via* l'hélice α3 avec le grand sillon de l'ADN, à l'une des extrémités de l'oligonucléotide. Une superposition des deux chaînes montre que le domaine HTH de la seconde chaîne B est dans une orientation différente (**FIGURE 70-A**). Ce dernier interagit *via* l'hélice α3 avec un grand sillon du fragment d'ADN d'une unité asymétrique voisine mais sur l'autre face de la double hélice par rapport au premier domaine HTH (**FIGURE 70-B**). Cependant, la résolution est trop mauvaise pour pouvoir comparer les 2 modes d'interaction, d'autant plus que l'affinement de la structure est encore en cours.

Les symétriques cristallographiques (selon l'axe d'ordre 2) forment un tétramère identique à celui du complexe NprRΔHTH/NprX. Le tétramère interagit avec 4 demi-sites d'ADN situés sur 4 fragments d'ADN distincts comme le montre la **FIGURE 71** ci-contre. Cette interaction, très différente des complexes habituellement observés entre ADN et protéines à domaines HTH, est très probablement non spécifique. En absence de NprR-box bien identifiée, il est possible que la séquence d'ADN ayant co-cristallisé ne contienne qu'un seul demi-site de fixation spécifique. Les essais d'identification de la séquence complète d'interaction (NprR-box) se poursuivent afin de pouvoir régler cette question.



P222

Résolution 7Å

Paramètres de maille $a = 116\text{Å}$, $b = 142\text{Å}$, $c = 316\text{Å}$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

FIGURE 72: Cristallisation d'Apo NprR



Système cristallin hexagonal

Résolution 4.2Å

Paramètres de maille $a = b = 130.7\text{Å}$, $c = 108.8\text{Å}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ et $\gamma = 120^\circ$

FIGURE 73: Cristallisation d'Apo NprRAHTH

F. Conformation inhibiteur de la sporulation

1. Cristallisation et données de diffraction

a) *Apo NprR*

Des cristaux de NprR ont été obtenus dans 3 conditions différentes que j'ai pu reproduire en manuel et tester en diffraction. La protéine cristallise dans le même groupe d'espace avec des paramètres de maille identiques ([FIGURE 72](#)). Les cristaux obtenus diffractent de manière anisotrope et à très basse résolution. Malgré de nombreux essais d'optimisation (Matériels et Méthodes p 98), la meilleure résolution observée est de 7Å, ce qui ne m'a pas permis de résoudre la structure d'Apo NprR.

b) *Apo NprRΔHTH*

La protéine tronquée NprRΔHTH seule a cristallisé dans un système hexagonal (3 conditions de cristallisation reproduites et testées) et les cristaux ont diffracté au mieux à 4.2Å de résolution ([FIGURE 73](#)). Le groupe d'espace P622 est retrouvé systématiquement par les programmes d'indexation XDS et MOSFLM. Cependant, une analyse plus poussée, grâce au programme XTRIAGE, a révélé l'existence d'un twin parfait qui met en doute la validité du groupe d'espace attribué. En effet, dans le cas d'un twin parfait, la symétrie cristalline a tendance à être surestimée. Ainsi, j'ai retraité le jeu de données dans les groupes d'espaces de plus basses symétries : P6 et P3 pour tenter de résoudre la structure par remplacement moléculaire à partir de la structure du complexe NprRΔHTH/NprX7, malheureusement sans succès. Malgré plusieurs essais d'optimisation, je n'ai pu obtenir de cristaux de meilleure qualité.

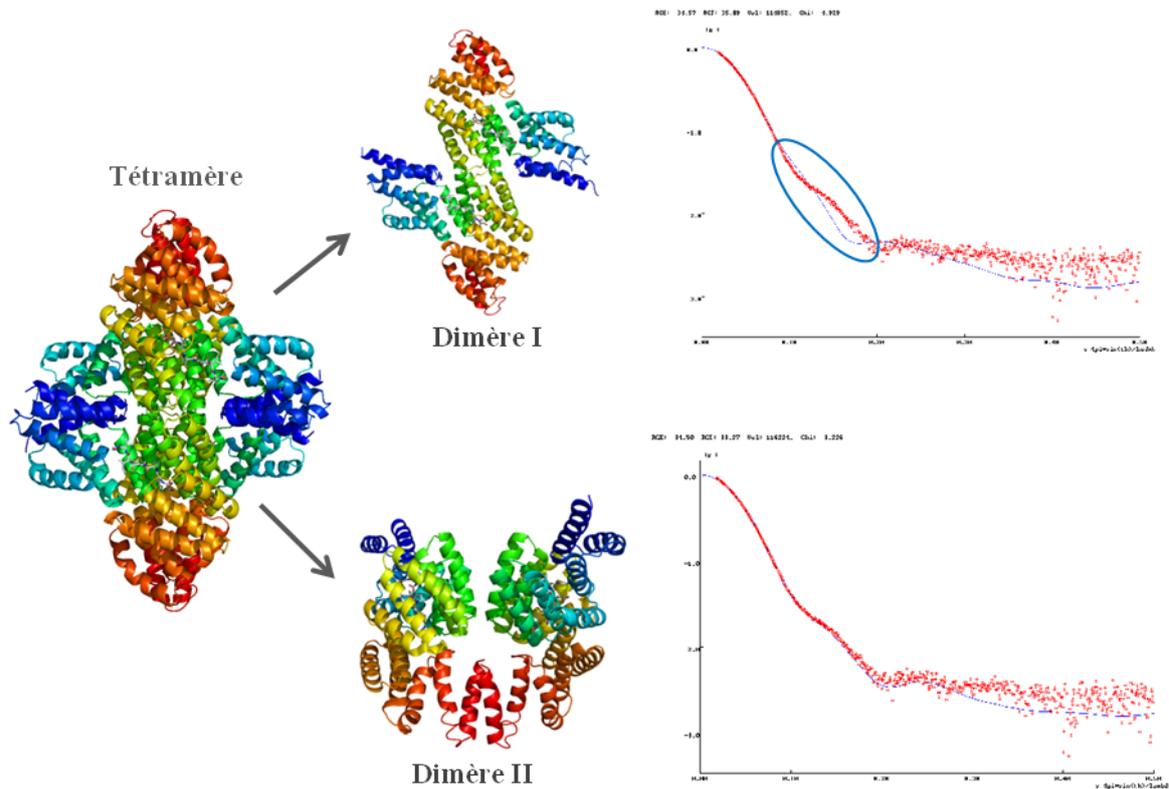


FIGURE 74: Analyse de la forme Apo de NprRΔHTH par SAXS

La structure tétramérique du complexe NprRΔHTH/NprX, ainsi que les dimères cristallographiques I et II sont représentés en cartoon et colorés en rainbow (du Nter en bleu au Cter en rouge). A côté de chaque dimère se trouve la courbe expérimentale de SAXS mesurée avec la forme Apo NprRΔHTH (nuage de point rouge) sur laquelle est superposée la courbe SAXS calculée à partir du dimère de type I ou II (courbe bleu). Les courbes SAXS représentent le logarithme de l'intensité de diffraction en fonction du moment de transfert Q (\AA^{-1}).

2. Expérience de SAXS Ayant des difficultés à résoudre la structure cristalline

de la forme Apo de l'effecteur, nous nous sommes tournées vers le SAXS pour tenter d'identifier la conformation dimérique de NprRΔHTH seul en solution. Des courbes théoriques calculées à partir des structures des deux dimères observés dans les cristaux de complexe NprRΔHTH/NprX (Dimère-I et Dimère-II), ont été comparées à la courbe expérimentale enregistrée pour Apo NprRΔHTH. Un meilleur fit est observé avec la courbe calculée à partir du dimère-II ([FIGURE 74](#)). Ces résultats suggèrent que la conformation dimérique de la forme Apo de l'effecteur pourrait s'apparenter au dimère de type II. En fait, nous avons vu que la fixation du peptide est nécessaire pour faire basculer la protéine d'une forme dimérique vers une forme tétramérique. La fixation du peptide sur le dimère de la forme Apo induit donc probablement un changement de conformation vers un dimère de type II qui s'associerait alors avec un second dimère II pour former le tétramère observé dans les cristaux.

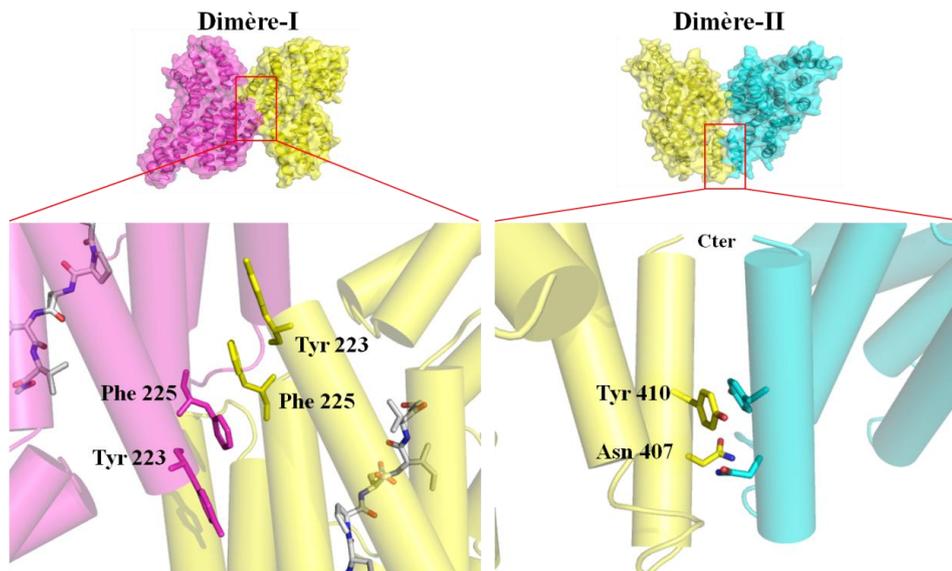


FIGURE 75: Résidus mutés aux interfaces de dimérisation

Les dimères I et II sont représentés en cartoon sur fond de surface transparente et coloré par protomère. Un zoom sur les interfaces d'interaction au sein des dimères met en évidence les résidus mutés en sticks.

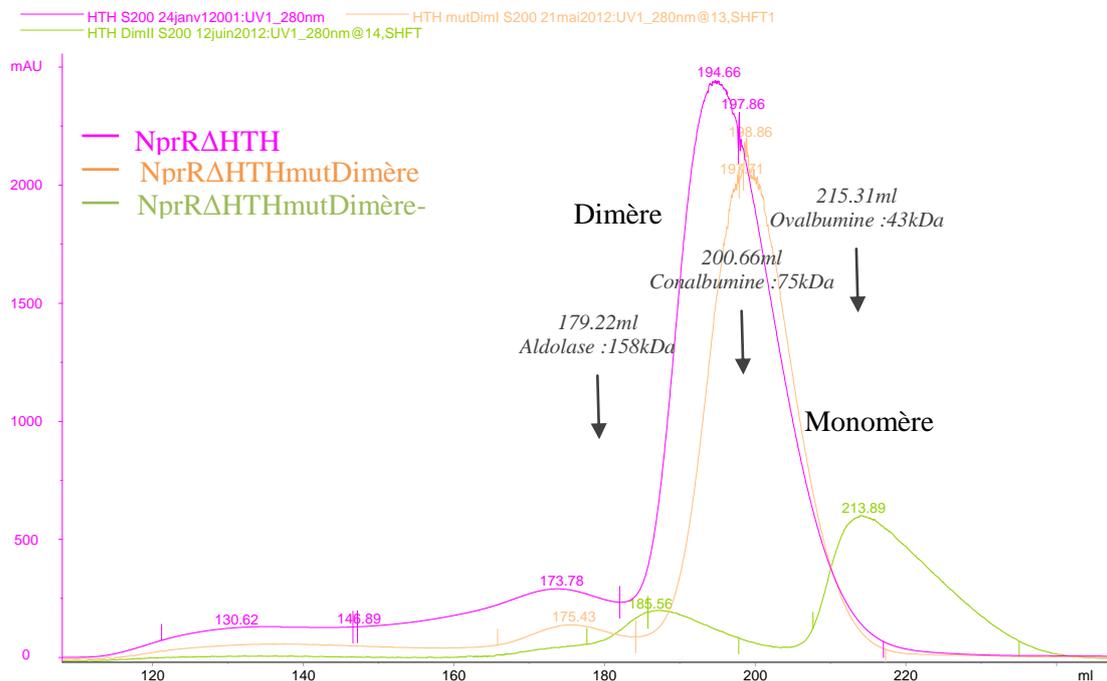
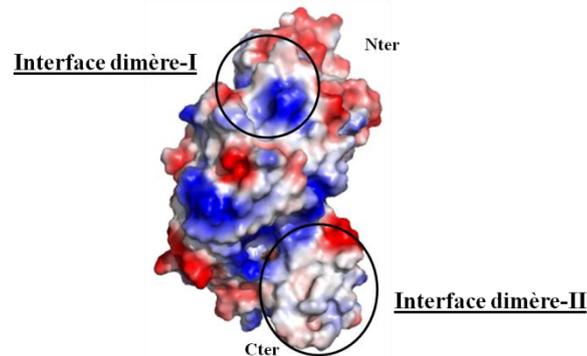


FIGURE 76: Profil d'élution des mutants d'interfaces des dimères I et II

Les protéines purifiées en sortie d'IMAC ont été injectées sur une colonne préparatrice SEC (S200-26/60). Les chromatogrammes représentent l'absorbance à 280nm en fonction du volume d'élution. La calibration est indiquée au dessus des profils d'élution.

3. Analyse par mutagénèse dirigée

Alors que le dimère de type I est majoritairement stabilisé par des liaisons hydrogènes, l'interface du dimère II est globalement apolaire :



Ceci suggère que la dissociation du dimère II entraînerait l'exposition au solvant de surfaces hydrophobes, ce qui rendrait la protéine insoluble. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle le mode de dimérisation du dimère de type II observé dans la structure tétramérique du complexe, pourrait être conservé dans la conformation Apo de la protéine. Le dimère de type I n'existerait dans ce cas que dans le tétramère, résultant de l'association de 2 dimères de type II. Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai conçu des mutants visant à déstabiliser les deux types d'interface. Dans chaque cas, j'ai muté en Alanine deux résidus qui me paraissent essentiels à l'interaction: Y223A/F225A pour l'interface du dimère-I et N407A/Y410A pour l'interface du dimère-II ([FIGURE 75](#)). Les mutants ont été construits par Véronique Henriot, responsable de la plateforme de clonage Imagif au LEBS sur la forme tronquée NprRΔHTH et par Stéphane Perchat (collaborateurs INRA) sur la forme entière NprR. Je les ai exprimés et purifiés pour une étude en solution.

Lors de l'étape de chromatographie par exclusion de taille, j'ai pu observer dans le cas du mutant NprRΔHTH-Y223A/F225A une élution sous forme majoritairement dimérique, semblable au profil d'élution de la protéine sauvage. Par contre, le pic d'élution du mutant NprRΔHTH-N407A/Y410A est retardé et correspond selon la calibration de la colonne à une forme monomérique ([FIGURE 76](#)). Cette première observation conforte bien l'hypothèse selon laquelle l'interface du dimère II est conservée dans le dimère Apo alors que le dimère I n'existe pas en absence de peptide.

NprR mutant	Kd (NprX7) en μM	n	ΔH (kcal/mol)
NprR-Y223A/F225A	0.102 ± 0.08	0.6	-15 ± 0.52
NprR-N407A/Y410A	0.066 ± 0.04	0.7	-12 ± 0.28

TABLEAU 6: Résultats des mesures d'ITC entre les mutants d'interface de dimérisation et NprX7

Les concentrations utilisées pour les mesures sont de 50 μM pour la protéine placée dans la cellule de mesure et 500 μM pour le peptide placé dans la seringue d'injection. Les peptides ont été ajoutée dans la cellule de mesure par une première injection de 0.4 μl suivie de 36 injections successives de 1 μl , espacées de 180 sec.

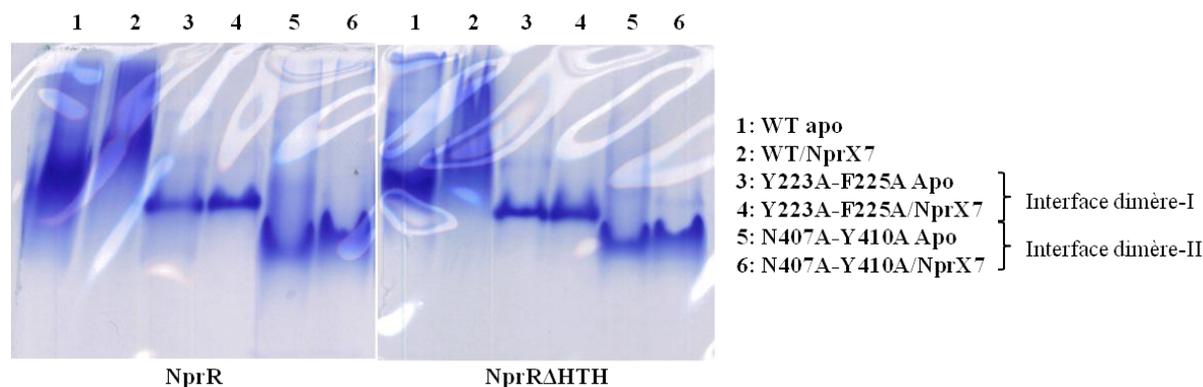


FIGURE 77: Profils électrophorétiques en condition non dénaturantes des mutants d'interfaces

15 μg de protéine (10 μl à 20 μM) ont été déposés sur une gel d'acrylamide à 8% en conditions non dénaturantes. Pour les complexes, le peptide NprX7 est ajouté en large excès à une concentration de 1mM avant dépôt. La migration s'est faite à température ambiante pendant 2h30 à 100V.

Stéphane Perchat (Collaborateur INRA) a montré que ces deux mutants ne présentent pas d'activité transcriptionnelle *in vivo* (Résultats présentés en **ANNEXE H**) ce qui suggère qu'ils ne peuvent pas former le tétramère induit par la fixation du peptide. Des mesures d'ITC ont donc été effectuées pour vérifier si les mutants avaient conservé leur capacité à fixer le peptide NprX7. Ces résultats démontrent que les deux mutants fixent le peptide avec une affinité de l'ordre du nano molaire (**TABLEAU 6**), comparable à la forme sauvage. J'ai alors analysé par gel natif l'effet du peptide sur l'état oligomérique de ces mutants. La migration du mutant Y223A/F225A (interface dimère-I), seul ou en présence de NprX7, est semblable à celle de la protéine sauvage seule, c'est-à-dire dimérique. Ce mutant demeure donc dans la conformation dimérique Apo malgré la fixation du peptide ce qui prouve que cette interface est essentielle à la tétramérisation du facteur de transcription en présence de son peptide signal. Le mutant N407A/Y410A (Interface dimère-II), purifié sous forme monomérique, migre plus loin que le dimère de la forme Apo sauvage et sa migration n'est pas affectée par la fixation du peptide (**FIGURE 77**). Ce mutant n'est donc pas capable de former le tétramère en présence de peptide ni le dimère Apo. Cette interface est essentielle à la dimérisation de la forme Apo et par conséquent à la formation du tétramère en complexe avec le peptide. Ensembles, ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle, l'interface du dimère-I correspond à l'interface de tétramérisation du complexe effecteur/peptide, alors que l'interface du dimère-II est conservée dans la conformation de la forme Apo de NprR qui porte la fonction inhibiteur de la sporulation. Et dans un souci de rigueur, il faudrait encore tester l'effet de ces mutants sur la sporulation des bactéries.

ARTICLE

Structural Basis of the Activation Mechanism of the *Bacillus* Quorum-Sensing Regulator NprR by its
Cognate Signalling Peptide NprX

Samira Zouhir¹, Stéphane Perchat², Magali Aumont-Nicaise³, Javier Perez⁴, Beatriz Guimaraes⁴,
Didier Lereclus² & Sylvie Nessler¹

¹, CNRS UPR 3082, LEBS, FRC 3115, 1 av. de la terrasse, 91 198 Gif sur Yvette, France ; ², INRA,
UMR 1319 MICALIS - Génétique Microbienne et Environnement, La Minière, 78280 Guyancourt,
France ; ³, Université Paris-sud 11, CNRS UMR 8619, IBBMC, Orsay, France; ⁴, SOLEIL, Saint
Aubin, France

Short title: Quorum Sensor NprR Structure-Function Analysis

ABSTRACT

The activity of the quorum-sensing regulator NprR depends on the signalling peptide NprX. The NprR/NprX complex controls the expression of genes essential for survival and sporulation of *Bacillus thuringiensis* during its necrotrophic development in insects. NprR belongs to the RNPP family of sensor regulators characterized by a TPR domain mediating protein-peptide interactions. Except the Rap proteins, the RNPP regulators display a transcriptional activity and contain an N-terminal HTH-type DNA-binding domain. In addition, NprR contains an insert displaying significant sequence similarity with the protein target-binding domain of the Rap proteins. In order to elucidate the activation mechanism of NprR, we analysed the conformation changes induced upon binding of NprX. We solved the crystal structure of the NprR/NprX binary complex and characterized the apoform of NprR (apo NprR) using small angle scattering experiments, mutagenesis and biochemical analysis. We demonstrated that apo NprR is a dimer that switches to a tetramer in the presence of NprX. Functional analysis and interaction measurements using protein mutants and peptides from distinct pherogroups led to the identification of the protein and peptide residues directly involved in the NprR activation process. These results reveal a molecular mechanism explaining how peptide binding induces a conformational change of the Rap-like domain allowing the apo dimer to switch to an active tetramer specifically recognizing target DNA sequences. NprR has been shown to be involved in adaptative response and sporulation of the pathogenic *Bacillus cereus* group. This study thus provide the structural basis for the rational design of quorum quenching molecules with applications in medical, food and biotechnology areas.

INTRODUCTION

Quorum-sensing (QS) is a mode of cell–cell communication based on the secretion and recognition of diffusible biomolecules by cognate bacteria. This sensing mechanism allows the bacteria to coordinate their behavior as a whole community according to population density. Bacteria use QS systems to control, in a multi-cellular manner, important bacterial processes, such as virulence, sporulation, genetic transfer, and production of antibiotics. QS relies on signalling molecules called autoinducers or pheromones, to directly or indirectly regulate gene expression. In general, Gram-positive bacteria use processed oligopeptides as autoinducers [1]. They are subdivided in two groups according to whether they interact with receptors at the cell surface or inside the cell [2]. The first group secretes peptides which interact with membrane embedded histidine-kinases of two component systems [3]. The second group includes secreted peptides which are re-imported in the bacterium where they directly interact with cytoplasmic response regulators [4]. In these direct QS systems, the gene of the signalling peptide is generally in the vicinity of the gene encoding its cognate QS regulator, thus forming a characteristic regulator/peptide-signalling cassette [5]. The signalling peptides mainly originate from short genes coding for small exported proteins that are approximately 20 to 60 amino acids in length. Their mature forms are composed of 5 to 11 residues [6,7,8]. All these peptides are actively re-imported into the cell by oligopeptide permeases [9,10,11].

The directly activated QS regulators have been grouped in a new protein family called RNPP according to the names of the first four identified members: Rap, NprR, PlcR and PrgX [12]. They are characterized by the presence of tetratricopeptide repeats (TPRs), a structural motif mediating protein-peptide interactions and containing several tandem-repeats of 34 residues [13,14]. Except the Rap proteins, the RNPP regulators display a transcriptional activity and carry an N-terminal helix-turn-helix (HTH)-type DNA-binding domain [15,16].

The first characterized member of the RNPP family was the PrgX/sex pheromone system from *E. faecalis* [17] in which pheromones control the expression of genes involved in the transfer of conjugative plasmids from donor cells to recipient cells [18]. Two signalling peptides, the pheromone

cCF10 and the anti-pheromone iCF10, antagonistically regulate this process [19]. Structural studies revealed that both peptides bind to the same pocket of PrgX but they differentially alter the conformation of the protein and its oligomerization state, resulting in opposite biological activities [20,21]. The binding of the anti-pheromone iCF10 to PrgX favours its tetramerization and its tight binding to DNA, leading to the repression of the expression of the target genes. On the opposite, the binding of the pheromone cCF10 favours PrgX dimerization and weakens its binding to DNA, leading to the derepression of target gene expression [22,23].

The PlcR/PapR system is involved in the triggering of virulence of bacteria belonging to the *B. cereus* group [24,25]. The signalling heptapeptide PapR specifically interacts with the regulator PlcR inside the cell, allowing PlcR binding to its DNA targets [8,26]. The crystal structure of the PlcR/PapR complex [12] revealed a peptide binding-mode similar to that described in PrgX. Like most HTH-type DNA binding proteins [16] PlcR is a dimer. However in the absence of the structure of the apo form of the protein, the activation mechanism of PlcR by PapR remains unclear.

The Rap proteins were first identified in *B. subtilis* [7,27] but they were also found in bacteria of the *B. cereus* group [28]. The Rap/Phr systems are involved in the control of sporulation, competence, production of degradative enzymes and production of antibiotics by targeting response regulators and other clue intermediates of these bacterial signalisation pathways [5,29,30]. Some of the Rap proteins have been shown to carry a P-Asp phosphatase activity. They are inactivated by their cognate signalling Phr pentapeptides [31]. Recently, the crystal structures of two Rap proteins from *Bacillus subtilis* in complex with a response regulator, RapH/Spo0F [32] and RapF/ComA [33], have been solved, allowing to gain some clues on their molecular mechanism. In addition, these structural data demonstrate that Rap proteins display a conserved fold characterized by 7 TPR motifs linked to an N-terminal 3-helix bundle by a flexible linker. However, there is no structure of a Rap protein in complex with its cognate Phr peptide so far and the regulation mechanism of the Rap proteins remains unknown.

The last identified member of the RNPP family of QS regulators is the transcription factor NprR from the *B. cereus* group [34]. Interestingly, NprR displays an insertion of a hundred of residues between the HTH and TPR domains, which shares sequence similarity with the N-terminal domain of the Rap proteins [12,34]. This suggested that NprR could represent an evolutionary intermediate between the Rap proteins and the other RNPP-type transcription factors. In the presence of the signalling peptide NprX, NprR activates the expression of genes encoding proteins involved in food supply, stress and antibiotics resistance, as well as in the synthesis of a lipopeptide [35]. It was demonstrated that the NprR regulon is required for the necrotrophic lifestyle of *B. thuringiensis*. The minimal active form of NprX has been identified as the heptapeptide SKPDIVG corresponding to an internal region of the carboxy-terminal part [34]. This heptapeptide forms a tight complex with NprR but the biological form predominantly present in the bacterial cell has not been characterized yet. ITC experiments demonstrated that the NprR/NprX7 complex binds to DNA sequences centered on the -35 box of the *nprA* promoter [34]. The study of the NprR/NprX polymorphism within the *B. cereus* group revealed seven NprR groups associated with seven cognate NprX heptapeptides classes. The NprR/NprX cell-cell communication system was found to be strain specific with a possible cross-talk between some phylogenetic groups [34].

In this paper, we present the crystal structure of *B. cereus* NprR in complex with its cognate signalling peptide NprX. Together with small angle scattering experiments and biochemical analysis of apo NprR and engineered mutant proteins, this structure-function study provides new insights into the NprX-dependent activation mechanism of NprR.

RESULTS

NprX binding shifts NprR from a dimer to a tetramer

During the purification procedure, the full length NprR and the HTH truncated form, NprR(Δ HTH), eluted from a calibrated size exclusion chromatography column as dimers (data not shown). Electrophoretic analysis of the purified proteins in non-denaturing conditions demonstrated that addition of heptapeptide NprX7 induced a shift of the protein toward high molecular weights (Figure

1). Dynamic light scattering (DLS) analysis indicated that the hydrodynamic diameter of the apo protein and of the protein-peptide complex corresponded to a dimer and a tetramer, respectively (Table 1). The same results were obtained with NprR(Δ HTH) as with the full length NprR, demonstrating that the absence of the HTH domain did not alter the conformational switch induced by peptide binding. Together with the functional experiments showing that NprR requires the presence of the NprX peptide to induce the transcription of the *nprA* gene [34], these results suggest that NprX binding induces a structural change of the NprR transcriptional activator from an inactive dimer to an active tetramer.

The minimal active form of NprX has been shown to be the heptapeptide SKPDIVG [34]. ITC experiments allowed us to demonstrate that the SKPDI pentapeptide is not recognized by the NprR protein (data not shown), explaining why it was found to be inactive. Addition of the serine residue at the N-terminal extremity of the heptapeptide to form the NprX8n SSKPDIVG octapeptide increased its affinity for the NprR protein (Kd decreasing from 100 ± 20 nM to 25.8 ± 8.2 nM). However, addition of a second residue to form NprX9n YSSKPDIVG had the opposite effect (Kd increasing to 220 ± 30 nM). C-terminal elongation of the peptide decreased its affinity for NprR to a Kd of about 1 μ M observed with NprX8c SKPDIVGQ (Figure S1). We used both NprX7 and NprX8n forms of the peptides in the co-crystallization assays.

The NprR/NprX tetramer is a dimer of dimers

To determine the structural basis of the activation mechanism of NprR, we tried crystallizing both apo NprR and the complex NprR/NprX. The apoform of the protein did not crystallize but we obtained crystals of the truncated form NprR(Δ HTH) in complex with the heptapeptide NprX7. The crystals diffracted in space group P1 with 12 molecules per asymmetric unit. The crystallographic phase problem was solved by the SAD method using a selenomethionine labelled form of NprR(Δ HTH) co-crystallized with NprX7. The crystals diffracted up to 3.5 \AA resolution, allowing the localization of 120 selenium atoms corresponding to the 11 methionines contained in each NprR(Δ HTH) chain, except the N-terminal residue. The anomalous signal was weaker for Met417 at the C-terminal extremity of the protein but it allowed us to assign the complete sequence of the protein into the 3.5 \AA SAD structure. A

native data set diffracting up to 3.1Å resolution was used for final refinement of the model. It was obtained with the octapeptide NprX8n instead of the heptapeptide NprX7 of the SAD data set and displayed additional electron density at the N-terminus of the peptide (Table S1). Description of the complex will be done on the basis of this NprR(Δ HTH)/NprX8n complex.

Pairwise superposition of the 12 NprR(Δ HTH) molecules of the asymmetric unit results in a rmsd distance below 1Å over about 330 aligned C α atoms. The monomers are composed of 18 α -helices forming 9 TPR motifs arranged in a two-layered, left-handed superhelix (Figure 2A). In most chains, there was no visible electron density for the surface loops connecting helices α 15 and α 16 from TPR 8 and α 17 and α 18 from TPR 9. The C-terminal His-tag was not visible and five to ten residues were also disordered at both extremities of each chain. The 12 molecules form three tetramers displaying a maximal rmsd distance of about 1Å over 1320 aligned C α atoms. Each NprR(Δ HTH) tetramer (Figure 2B) is characterized by an overall interface area of about 3,800Å² and an energy of dissociation Δ G of about 11 kcal/mol.

Analysis of the interactions between the subunits of the tetramer showed that it contained two types of dimers, with equivalent interface areas of about 950 Å² and a solvation energy Δ ⁱG of about -10 kcal/mol. The type I dimer (Figure 2C) is formed by two antiparallel chains. It is mainly stabilized by H-bonds and van der Waals contacts between symmetry related residues from loops α 8- α 9 and α 10- α 11. A strong stacking interaction is also observed between residues Y223 and F225 from the two adjacent loops α 8- α 9. In the type II dimer (Figure 2D), the two chains interact mainly through hydrophobic contacts between residues from the helices α 17 and α 18 of the last TPR motif, as well as between residues from helix α 8 and loop α 9- α 10. Strong stacking interactions are observed between residues N407 and Y410 from the two adjacent C-terminal helices.

Apo NprR shares similarity with the crystallographic type II dimer

Mutations affecting the subunit contacts observed in the NprR(Δ HTH)/NprX crystal structure were engineered in order to assess the conformation of the apo dimer. The Y223A/F225A and N407A/Y410A mutations were introduced in NprR and NprR(Δ HTH) in order to disrupt the dimer I

and dimer II interfaces, respectively. Both full-length and truncated forms of the Y223A/F225A mutant protein were eluted from the calibrated gel filtration column as a dimer, whereas the N407A/Y410A mutant proteins were eluted as a monomer. These results suggest that the apo dimer is stabilized by the same interactions as those observed in dimer II. Native gel electrophoresis (Figure 3A) demonstrated that addition of peptide did not modify the quaternary structures of any of the two mutant proteins. These results show that NprX binding cannot promote the formation of the active tetramer by association of apo dimers with modified type I interface residues (Y223A/F225A mutant) nor from NprR monomers with modified type II interface residues (N407A/Y410A). Though ITC experiments demonstrated that they bind NprX7 with almost the same affinity (K_d of about 50-100nM) than the wild type (Figure S2A), both mutants are unable to form the active tetramer. This result was confirmed by transcription assays performed with the two NprR mutant proteins on *nprA'lacZ* expression. Addition of NprX had no effect on the Y223A/F225A and N407A/Y410A mutants (Figure S2B). These results suggest that the role of NprX binding consists in promoting the association of two apo dimers stabilized by type II interactions, resulting in the formation of an active tetramer stabilized by type I interactions.

In the absence of crystals of NprR without peptide, SAXS experiments were performed in order to assess the apo conformation of the protein. Simulated curves calculated from type I and II NprR(Δ HTH)/NprX crystal dimers were compared with experimental data obtained with apo NprR(Δ HTH). The best fit was observed with dimer II (Figure 3B), supporting the conclusion of our mutational analysis. However, when adding the flexible N- and C-terminal extremities missing in the crystal structure to the model used in the calculation, the quality of the fit decreased (data not shown). This suggests that the NprR(Δ HTH)/NprX crystal dimer II only partially represents the apo conformation of NprR(Δ HTH).

NprX activation mechanism involves the NprR conserved residue Arg126

Analysis of the crystal structure of the NprR(Δ HTH)/NprX complex showed that the peptide binds in a deep cleft in the middle of the TPR domain of the protein (Figure 4A). The interaction with NprX7 is characterized by an interface area of about 725 Å² involving protein residues from the TPR motifs 1 to

7 while in the complex with NprX8n this interface covers 780 Å², explaining the 4-fold increase of the affinity when comparing the values obtained by ITC with NprX7 and NprX8n, respectively (Figure S1). The complex is mainly stabilized by van der Waals interactions and H-bonds involving main chain atoms from the peptide (Figure 4B). There is only one specific contact which involves the side chain of the aspartate from NprX, the single residue conserved among the seven phylogenetic groups of the NprX peptides [34], and the side chain of the conserved residue Arg126 from the TPR2 motif of NprR. Functional assays showed that the NprR(Δ HTH)(R126A) was not able to activate the transcription of the *nprA* gene in the presence of NprX (Figure S3A). Native gel electrophoresis confirmed that this mutant protein is unable to shift toward the active tetramer upon addition of peptide (Figure S3B). However, ITC experiments demonstrated that the peptide binding is not impaired by the R126A mutation (Figure S3C). These results strongly suggest that Arg126 plays an essential role in the activation mechanism of NprR.

The K residue in position 2 of NprX7 is directly involved in the activation mechanism

Previous functional experiments demonstrated that NprR from group I was activated by both NprX7 from group I and group II but not from five other identified phylogenetic groups [34]. We used ITC experiments to test if this result reflected the affinity of the protein for the different NprX7 sequences (Table 2). The active peptides NprX7-I (SKPDIVG) and NprX7-II (SKPDTYG) displayed about the same affinity for NprR-I, with respective K_d values of 120 nM and 250 nM. This suggests that the substituted positions 5 and 6 are not essential for binding nor activation. More surprisingly, the inactive peptide NprX7-III (SNPDIYG) also displayed a strong affinity for the protein, with a K_d of 80 nM. The V to Y substitution in position 6 being also present in NprX7-II, this result suggests that the residue K in position 2 is important for the activation but not for binding. A strong decrease of the affinity was observed with the inactive peptide NprX7-IV (SRPDVLT) presenting an additional substitution in position 7. Together with the reduced affinity measured with NprX8c, this result confirms that the C-terminal G of the peptide in position 7 is important for binding. The heptapeptide characteristic of groups V to VII (WKPD~~T~~LG) also displayed only a weak interaction with NprR-I. This could be due to sterical hindrance introduced by the W substitution in position 1. The poor

affinity of NprR-I for the peptides NprX7-IV and NprX7-V-VII most probably explains why they don't activate the protein. The reason why NprX7-III does not activate NprR-I remains however unclear. The K to N substitution in position 2 seems to result in a non productive binding of the peptide. This was confirmed by native gel electrophoresis revealing that only the two activating heptapeptides from groups I and II were able to shift the protein band toward the active tetrameric conformation (Figure 5).

NprR DNA-binding mode

Previous ITC experiments showed that the NprR/NprX complex specifically binds to dsDNA fragments centered on the -35 box of the *nprA* promoter [34]. We tested if this interaction was lost in the absence of peptide. A signal was observed (Figure 6A) but it corresponded to a weak interaction compared to the titration curve obtained in the presence of NprX7 (Figure 6B) and no K_d could be calculated. This suggested that non-specific interactions could occur between apo NprR and DNA. This hypothesis was confirmed by a second set of ITC experiments showing that apo NprR also weakly binds to oligonucleotides that were not recognized by the NprR/NprX complex [34] (Figure 6C). Both specific and non-specific protein-DNA interactions display entropy driven endothermic profiles that could reflect large conformational changes occurring in parallel to the binding process.

The effect of DNA binding on NprR was further investigated by Differential Scanning Calorimetry (DSC). The melting temperature (T_m) of NprR strongly increased from 45.2°C to 50.3°C upon addition of peptide, demonstrating that peptide binding strongly contributes to the stabilization of the protein. However, addition of DNA only slightly increased the T_m of apo NprR to 46.5°C whereas it significantly increased the T_m of the NprR/NprX complex to 53.3°C (Figure 6D). These results further supported the hypothesis of a weak non-specific binding of apo NprR on DNA and the need of the bound peptide for the formation of a strong specific NprR-DNA complex.

DISCUSSION

Our structural analysis demonstrating that the active form of the NprR/NprX complex is a tetramer has been performed on a truncated form of the protein and in the absence of DNA. In the absence of a

NprR/NprX-DNA crystal structure, modeling of the missing HTH domains in the structure of the NprR(Δ HTH)/NprX complex can nevertheless be achieved by using the phage 434 Cro/OR1 complex (PDB ID 3CRO) [36] as a model of the canonical interaction between a dimer of HTH domains in complex with a pseudopalindromic DNA sequence. The Cro/OR1 structure was manually rotated and translated to bring the HTH domains of the Cro dimer into proximity of the NprR(Δ HTH) tetramer. The N-terminal extremities of two adjacent NprR(Δ HTH) subunits are distant of about 34Å and could interact *via* a short flexible linker with the Cro dimer bound to the two half sites of the B-type DNA target. The tetrameric conformation of the complex allows the binding of two short DNA fragments, suggesting that *in vivo* the NprR/NprX tetramer could bind simultaneously on two distinct sites of the target promoter (Figure 7).

This situation has already been reported for other HTH-type transcription factors [37,38,39] and for the RNPP protein from *E. faecalis*, the sex pheromone receptor PrgX [20]. It has been shown that PrgX binds on two DNA target sites distant from about 70 bp [40]. It has been proposed that the binding of one PrgX dimer to the site of high affinity could allow the recognition of the second site of lower affinity by the second dimer of the PrgX tetramer. Our interaction experiments demonstrating that the apo dimer of NprR binds in a non specific manner to short oligonucleotides, suggest that a similar cooperative mechanism is required for specific binding of NprR on its DNA target sites.

The structure of the apoform of NprR is still unknown but interesting clues could be found by comparing NprR(Δ HTH) with the crystal structure of the RapH phosphatase that has recently been solved in complex with its protein target Spo0F [32]. The seven TPR motifs of RapH superimpose with the C-terminal domain of NprR(Δ HTH) with an rmsd distance of 3.46Å over 193 aligned C α atoms. The core of the protein is more conserved and removing the first and the last TPR motifs from this calculation reduced the rmsd between the two proteins to 2.78Å over 178 aligned C α atoms. The similarity between NprR and RapH extends to the dimerization mode that mainly involves the last TPR motif of the protein (Figure 8A). Furthermore, RapF, that has been described as a monomer [33], displays the same interaction mode with symmetry related molecules in the crystal packing of the RapF-ComAc complex (PDB ID 3ULQ).

The structure based sequence alignment between the RNPP proteins (Figure S4) shows that the N-terminal three helix bundle domain and the linker helix observed in the RapH-Spo0F [32] and RapF-ComAc [33] structures display high sequence similarity with the TPR1 and TPR2 motifs of NprR(Δ HTH). This suggests that in the presence of their cognate Phr peptides, the N-terminal domain of the Rap protein could adopt a TPR structure as observed in the NprR(Δ HTH)/NprX complex. This suggests also that, in the apo conformation, the first two TPR motifs of NprR could adopt a different conformation. Superimposition of the N-terminal domain of RapH with the TPR1 and TPR2 motifs of NprR(Δ HTH) demonstrates that the 3-helix bundle of RapH superimposes well with the first three helices of NprR(Δ HTH) (Figure 8B). However, they are in a very different position compared to the conserved TPR domain, due to a large conformational change in the NprR TPR2 motif corresponding to the linker region of the Rap proteins. We propose that the absence of bound peptide could disorganize the TPR2 motif of NprR, inducing the reorientation of the TPR1 and of the N-terminal HTH domain, resulting in the dissociation of the NprR tetramer into two Rap-like apo dimers. This hypothesis is supported by a new analysis the SAXS data obtained with apo NprR(Δ HTH) that could be fit better when introducing flexibility in the loop between the α 3 and α 4 helices of the TPR2 motif in the model of the extended dimer II containing the flexible N- and C-terminal residues missing in the crystal structure (Figure 8CD).

Multiple sequence alignment performed between NprR homologues including members from the 7 phylogenetic subfamilies previously identified [34] demonstrate that most contact residues from both dimers I and II interfaces are conserved. This suggests that the dimer-tetramer switch is conserved among all NprR variants. Interestingly, the NprR residue Arg126 that has been shown to be essential for the activation mechanism belongs to a sequence motif (KRD) strictly conserved in all NprR proteins that is located at the C-terminal extremity of helix α 3 from TPR2 (Figure S4). We hypothesize that in the absence of peptide the loss of interaction with Arg126 could promote the proposed conformational change in the TPR2 motif of NprR. The C-terminus of the TPR2 motif carrying the NprR residue Arg126 corresponds to the poorly conserved linker region of the Rap proteins. Furthermore, the NprX residue D interacting with Arg126 is not conserved in the Phr

peptides. It is therefore difficult to predict if the Phr-dependent Rap regulation mechanism would rely on the same type of interaction.

Our specificity analysis suggested that the K residue in position 2 of NprX7-I could be important for productive binding of the peptide. The side chain of K is in stacking interaction with the NprR-I residue His201, which also interacts with the conserved Trp167 from TPR3. This strong hydrophobic interaction could be involved in proper positioning of the N-terminal domain and stabilization of the active tetramer.

Finally, our study suggests that a competition between peptides from different pherogroups can occur. The characterization of the non-productive binding of peptide will provide necessary insights for the rational design of quorum quenching molecules usefull as new antimicrobial agents. Since the characterization of the RNPP family, a rapid increase of the number of sensor regulators uncovered within the low GC% Gram-positive bacteria was observed, pointing out their important role in adaptative and virulence processes [34,41,42]. This clearly identifies these regulators as major targets for the search of new molecules with applications in medical, food and biotechnology areas.

MATERIALS AND METHODS

Proteins and ligands preparation

The gene of NprR from *B. thuringiensis* strain 407 has been cloned into a pQE60 plasmid and expressed as His6-tagged recombinant protein in *Escherichia coli* [34]. The gene encoding the NprR Δ HTH protein was constructed by deleting the DNA sequence corresponding to the N-terminal 60 residues of NprR. The double mutations (Y223A/F225A) and (N407A/Y410A) as well as the single R126A mutation were introduced in the genes of the His6-tagged NprR and NprR(Δ HTH) proteins by PCR amplification using appropriate primers (Table S2). The recombinant plasmids are described in Table S3. The wild-type and mutant NprR proteins have been produced and purified as described [34]. The protein samples were aliquoted, flash frozen and stored at -20°C in 20 mM Tris-HCl pH8 and 100 mM NaCl.

Selenomethionine-labeled NprR(Δ HTH) was produced from *E. coli* strain M15 [pREP4, pQE60NprR Δ HTH] grown overnight at 28°C in the presence of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ampicilin and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of kanamicin in M9 minimal medium supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Lys, Thr and Phe, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Leu, Ile, Val and Met. At mid-exponential growth phase ($\text{OD}_{600}=0.6$), the cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10 min at room temperature and resuspended in fresh M9 medium supplemented as before except for methionine that was replaced by 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of selenomethionine. After incubating 30 min at 37°C, expression was induced with 1mM of IPTG over 4h at 37°C. The purification protocole was unchanged.

The different NprX peptides have been synthetized by Genscript and resuspended at 25 mM in the protein storage buffer. They were aliquoted, flash frozen and stored at -20°C.

Synthetic oligonucleotides from Eurofins-MWG were resuspended at a concentration of 200 μM to 1 mM in the protein storage buffer. The two complementary strands were mixed at equimolar concentrations and hybridized by heating at 90°C for 40 min followed by slow cooling at room temperature for 1 hour.

Dynamic light scattering (DLS)

DLS measurements were carried out on a Wyatt DynaPro light scattering instrument. The samples were centrifuged at 15000 g for 10 min at 4°C just before use. Measurements were carried out at 20°C and for each sample, 20 acquisitions (5sec each) were recorded. The correlation curves were deconvoluted using the Dynamics V6 software (Wyatt Technologies Corp.).

Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Native gels experiments were performed using 8% acrylamide prepared with 2M Tris-HCl buffer at pH 8.8. The running buffer contained 0.05M Tris-HCl pH 8.3 and 0.5M Glycine. 10 μL of sample containing 15 μg of protein (1.5 $\text{mg}/\text{ml}=30\mu\text{M}$) alone or complexed with 1mM of NprX peptide were loaded on the gels. Migration was performed at 100V during 2h30 at room temperature.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Isothermal titration calorimetry experiments were performed at 20°C with an ITC200 isothermal titration calorimeter (Microcal®). For the protein-peptide interaction measurements, the protein concentration in the microcalorimeter cell was set at 25 or 50 µM and the concentration of the NprX peptide in the syringe was set between 250 and 500 µM, depending of the experiment. A first injection of 0.4 µl followed by 36 injections of 1 µl were made at intervals of 180 sec while stirring at 1000 rpm at 20°C. For the protein-DNA interaction measurements, the DNA concentration in the microcalorimeter cell was set at 10, 20 or 30 µM and the concentration of the protein sample, either alone or in equimolar complex with NprX, was set at 120, 240 or 330 µM in the syringe, depending of the experiment. A total of 20 injections of 2 µl were made at intervals of 180 sec while stirring at 1000 rpm at 20°C. Alternatively, the protein sample was set in the cell at 10 or 30 µM and the oligonucleotide was injected at 120 or 330 µM, respectively. The data were analyzed according to the one-binding site model using the MicroCal Origin software provided by the manufacturer [34].

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry experiments were performed with VP-DSC calorimeter (Microcal®). The concentrations in the cell were set at 9.6µM for the protein, either alone or in equimolar complex with peptide, and DNA was added at 4.8µM. Samples equilibrated at a temperature of 20°C were heated up to 80°C at a constant rate of 1°C/min. Before each measurement, a baseline was recorded with the sample buffer. The data were analysed using the the MicroCal Origin software provided by the manufacturer.

Crystallization

Crystallization conditions of the 1/10 NprR(Δ H₁₋₁₀)/NprX complex were determined at 18°C by screening commercial crystallization kits using a nanodrop crystallization Cartesian robot (Genomics Solutions, UK). The first crystals were obtained in the kit solution MBClass n°95 containing 1M Na Citrate and 0.1M Hepes, pH 7.5. The crystals were reproduced and improved manually at 18°C using the hanging drop method. The crystal used for the native data set was obtained at 20mg/ml of

NprR(Δ HTH) in the presence of the NprX8n peptide after equilibration against a crystallization solution containing 0.975M Na Citrate and 0.1M Hepes, pH 7.6. The selenomethionine labeled protein crystallized at 5mg/ml in the presence of the NprX7 peptide after equilibration against a crystallization solution containing 0.975M Na Citrate and 0.1M Hepes, pH 7.6.

Data collection, structure determination and refinement

The crystals were flash cooled in the crystallization solution supplemented with 30% glycerol before diffraction data collection at 100 K on beamline Proxima-I at the synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France). Diffraction data from selenomethionine labeled crystals were collected at a single energy (12.6615eV) corresponding to the maximum of the anomalous dispersion factor f'' . The native data set was collected at a wavelength of 0.980Å. Both data sets were processed using the XDS package [43]. The crystal structure of NprR(Δ HTH) was determined by single-wavelength anomalous diffraction method. The sub-structure determination was performed with the program SHELXD [44]. 120 selenium sites (out of 132 expected) were used for initial phasing calculation using the program PHASER [45] and density modification were carried out with RESOLVE [46]. An initial model covering about 80 % of the NprR(Δ HTH) sequence was automatically built using BUCCANEER [47]. The partial model was then used as input for phasing calculation and completion of the sub-structure using the program PHASER, followed by a new run of RESOLVE and BUCCANEER. Subsequent model building was done manually with COOT [48] alternating with cycles of refinement using BUSTER [49]. Non-crystallographic symmetry was applied in all steps of the refinement using the local structure similarity restraints method. Once the SeMet-derivative structure has been solved, the resulting model was used to solve the structure of the native NprR(Δ HTH)/NprX8n complex following the same refinement procedure. Figures of 3D structures were generated using PYMOL (DeLano Scientific LLC). The final model of the native NprR(Δ HTH)/NprX8n complex was evaluated using COOT validation tools, and the MolProbity software [50] before deposition in the Protein Data Bank [51] under ID code XXXX. Refinement details are summarized in table 2.

Structure analysis

Structure comparisons and calculations of rmsd distances have been performed by the protein structure comparison service Fold at the European Bioinformatics Institute [52]. Calculation of the contacts and interfaces have been performed the Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies service (PISA) at the European Bioinformatics Institute [53]. Multiple sequence alignment was performed using ClustalW [54].

SAXS analysis

SAXS experiments were conducted on beamline SWING at SOLEIL Synchrotron (Gif sur Yvette, France) using a wavelength of $\lambda = 1.003\text{\AA}$. Data were recorded on a 17 cm x 17 cm low-noise Avix charge-coupled device detector positioned at a distance of 1850 mm from the sample, with the direct beam off-centered. The useful Q-range was $0.018 - 0.4\text{\AA}^{-1}$, where the momentum transfer $Q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, and 2θ is the scattering angle. 40 μl of NprR(Δ HTH) sample at 14 mg/ml was injected into a size-exclusion column (SHODEX KW403) using an Agilent© High Performance Liquid Chromatography system cooled at 15°C and eluted directly into the SAXS flowthrough capillary cell at a flow rate of 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. SAXS data were collected online throughout the whole elution time, with a frame duration of 2 sec and a dead time between frames of 1 sec. The first 30 frames collected during the first minutes of the elution flow were averaged using the image analysis software Foxtrot (SWING beamline software, unpublished) to account for buffer scattering. The 10 frames corresponding to the top of the elution peak were averaged and used for data processing after subtraction of the baseline from the protein signal.

The model of apo NprR(Δ HTH) was built using Dadimodo, a program for refining the structure of multidomain proteins against small-angle scattering data [55]. The $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop of TPR2 and the N- and C- terminal extremities were defined as flexible regions while the regions $\alpha 1$ - $\alpha 3$ and $\alpha 4$ - $\alpha 18$ of the type II dimer were kept rigid. Stepwise generic conformational changes were applied cyclically in a stochastic optimization algorithm that performs a search in the protein conformation space.

Functional analysis of NprR and NprR/NprX interactions

For functional analysis, mutated *nprR* genes (R126A; Y223A/F225A; N407A/Y410A) and *nprX* gene with their own promoters were amplified by PCR using chromosomal DNA from the *Bacillus* 407 strain and primers described in Table S2. PCR fragments were digested by the appropriate enzymes and inserted between the *Xba*I and *Eco*RI sites of pHT304 [56]. The resulting plasmids pHT-R[R126A]X, pHT-R[Y223A/F225A]X and pHT-R[N407A/Y410A]X as well as their features are described in Table S3. Activation of the *nprA* gene expression by the *nprR* mutants was measured by complementing with these plasmids a *Bacillus nprA*'Z strain carrying a chromosomal transcriptional fusion between the *nprA* promoter region and the *lacZ* gene. β -Galactosidase activities were measured at 37°C in HCT medium as previously described [34]. The specific activities are expressed in units of β -galactosidase per milligram of protein (Miller units). Each assay was independently repeated at least three times and a representative graph was shown for each experiment.

REFERENCES

1. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.
2. Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153: 3923-3938.
3. Lyon GJ, Novick RP (2004) Peptide signalling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25: 1389-1403.
4. Lazazzera BA (2001) The intracellular function of extracellular signalling peptides. *Peptides* 22: 1519-1527.
5. Pottathil M, Lazazzera BA (2003) The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signalling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci* 8: d32-45.
6. Ji G, Beavis RC, Novick RP (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12055-12059.

7. Solomon JM, Lazizzera BA, Grossman AD (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 10: 2014-2024.
8. Bouillaut L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, et al. (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* 36: 3791-3801.
9. Gominet M, Slamti L, Gilois N, Rose M, Lereclus D (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Mol Microbiol* 40: 963-975.
10. Perego M, Hoch JA (1996) Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1549-1553.
11. Leonard BA, Podbielski A, Hedberg PJ, Dunny GM (1996) *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 260-264.
12. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, et al. (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18490-18495.
13. Blatch GL, Lasse M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939.
14. D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28: 655-662.
15. Wintjens R, Rooman M (1996) Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J Mol Biol* 262: 294-313.
16. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 29: 231-262.
17. Suzuki A, Mori M, Sakagami Y, Isogai A, Fujino M, et al. (1984) Isolation and structure of bacterial sex pheromone, cPD1. *Science* 226: 849-850.

18. Dunny GM (2007) The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362: 1185-1193.
19. Clewell DB, An FY, Mori M, Ike Y, Suzuki A (1987) *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAD1) response: evidence that the peptide inhibitor excreted by pAD1-containing cells may be plasmid determined. *Plasmid* 17: 65-68.
20. Shi K, Brown CK, Gu ZY, Kozlowicz BK, Dunny GM, et al. (2005) Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18596-18601.
21. Kozlowicz BK, Shi K, Gu ZY, Ohlendorf DH, Earhart CA, et al. (2006) Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol Microbiol* 62: 958-969.
22. Bae T, Kozlowicz BK, Dunny GM (2004) Characterization of cis-acting prgQ mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. *Mol Microbiol* 51: 271-281.
23. Fixen KR, Chandler JR, Le T, Kozlowicz BK, Manias DA, et al. (2007) Analysis of the amino acid sequence specificity determinants of the enterococcal cCF10 sex pheromone in interactions with the pheromone-sensing machinery. *J Bacteriol* 189: 1399-1406.
24. Salamitou S, Rami sse F, Brehelin M, Bourguet D, Gilois N, et al. (2000) The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* 146 (Pt 11): 2825-2832.
25. Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, et al. (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3: e2793.
26. Slamti L, Lereclus D (2002) A cell-cell signalling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J* 21: 4550-4559.
27. Perego M, Hanstein C, Welsh KM, Djavakhishvili T, Glaser P, et al. (1994) Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* 79: 1047-1055.

28. Bongiorno C, Stoessel R, Shoemaker D, Perego M (2006) Rap phosphatase of virulence plasmid pXO1 inhibits *Bacillus anthracis* sporulation. *J Bacteriol* 188: 487-498.
29. Auchtung JM, Lee CA, Grossman AD (2006) Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. *J Bacteriol* 188: 5273-5285.
30. Core L, Perego M (2003) TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49: 1509-1522.
31. Perego M, Brannigan JA (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* 22: 1541-1547.
32. Parashar V, Mirouze N, Dubnau DA, Neiditch MB (2011) Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PLoS Biol* 9: e1000589.
33. Baker MD, Neiditch MB (2011) Structural basis of response regulator inhibition by a bacterial anti-activator protein. *PLoS Biol* 9: e1001226.
34. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, et al. (2011) A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol* 82: 619-633.
35. Dubois T, Faegri K, Perchat S, Lemy C, Buisson C, et al. (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog* 8: e1002629.
36. Mondragon A, Harrison SC (1991) The phage 434 Cro/OR1 complex at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* 219: 321-334.
37. Friedman AM, Fischmann TO, Steitz TA (1995) Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* 268: 1721-1727.
38. Miguel V, Pezza RJ, Argarana CE (2007) The C-terminal region of *Escherichia coli* MutS and protein oligomerization. *Biochem Biophys Res Commun* 360: 412-417.
39. Kataoka M, Tanaka T, Kohno T, Kajiyama Y (2008) The carboxyl-terminal domain of TraR, a *Streptomyces* HutC family repressor, functions in oligomerization. *J Bacteriol* 190: 7164-7169.

40. Bae T, Kozlowicz B, Dunny GM (2002) Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation. *J Mol Biol* 315: 995-1007.
41. Zheng F, Ji H, Cao M, Wang C, Feng Y, et al. (2011) Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 79: 1319-1328.
42. Fleuchot B, Gitton C, Guillot A, Vidic J, Nicolas P, et al. (2011) Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Mol Microbiol* 80: 1102-1119.
43. Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* 26: 795-800.
44. Sheldrick GM (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* 64: 112-122.
45. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40: 658-674.
46. Terwilliger T (2004) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification and model building. *J Synchrotron Radiat* 11: 49-52.
47. Cowtan K (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 1002-1011.
48. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D-Biol Cryst* 60: 2126-2132.
49. Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, et al. (2009) BUSTER. version 280 Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
50. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 12-21.
51. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.

52. Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2256-2268. Epub.
53. Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372: 774-797.
54. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
55. Evrard G, Mareuil F, Bontems F, Sizun C, Perez J (2011) DADIMODO: a program for refining the structure of multidomain proteins and complexes against small-angle scattering data and NMR-derived restraints. *J Appl Cryst* 44: 1264-1271
56. Arantes O, Lereclus D (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108: 115-119.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the use of the synchrotron radiation beamlines Proxima-1 and Swing at SOLEIL and ID14, ID23 and ID29 at the ESRF, as well as the IMAGIF crystallization platform.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Effect of the peptide on the NprR oligomerization state.

Native gel analysis of NprR and NprR(Δ HTH) in the presence (+) and in the absence (-) of NprX7.

Figure 2: Crystal structure of the NprR(Δ HTH)/NprX complex.

A – NprR(Δ HTH) subunit shown as a cartoon colored by TPR from blue (TPR1) to purple (TPR9). NprX7 is displayed in sticks and colored by atom type. The numbering of the helices and of the TPR motifs is indicated.

B – NprR(Δ HTH) tetramer shown as cartoon and colored by chain. NprX7 is displayed in sticks and colored by atom type.

C – Dimer type I colored by chain (same colors as in B) shown as cartoon and surface, together with a close view of the interface region around residues Y223 and F225 highlighted in sticks.

D – Dimer type II colored by chain (same colors as in B) shown as cartoon and surface, together with a close view of the interface region around residues N407 and Y410 highlighted in sticks.

Figure 3: Characterization of the apo NprR dimer.

A – Native gel analysis of the interface mutant proteins in the presence and in the absence of peptide. Lane 1: WT apo protein; lane 2: WT protein + NprX7; lane 3: mutant apo (Y223A/F225A) ; lane 4: mutant (Y223A/F225A) + NprX7; lane 5: mutant apo (N407A/Y410A); lane 6: mutant (N407A/Y410A) +NprX7.

B – Fit of the experimental SAXS curve measured with apo NprR(Δ HTH) (in red) to a simulated curve calculated with the NprR(Δ HTH) type II dimer extracted from the NprR(Δ HTH)-NprX tetrameric complex (in blue).

Figure 4: Analysis of the NprR/NprX interaction.

A – Close view of the peptide-binding pocket with bound NprX shown as sticks colored by atom type in the electrostatic surface of NprR(Δ HTH). In the foreground, the complementary electrostatic surface of NprX is displayed in the same orientation. Electronegative and electropositive surfaces are colored red respectively.

B – Close view of the peptide binding site with the NprX-NprR H-bonds network highlighted as yellow dashed lines. NprR(Δ HTH) is displayed in cartoon and colored by TPR motifs according to Figure 2A. Residues in interaction with the peptide are highlighted in sticks and labeled. The bound NprX8n peptide is shown in sticks and colored by atoms.

Figure 5: Effect of the peptide from different pherogroups on the NprR oligomerisation state.

Native gel analysis of NprR and NprR(Δ HTH): Lanes 1 and 3: 20 μ M protein alone; lane 2: + 1mM NprX7-I; lane 4: +1mM NprX7-II; lane 5: +1mM NprX7-III.

Figure 6: NprR-DNA interaction analysis.

A – ITC analysis of the interaction between NprR and specific DNA in the absence of NprX7. The experiment was performed with the oligonucleotide nprA-B26 (5'-TACAAA**ACTTGAG**AAAAAATTATTT-3') centered on the -35 box (in bold) of the *nprA* promoter.

B – ITC analysis of the interaction between NprR and specific DNA in the presence of NprX7. The experiment was performed with the same nprA-B26 oligonucleotide as used in A.

C - ITC measurement of the interaction between NprR and non specific DNA in the absence of peptide. The experiment was performed with the oligonucleotide nprA-A36 (5'-AATATTTGTTCCCTCAA**AA**TTCTACAAA**ACTTGAGAA**-3') corresponding to the sequence preceding the -35 box (in bold) of the *nprA* promoter.

D - DSC curve of NprR alone (in black), in the presence of DNA (green) or in the presence of NprX7 (in red) or in presence of both NprX7 and DNA (in blue). The experiment was performed with the specific oligonucleotide nprA-B22 (5'-TACAAA**ACTTGAG**AAAAAATT-3') centered on the -35 box (in bold) of the *nprA* promoter.

Figure 7: Model of full length NprR in complex with DNA.

The NprR(Δ HTH)/NprX tetramer is displayed in cartoon and colored by chain. The bound NprX peptide is shown in sticks and colored by atom type. The HTH domains from the Cro-DNA complex (PDB ID 3CRO) are displayed in cartoon and colored according to the adjacent NprR(Δ HTH) subunit. The DNA molecule is shown as green cartoon.

Figure 8: Comparison NprR-RapH.

A – Superimposition of the NprR(Δ HTH) dimer type II displayed in cartoon and colored by TPR motifs according to Figure 2A with the RapH dimer shown as gray cartoon.

B – Superimposition of the 3-helix bundle of RapH (in gray) on helices α 1- α 2- α 3 of NprR(Δ HTH) (in blue). The conserved residues W, L, R (cf Figure S4) are highlighted in sticks.

C – Superposition of the NprR(Δ HTH) type II dimer shown as cartoon colored by chain according to Figure 2D with 3 of the best models of apo NprR(Δ HTH) produced by Dadimodo (see M&M) shown as gray cartoon and surface. The flexibility of the N-termina domain is highlighted by an arrow.

D – Fit of the experimental SAXS curve of apo NprR(Δ HTH) (in blue) to the calculated curve obtained with the best model roduced by Dadimodo (in red).

Table 1 : DLS analysis of NprR and NprR(Δ HTH) in the presence and absence of peptide

Samples	Rh (nm)	Pd (%)	MW (kDa)	Oligomeric state
NprR (51kDa)	4.4	4.5	109	Dimeric
NprR/NprX7	5.8	9.9	208	Tetrameric
NprRΔHTH (45kDa)	4.2	4.2	99	Dimeric
NprRΔHTH/NprX7	5.7	11.8	198	Tetrameric

DLS measurements were realised on both protein forms NprR and NprR(Δ HTH) at 20 μ M alone or in complexe with 200 μ M of NprX7. The hydrodynamic radius (Rh), the polydispersity (Pd) and the calculated molecular weight (MW) for each samples are indicated as well as the oligomeric state deduced from protein's molecular weight.

Table 2: Kd values determined by ITC measurements for the interactions between NprR(Δ HTH) and the NprX7 peptides from different pherogroups.

NprX	Kd (μM)
Group I : SKPDIVG	0.12 \pm 0.02
Group II : SKPDTYG	0.39 \pm 0.04
Group III : SNPDIYG	0.08 \pm 0.02
Group IV : SRPDVLT	6 \pm 0.5
Group V-VI-VII : WKPDTLG	3 \pm 0.3

Figure-1
[Click here to download high resolution image](#)

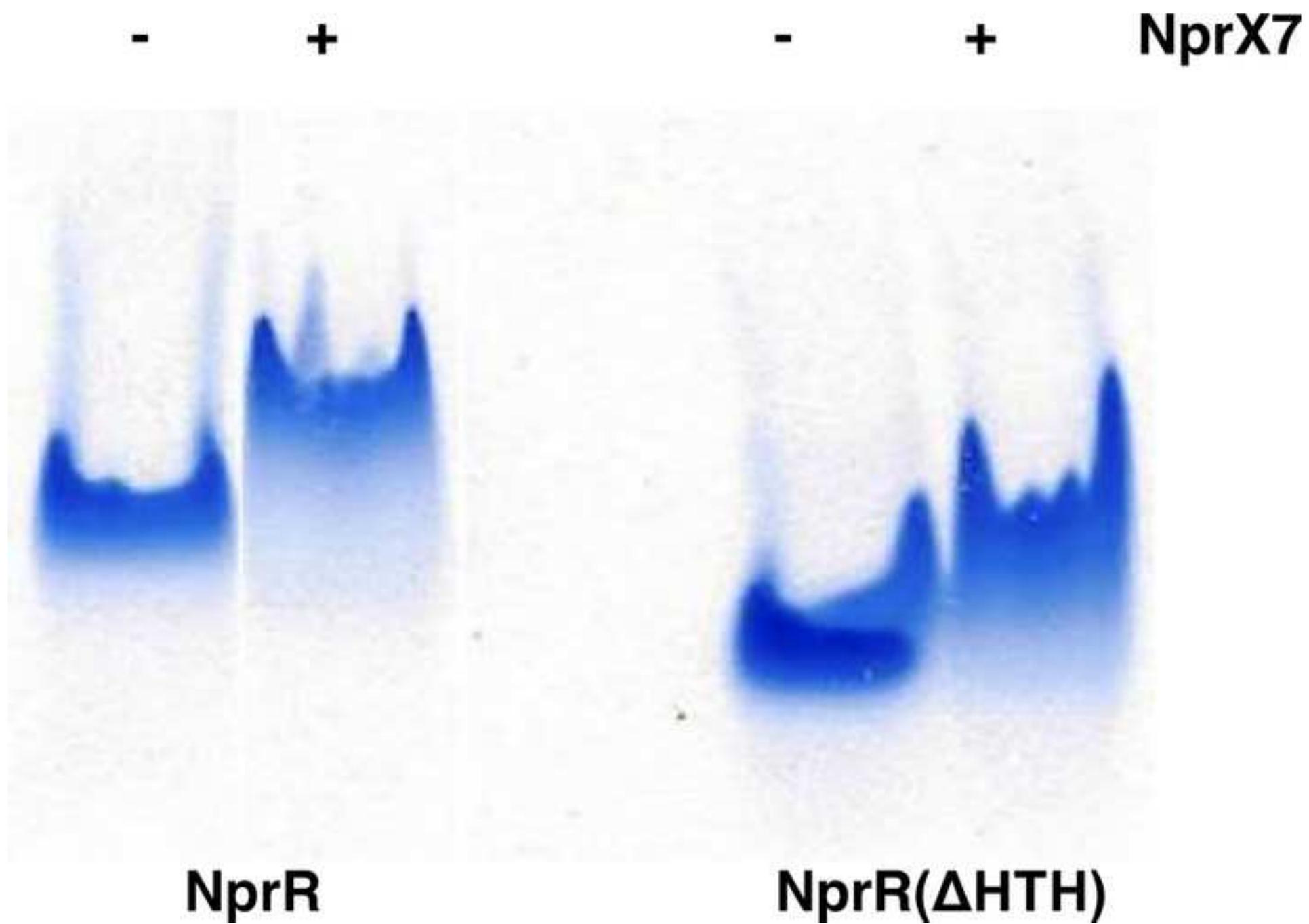
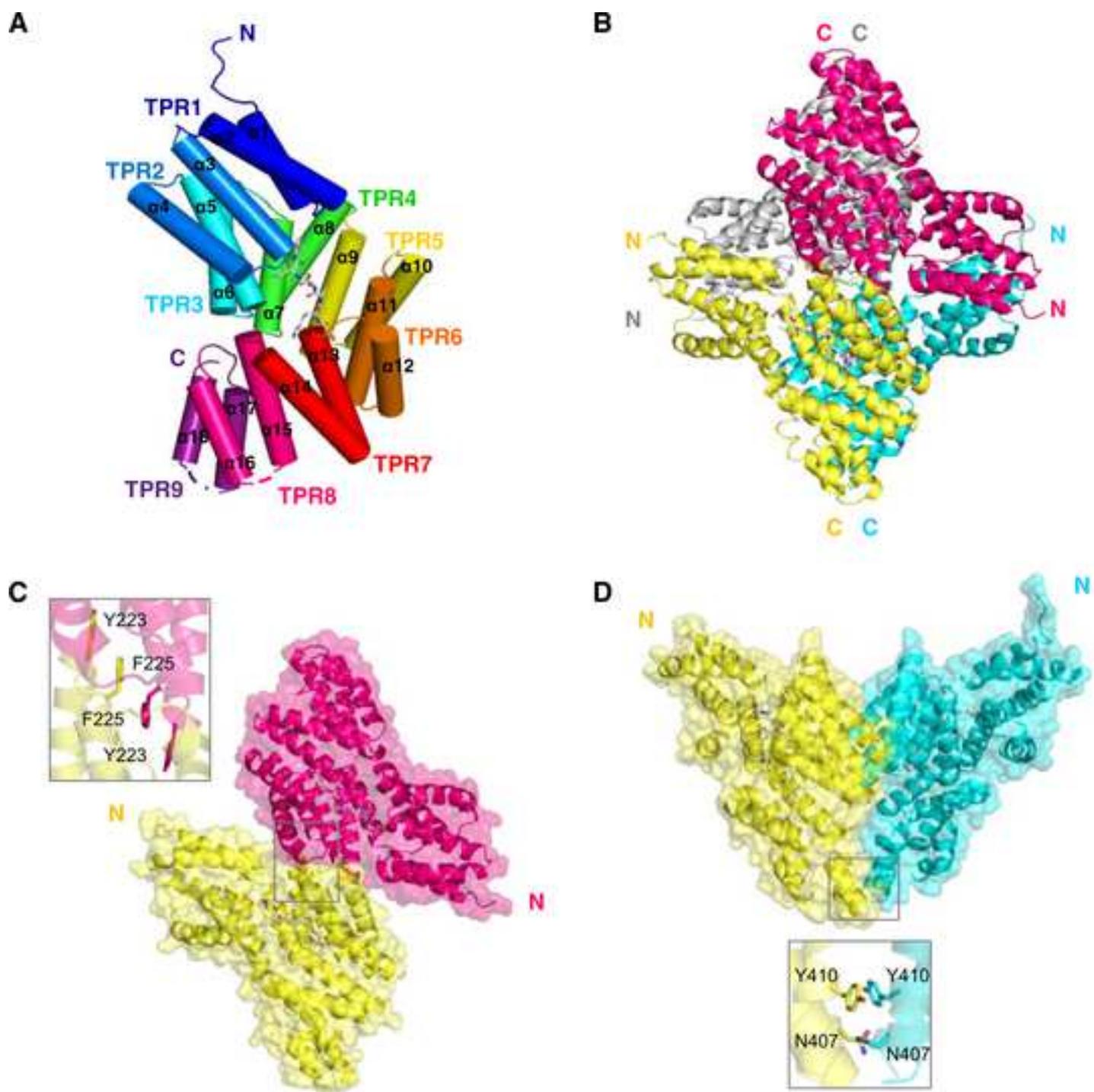
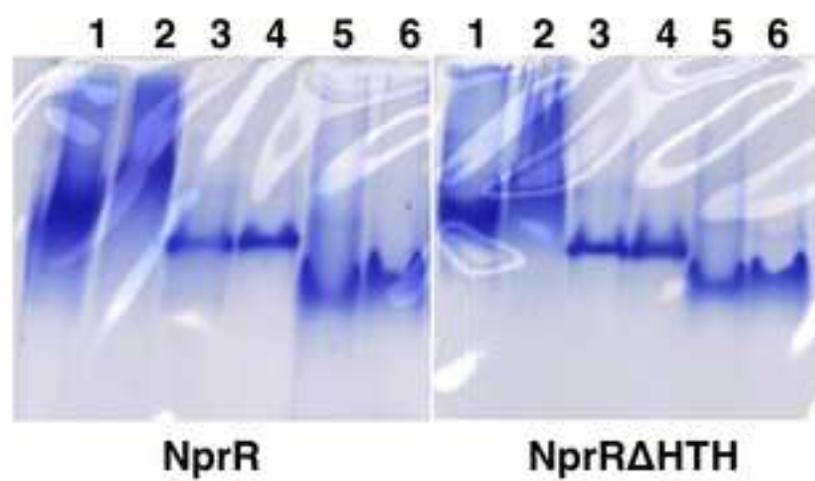


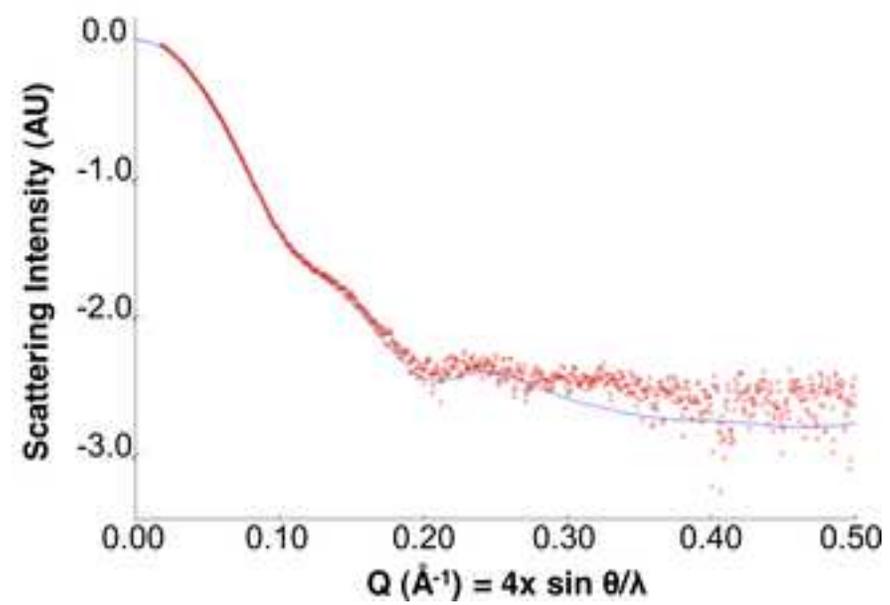
Figure-2
[Click here to download high resolution image](#)



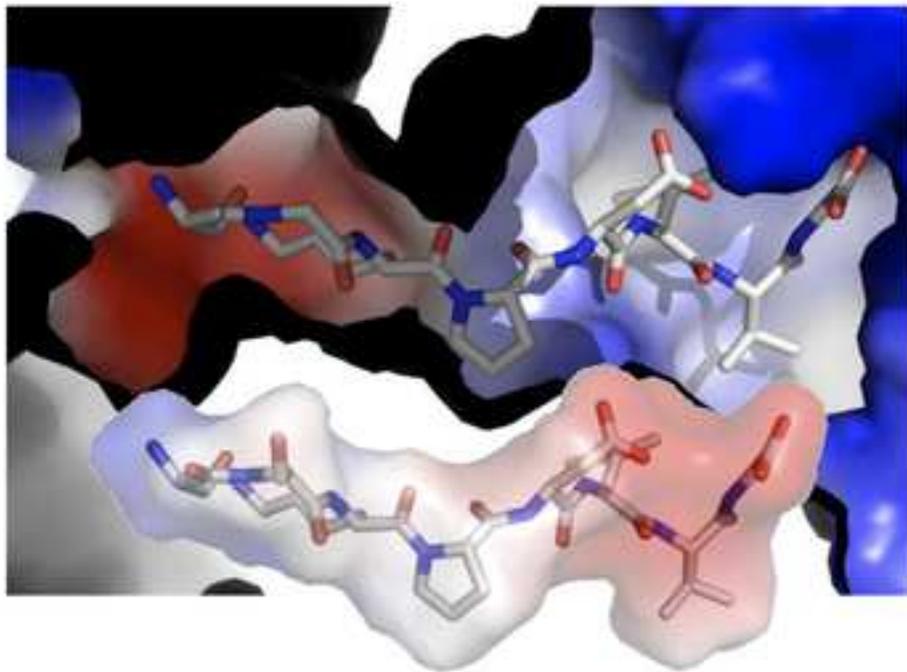
A



B



A



B

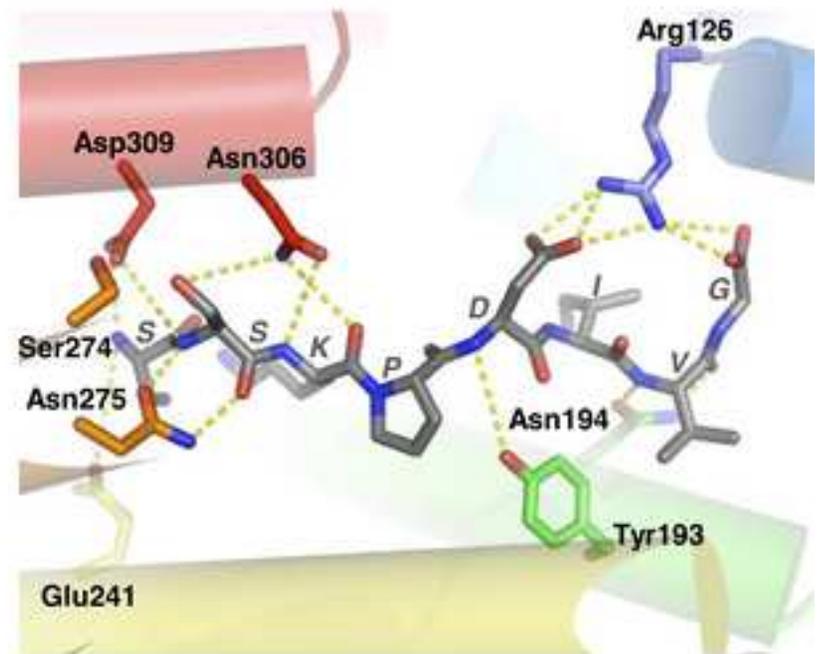
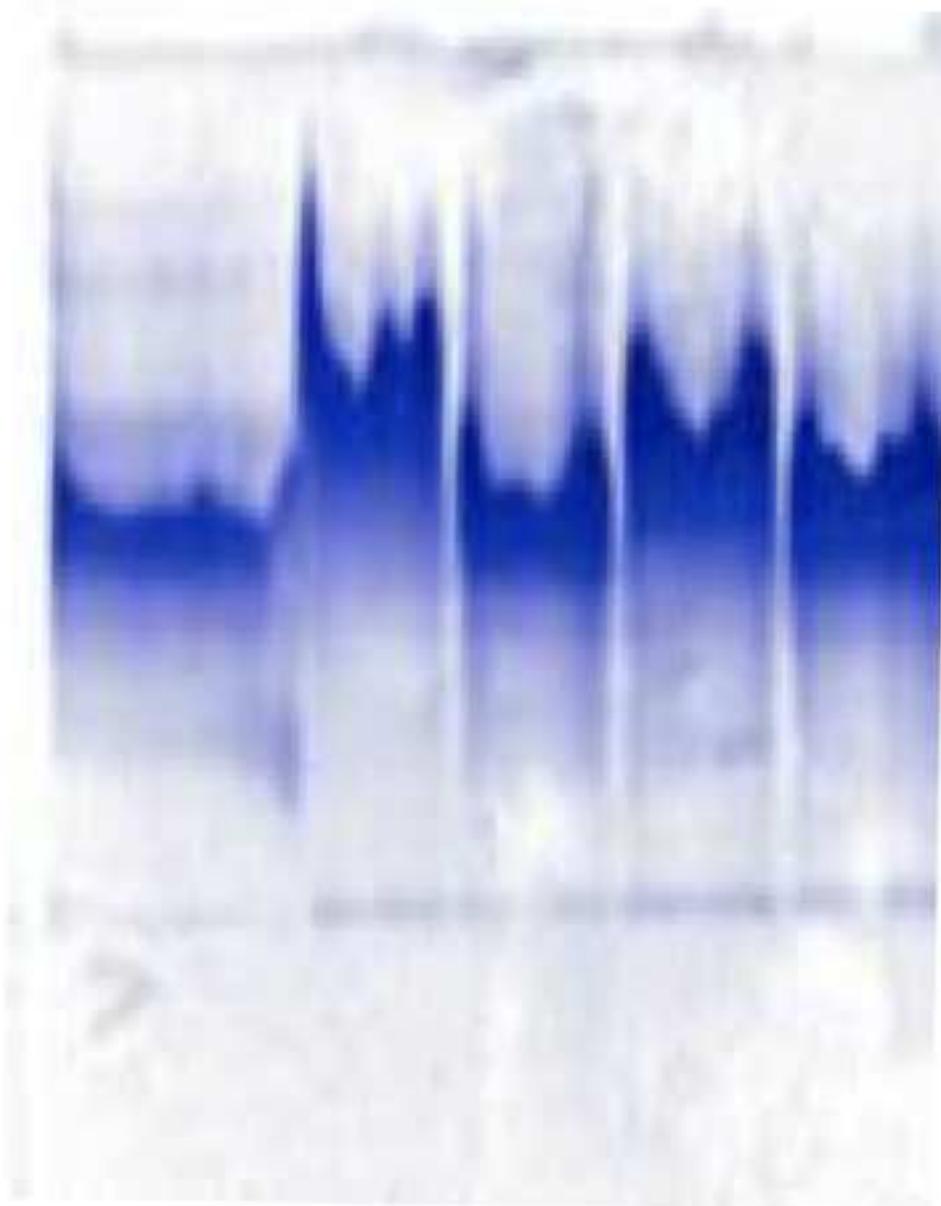


Figure-5
[Click here to download high resolution image](#)

1 2 3 4 5

1 2 3 4 5



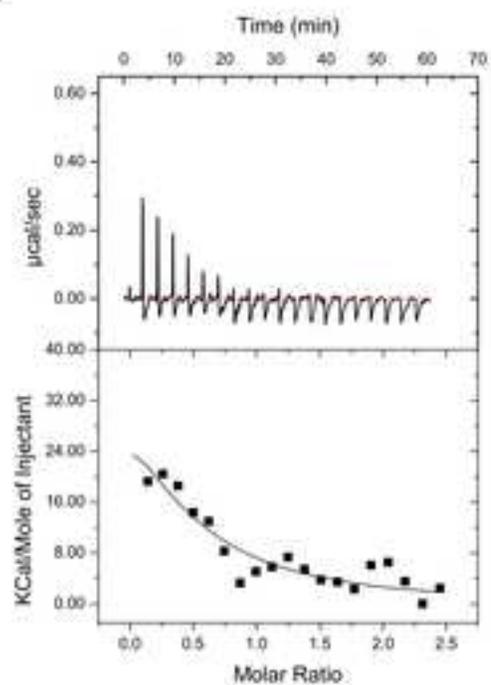
NprR



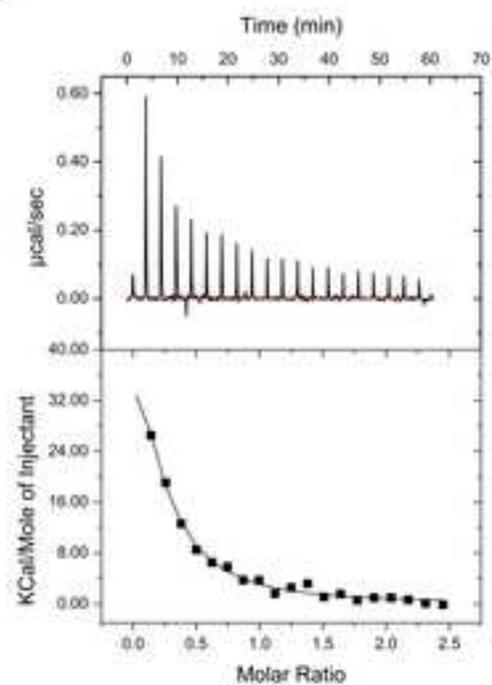
NprR(Δ HTH)

Figure-6
[Click here to download high resolution image](#)

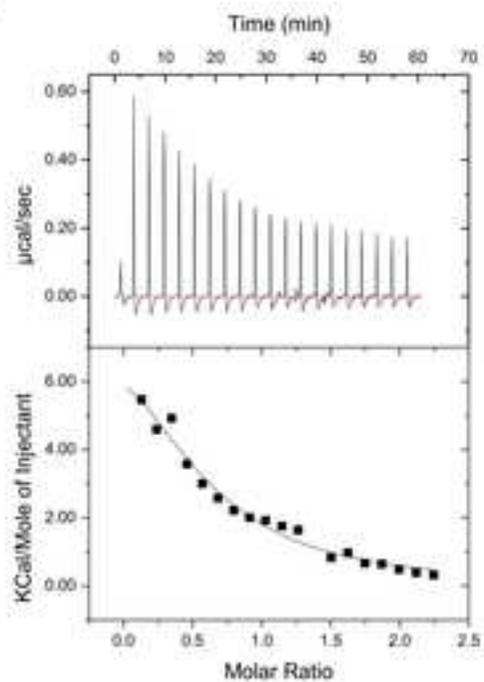
A



B



C



D

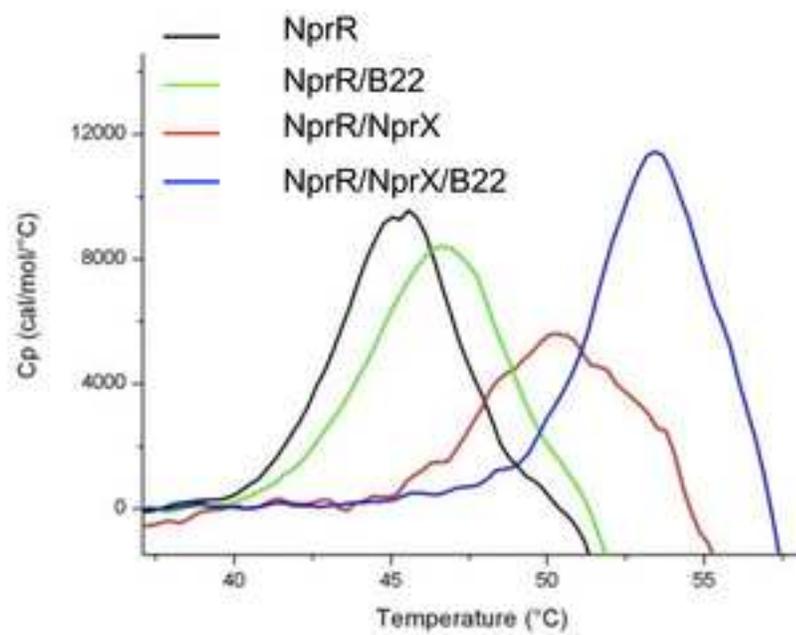


Figure-7
[Click here to download high resolution image](#)

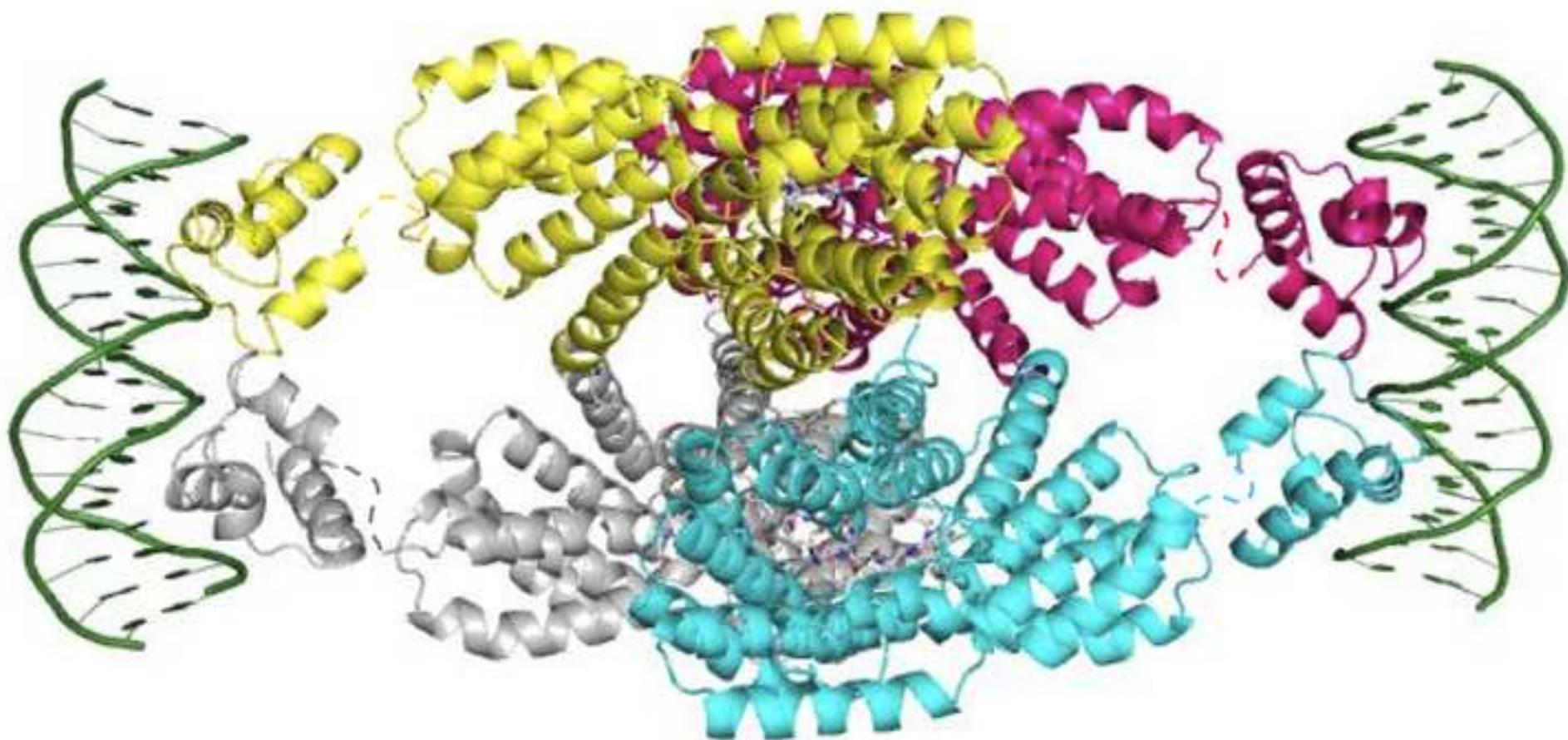
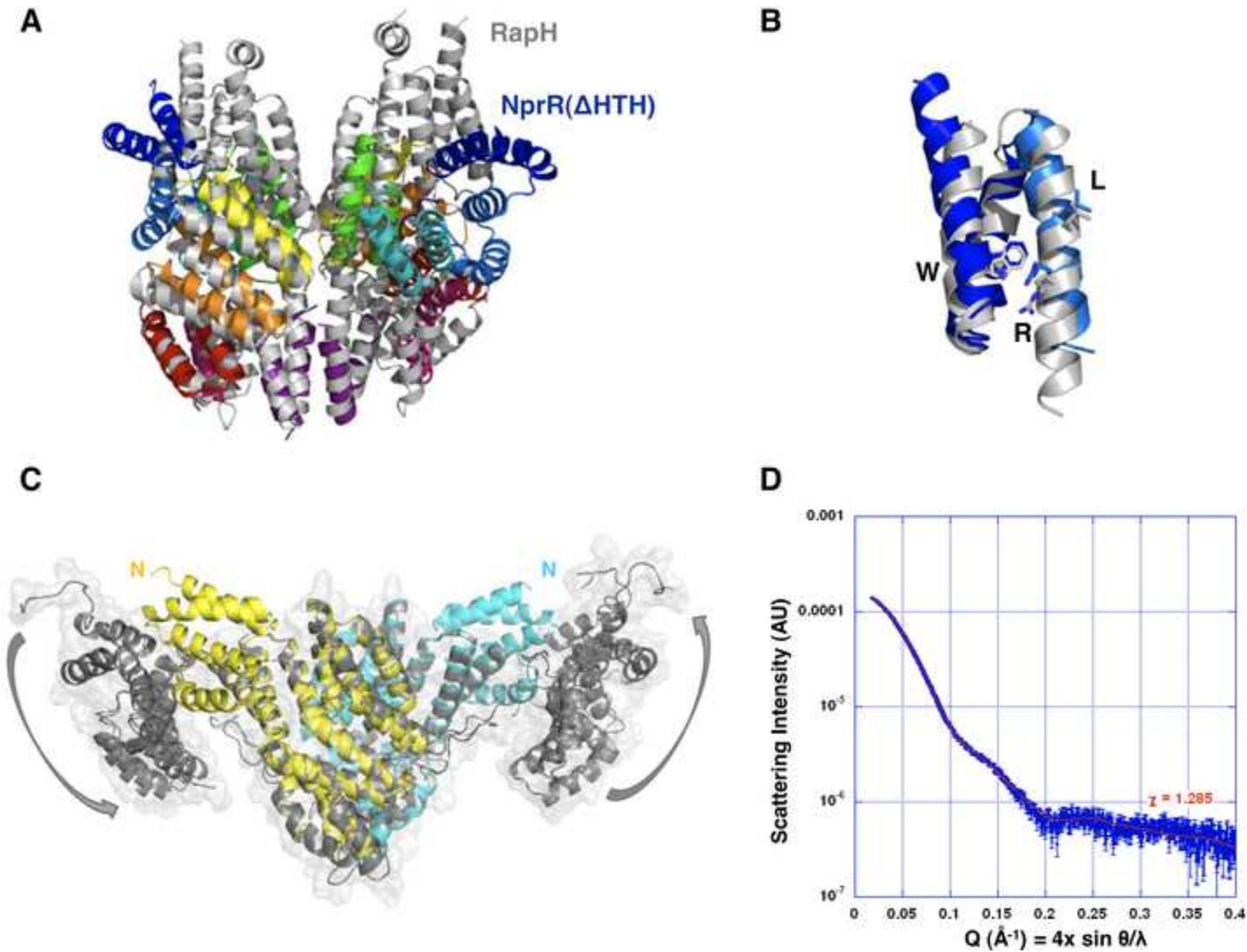


Figure-8
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Information

Figure S1: Characterization of NprX recognition.

Isothermal titration curves obtained with NprR(Δ HTH) and different forms of the NprX-I peptide.

Figure S2: Characterization of the NprR interface mutant proteins.

A – ITC measurement of the interaction between both NprR interface mutants and NprX7.

B – β -Galactosidase activity of the *Bacillus* Δ RX *nprA'*Z mutant strain carrying the plasmids pHT-R[Y223A-F225A]X or pHT-R[N407A-Y410A]X (Table S3). Time zero was defined as the onset of the stationary phase.

Figure S3: Characterization of the NprR-R126A mutant.

A – β -Galactosidase activity of the *Bacillus* Δ RX *nprA'*Z mutant strain carrying the plasmid pHT-R[R126A]X. Time zero was defined as the onset of the stationary phase.

B –Native gel analysis of the NprR-R126A mutant protein. Lane 1: WT apo NprR; lane 2: WT NprR/NprX7; lane 3: Apo NprR-R126A; lane 4: NprR-R126A/NprX7

C – ITC measurement of the interaction between the NprR(R126A) mutant protein and NprX7.

Figure S4: Structure-based sequence alignment.

The sequence of *B. thuringiensis* 407 NprR has been aligned using ClustalW [1] with one representative of each NprR pherogroup (NprR-gr1 from *B. anthracis* str. Ames, NprR-gr2 from *B. thuringiensis* serovar finitimus YBT-020, NprR-gr3 from *B. thuringiensis* serovar kurstaki str. T03a001, NprR-gr4 from *B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97-27, NprR-gr5 from *B. thuringiensis* serovar sotto str. T04001, NprR-gr6 from *B. thuringiensis* str. Al Hakam and NprR-gr7 from *B. cereus* subsp. cytotoxic NVH 391-98) and the RapA-K proteins from *B. subtilis*, as well as with the two other RNPP proteins, *B. thuringiensis* PlcR and *E. faecalis* PrgX. The alignment was manually optimized using Seaview [2]. The secondary structure elements of NprR(Δ HTH), RapH (PDB ID 3Q15), RapF (PDB ID 3ULQ), PlcR (PDB ID 2QFC) and PrgX (PDB ID 2AXU) were

added at the top of the alignment using ESPript [3]. The residues and the α -helices are labeled according to the NprR(Δ HTH) numbering.

Table S1: Crystallographic table

* Numbers in parentheses represent values in the highest resolution shell.

a $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$ where $I(h,i)$ is the intensity value of the i -th measurement of h and $\langle I(h) \rangle$ is the corresponding mean value of $I(h)$ for all I measurements.

b $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, where $|F_{\text{obs}}|$ and $|F_{\text{calc}}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes respectively

c R_{free} is the same as R_{cryst} but calculated with a 5% subset of all reflections that was never used in crystallographic refinement.

Table S2: Primers used in the preparation of *nprR* mutants

^a The restriction sites are underlined and the modified nucleotides are in red.

Table S3: Plasmids carrying the modified *nprR* gene and the intact *nprX* gene

References to SI

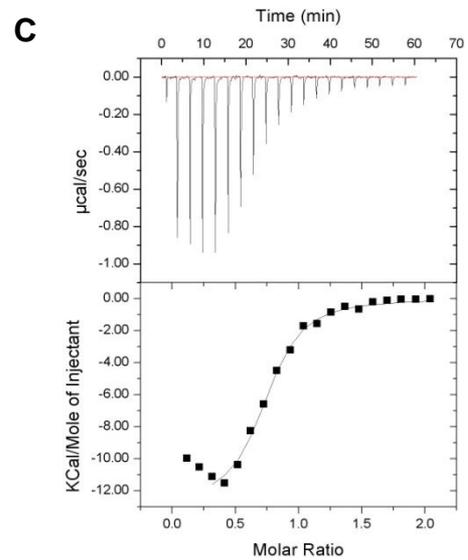
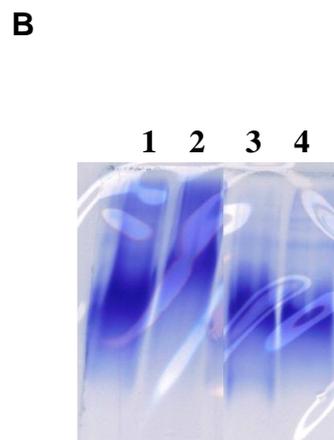
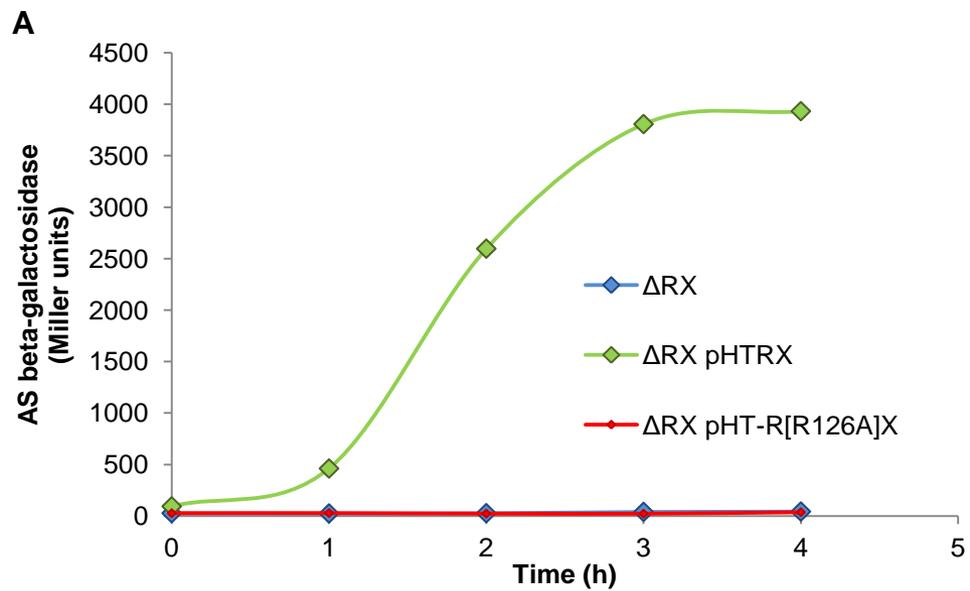
1. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.
2. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543-548.
3. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305-308.

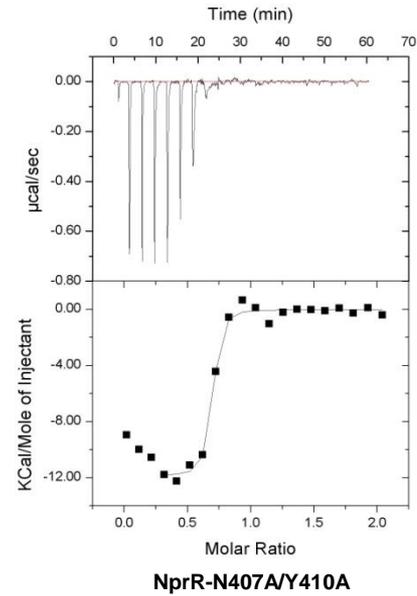
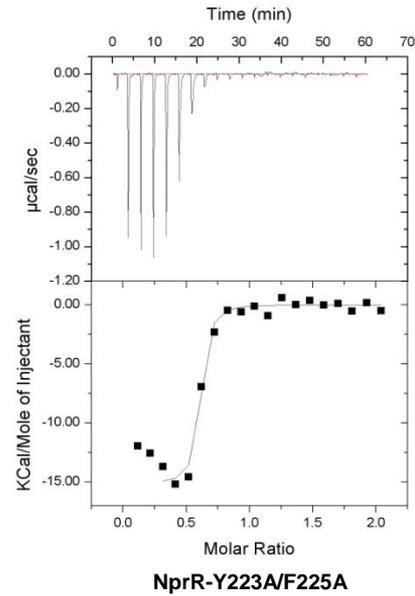
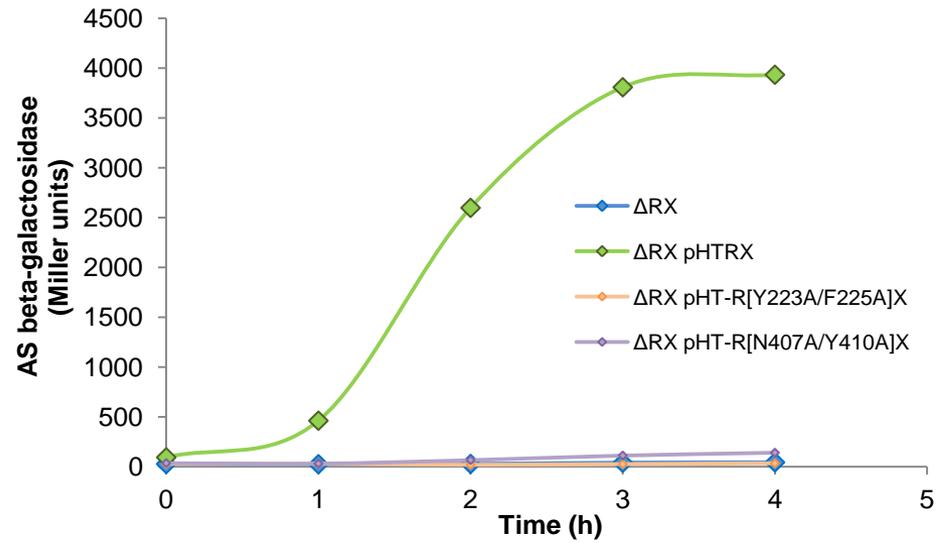
NprR-Bt407 RAPF_BACSU RAPH_BACSU ZQFC ZAXU 1 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110

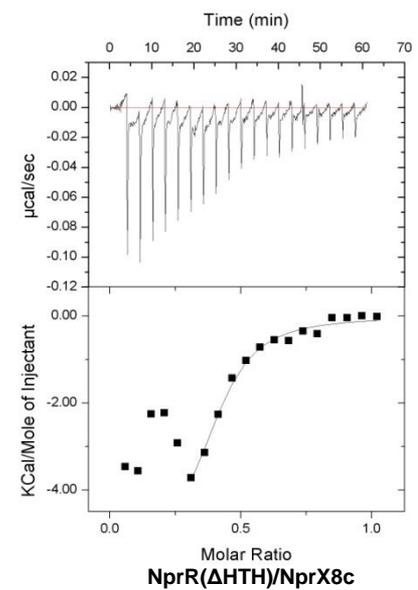
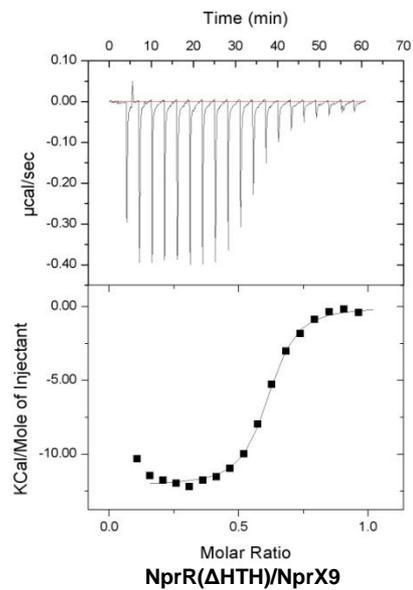
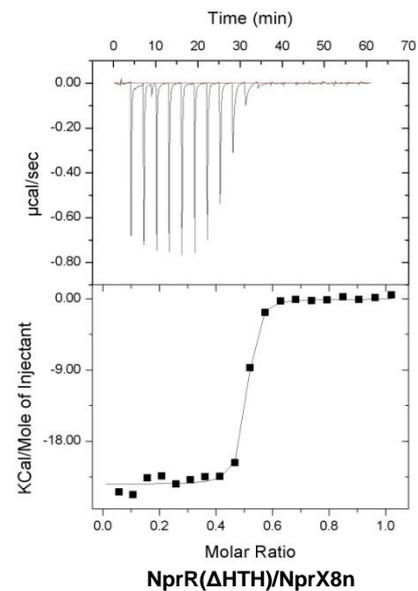
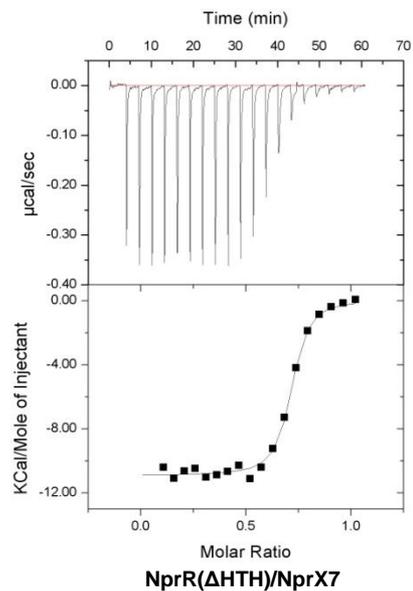
NprR-Bt407 RAPF_BACSU RAPH_BACSU ZQFC ZAXU 120 130 140 150 160 170 180 190 200

NprR-Bt407 RAPF_BACSU RAPH_BACSU ZQFC ZAXU 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

NprR-Bt407 RAPF_BACSU RAPH_BACSU ZQFC ZAXU 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420



A**B**



Plasmid name	Plasmid features
pHT-R[R126A]X	R126A substitution in <i>nprR</i> gene was introduced using primers npr11/npr12. PCR fragments amplified using primers npr11/R126A-R and R126A-F/npr12 from 407 chromosomal DNA were used as template. The DNA fragment containing the modified <i>nprR</i> gene and the <i>nprX</i> gene was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>XbaI</i> sites of pHT304.
pHT-R[Y223A/F225A]X	Tandem Y223A and F225A substitutions in <i>nprR</i> gene were introduced using primers npr11/npr12. PCR fragments amplified using primers npr11/Y223A/F225A-R and Y223A/F225A-F/npr12 from 407 chromosomal DNA were used as template. The DNA fragment containing the modified <i>nprR</i> gene and the <i>nprX</i> gene was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>XbaI</i> sites of pHT304.
pHT-R[N407A/Y410A]X	Tandem N407A and Y410A substitutions in <i>nprR</i> gene were introduced using primers npr11/npr12. PCR fragments amplified using primers npr11/N407A/Y410A-R and N407A/Y410A-F/npr12 from 407 chromosomal DNA were used as template. The DNA fragment containing the modified <i>nprR</i> gene and the <i>nprX</i> gene was inserted between the <i>EcoRI</i> and <i>XbaI</i> sites of pHT304.

Primer name	Sequence	Restriction site ^a
npr11	CCGGAATTCATAACCGTTCTCGAATGGAAGC	<i>EcoRI</i>
npr12	TGCTCTAGAGGAGATTATAAATTAAGTTCAACAG	<i>XbaI</i>
R126A-For	CACGTTATTTAATTATGAAAACGGATATTTCTGCACTCG	/
R126A-Rev	CGAGTGCAGAAATATCCGCTTTCATAATTAATAACGTG	/
Y223A/F225A-F	GAAGGATTCGTAGTGAAACTAAGCTAGAAACATAATTAATTGCC	/
Y223A/F225A-R	GGCAATTAATTATGTTTCTAGCCTTAGCTTCACTACGAAATCCTTC	/
N407A/Y410A-F	CGAGATTTGAAGAAAGTGCTCGATATGCTAGGTTAGTTATTGATT	/
N407A/Y410A-R	AATCAATAACTAACCTAGCATATCGAGCACTTCTTCAAATCTCG	/

Structural data	Parameters	SAD (SeMet)	NATIVE
Data processing	Space group	P1	P1
	Cell parameters a, b, c (Å)	121.11, 133.02, 138.52	122.24, 133.35, 137.5
	Cell angles α , β , γ (°)	108.34, 105.33, 103.24	108.25, 104.83, 103.83
	Resolution (Å)	45-3.5	50-3.1
	Observed reflections	715919	520.825
	Unique reflections	187722	132663
	Completeness (%)	96.2	97
	Mean [(I)/sd(I)]*	10.25 (2.2)	16.87 (1.95)
	R _{sym} (%) ^{*a}	16.3 (82.8)	8.8 (85.9)
Refinement statistics	R _{work} (%) ^b	19.84	20.01
	R _{free} (%) ^c	22.59	22.77
	Molecules/ua	12	12
	Ligands	NprX7: SKPDIVG	NprX8: SSKPDIVG

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

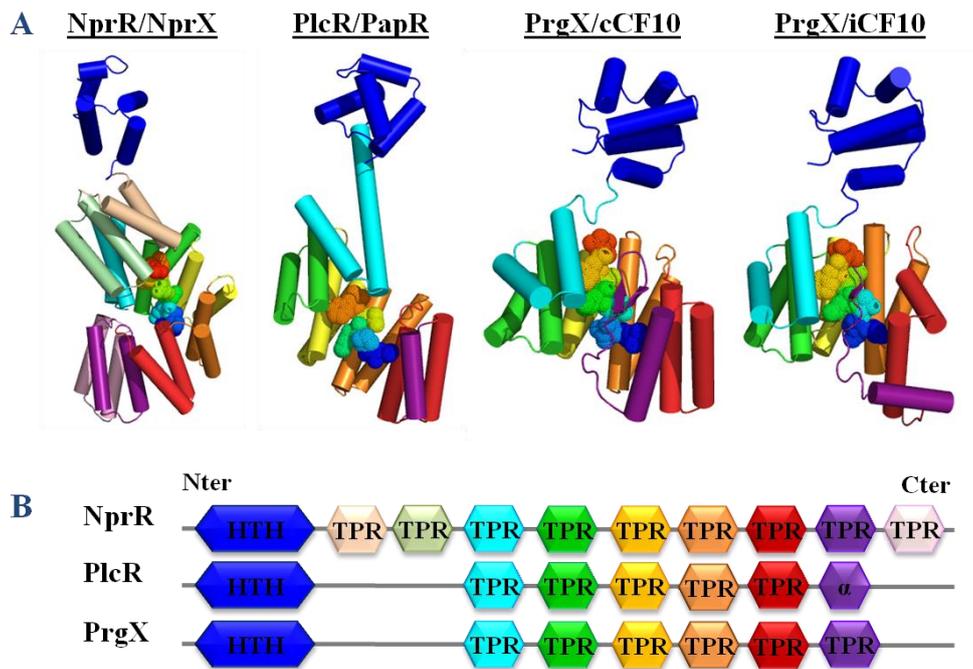


FIGURE 78: Un mode de fixation effecteur/peptide commun

A. Orientation des peptides. **B.** Alignement des domaines basé sur les séquences.

Les effecteurs NprR, PlcR et PrgX sont représentés en cartoon et colorés selon le code couleur présenté en **B**. Les peptides fixés sont représentés en dots et colorés en rainbow.

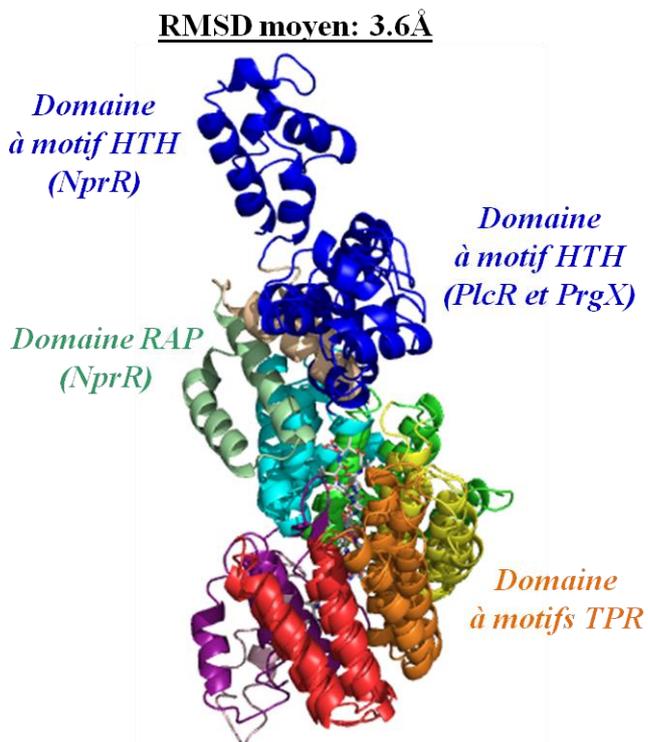


FIGURE 79: Superposition des complexes effecteur/peptide

Les effecteurs NprR, PlcR et PrgX sont représentés en cartoon et colorés selon le code couleur de la **FIGURE 76-B** ci-dessus. La superposition des motifs TPR coïncide avec l'alignement de la **FIGURE 78-B**.

NprR possède 2 rôles distincts dans la cellule bactérienne : un rôle d'inhibiteur de la sporulation et un rôle de facteur de transcription impliqué dans la virulence bactérienne. Cette dualité fonctionnelle est modulée par son peptide de signalisation NprX à travers un changement d'oligomérisation. Le switch moléculaire induit par la fixation du peptide consiste ainsi à faire basculer l'effecteur d'une conformation dimérique qui inhibe la sporulation à une conformation compléxée tétramérique qui régule l'expression d'une quarantaine de gènes impliqués dans le cycle infectieux de *Bt*.

A. La fonction facteur de transcription

1. Mode de fixation du peptide de signalisation

L'agencement répété des motifs TPR engendre une structure tridimensionnelle en superhélice qui présente une face convexe et une face concave. Le peptide NprX se fixe de manière antiparallèle, au cœur de la face concave du domaine TPR de NprR. Les liaisons hydrogène sont essentiellement faites avec le squelette du peptide. On retrouve ce mode de fixation chez les effecteurs RNPP PlcR (Declerck, Bouillaut et al. 2007) et PrgX (Shi, Brown et al. 2005) dont les structures ont été résolues en présence de peptide (**FIGURE 78-A**). Les alignements des séquences entières (**FIGURE 78-B** et **ANNEXE F**) ainsi que la superposition des structures compléxées effecteur/peptide (RMSD moyen : 3.6Å pour 143 Cα alignés, **FIGURE 79**) mettent en avant la conservation d'une Asparagine impliquée dans la fixation du squelette des peptides : Asn275 chez NprR, Asn201 chez PlcR et Asn196 chez PrgX. D'autres asparagines (Asn194 et Asn306 chez NprR, Asn159 et Asn163 chez PlcR et Asn158 et 161 chez PrgX) sont impliquées dans la fixation du peptide par les RNPP mais ces résidus ne sont pas à des positions conservées au sein de la famille. De plus, nous avons montré que chez NprR la mutation N275A induit une diminution drastique de l'affinité pour le peptide NprX, qui se traduit par une perte de son activité facteur de transcription. Cette Asn est également conservée dans les structures des Rap H et F. La question se pose donc de savoir si ce résidu conservé est une caractéristique commune à la famille RNPP et pourrait servir de critère d'identification pour de nouveaux membres comme potentiellement, le facteur de transcription Rgg1358.



FIGURE 80: Superposition des domaines TPR de NprR, PlcR, PrgX et PilF

Les chaînes sont représentées en cartoon et colorées en orange pour NprR, fuchsia pour PlcR, cyan pour PrgX et vert pour PilF. Les résidus Asparagine sont indiqués en sticks.

Cependant, il s'avère que la présence d'asparagines dans la poche de fixation est une caractéristique répandue chez les protéines à motifs TPR qui fixent des peptides (D'Andrea and Regan 2003). Pour exemple, la structure de PilF (code PDB : 2FI7), une protéine à motifs TPR impliquée dans la biosynthèse des pilis chez les bactéries à Gram négatif (Kim, Oh et al. 2006), dont la superposition avec les structures de NprR, PlcR et PrgX révèle la présence d'une Asn (N146) qui s'aligne avec l'Asn275 de NprR, Asn 201 de PlcR et Asn 196 de PrgX (**FIGURE 80**). L'Asn 146 de PilF appartient à un motif conservé (Asn110, Asn146 et Glu180) impliqué dans la fixation de peptide (Kim, Oh et al. 2006). Ce résidu Asparagine conservé pourrait toutefois, servir de repère pour prédire la poche de fixation des peptides dans les structures de RapH et RapF.

2. Mode de régulation transcriptionnelle

NprR ne présente une activité de facteur de transcription qu'en présence de son peptide de signalisation (Perchat, Dubois et al. 2011) et nous avons montré qu'en complexe avec NprX, NprR adopte une conformation tétramérique. Ce niveau d'oligomérisation a déjà été observé pour d'autres facteurs de transcription à domaine HTH, avec comme exemples : le répresseur Lac (Friedman, Fischmann et al. 1995), l'enzyme de réparation de l'ADN MutS de *E. coli* (Miguel, Pezza et al. 2007), l'effecteur QS TraR de *Streptomyces* (Kataoka, Tanaka et al. 2008), mais également l'effecteur RNPP PrgX (Shi, Brown et al. 2005). Le mode d'oligomérisation est différent d'un cas à l'autre mais la tétramérisation permet à ces facteurs de transcription de reconnaître simultanément deux sites sur l'ADN, et joue un rôle important *in vivo*. Ainsi, il a été démontré que PrgX peut interagir avec 2 sites, distants d'environ 70pb et ce avec des affinités différentes (Bae, Kozlowicz et al. 2002). Un mécanisme de régulation transcriptionnelle a été proposé dans lequel un premier dimère de PrgX se lie au site de plus haute affinité (palindrome entier). La tétramérisation de l'effecteur permet au deuxième dimère de se fixer au second site de moindre affinité (demi-palindrome) par coopérativité (Shi, Brown et al. 2005). Bien que la structure du complexe PrgX/ADN n'ait pas été déterminée, dans la structure de la forme Apo PrgX, les domaines HTH se trouvent dans une conformation compatible avec une fixation à l'ADN (voir **FIGURE 16-A**, p45).

Dans la structure du complexe NprR/NprX/ADN, on ne retrouve pas le mode de fixation caractéristique des protéines à motif HTH, comme nous l'avions proposé avec le modèle chimérique associant le complexe NprR Δ HTH/NprX au complexe Cro/ADN ([FIGURE 68](#), p 149). Cette structure a été obtenue avec un oligonucléotide de 23pb contenant la boîte -35 que les analyses transcriptomiques suggèrent comme étant le site de reconnaissance spécifique de NprR (Perchat, Dubois et al. 2011). Néanmoins les mesures d'ITC menées sur des oligonucléotides d'une vingtaine de paires de bases ne nous ont pas permis d'identifier plus précisément la séquence minimale d'interaction et il est probable que la structure cristalline obtenue corresponde à une interaction protéine/ADN aspécifique stabilisée par l'empilement cristallin. Les données de calorimétrie ont montré que la forme Apo NprR se fixe de manière non spécifique sur l'ADN. Il est donc probable, qu'en présence d'un fragment d'ADN ne contenant pas le site de fixation complet, le complexe NprR/NprX se fixe également de façon non spécifique. En effet, il semblerait que l'une des extrémités de l'oligonucléotide de 23 pb présent dans les cristaux puisse ne contenir qu'un demi-site de fixation mais la mauvaise résolution de la structure obtenue ne permet pas d'identifier la séquence ADN correspondante. De plus, plusieurs essais de co-cristallisation avec des oligonucléotides (à bouts francs ou collants) qui couvrent la région promotrice de *nprA* ont été réalisés sans toutefois obtenir de cristaux de complexes. Il faudra donc attendre une identification plus précise de la NprR-box et de nouveaux essais de co-cristallisation pour élucider le mode de reconnaissance spécifique de l'ADN par NprR. Ces résultats peuvent s'avérer difficiles à obtenir du fait de la structure tétramérique du complexe NprR/NprX qui suggère qu'il faudrait identifier deux sites et par analogie avec le système PrgX, on peut envisager un mécanisme de reconnaissance coopératif pouvant jouer un rôle essentiel dans la fixation.

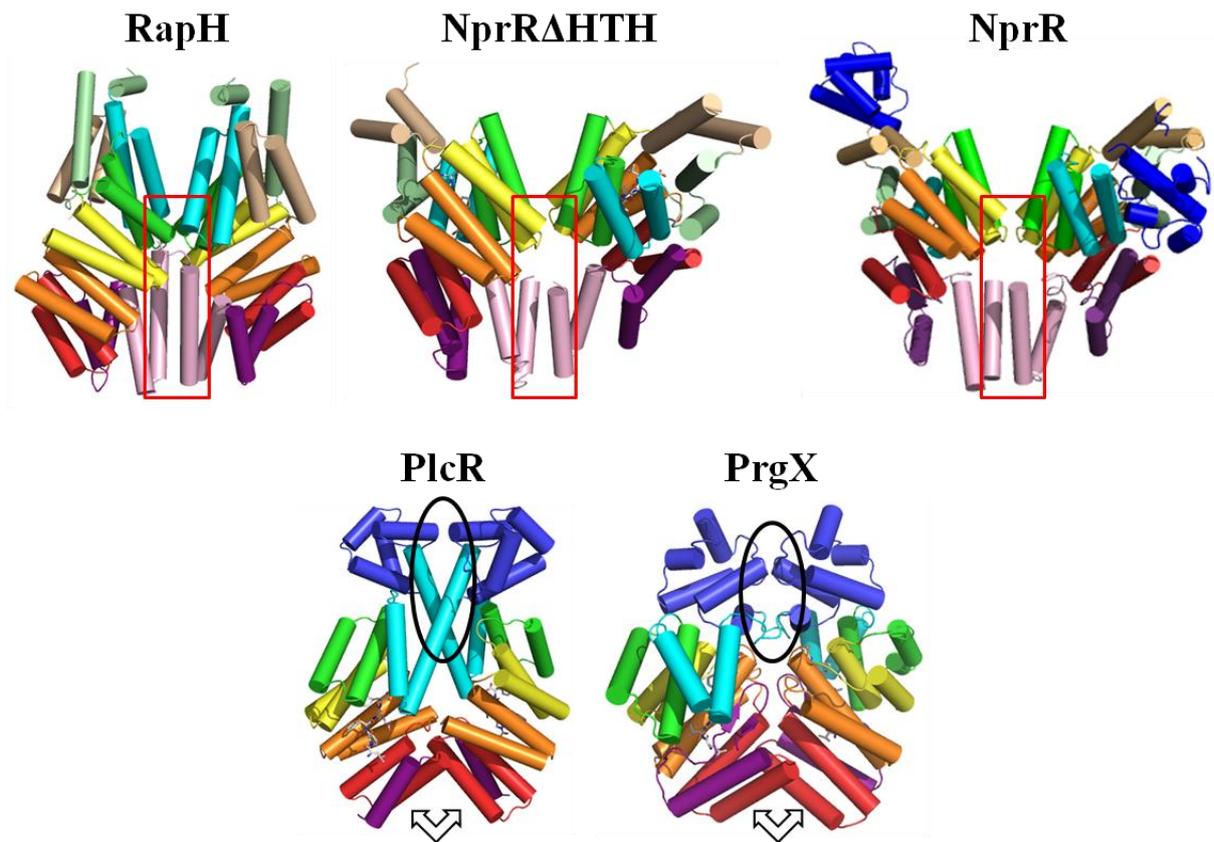


FIGURE 81: Les dimères rencontrés dans la famille RNPP

Les protomères sont représentés en cartoon (hélices cylindriques) et colorés selon le code couleur de la [FIGURE 78](#), p 166. Les principales zones de dimérisation qui diffèrent d'un type de dimère à l'autre sont encadrées en rouge chez RapH et NprR et encadrées en noir chez PlcR et PrgX.

B. La fonction Inhibiteur de la sporulation

Dans la structure tétramérique du complexe NprR/NprX on a pu observer 2 types d'interface de dimérisation que l'on a qualifié dimère-I et dimère-II. Bien que la structure cristallographique de la forme Apo de NprR n'ai pu être obtenue, l'étude structurale par SAXS ainsi que l'analyse par mutagenèse dirigée ont permis d'identifier le dimère-II comme étant la base de la conformation probable de Apo NprR Δ HTH.

1. Un mode de dimérisation commun aux Rap

La comparaison des conformations dimériques ainsi rencontrées dans les quatre membres caractérisés de la famille RNPP permet d'identifier 2 sous-familles (**FIGURE 81**). La surface de dimérisation des facteurs de transcription PlcR et PrgX met en jeu à la fois les régions Nter et Cter du domaine TPR. Dans le cas des protéines RapH et du dimère II de NprR Δ HTH, la dimérisation se fait essentiellement au niveau de la région Cter, et plus particulièrement *via* la dernière hélice qui interagit avec sa voisine sur toute sa longueur. On a vu dans la structure de la forme entière, que la présence des domaines HTH ne modifie pas cette zone de dimérisation et ne crée pas non plus de nouvelle surface d'oligomérisation. De plus, la perte de dimérisation, induite par la double mutation N407A/Y410A (dernière hélice du dernier TPR) a été observée tant pour la forme tronquée que la pour la forme entière NprR, démontrant ainsi que cette interface est bien conservée au sein du dimère Apo. Cependant, l'ampleur du changement de conformation induit par la fixation du peptide et menant au dimère-II capable de s'associer en tétramère demeure inconnue. La qualité des cristaux obtenus d'Apo NprR Δ HTH ne nous a pas permis d'en résoudre la structure. Bien que plusieurs essais d'optimisation aient été réalisés, toutes les techniques existantes n'ont pas été testées, on peut donc encore envisager d'améliorer les cristaux. La méthylation des Lysine de surface par exemple est une technique qui permet de diminuer l'entropie des longues chaînes latérales de ces résidus (Walter, Meier et al. 2006). De même, les kits de cristallisation dont on dispose au laboratoire n'ont pas tous été testés.

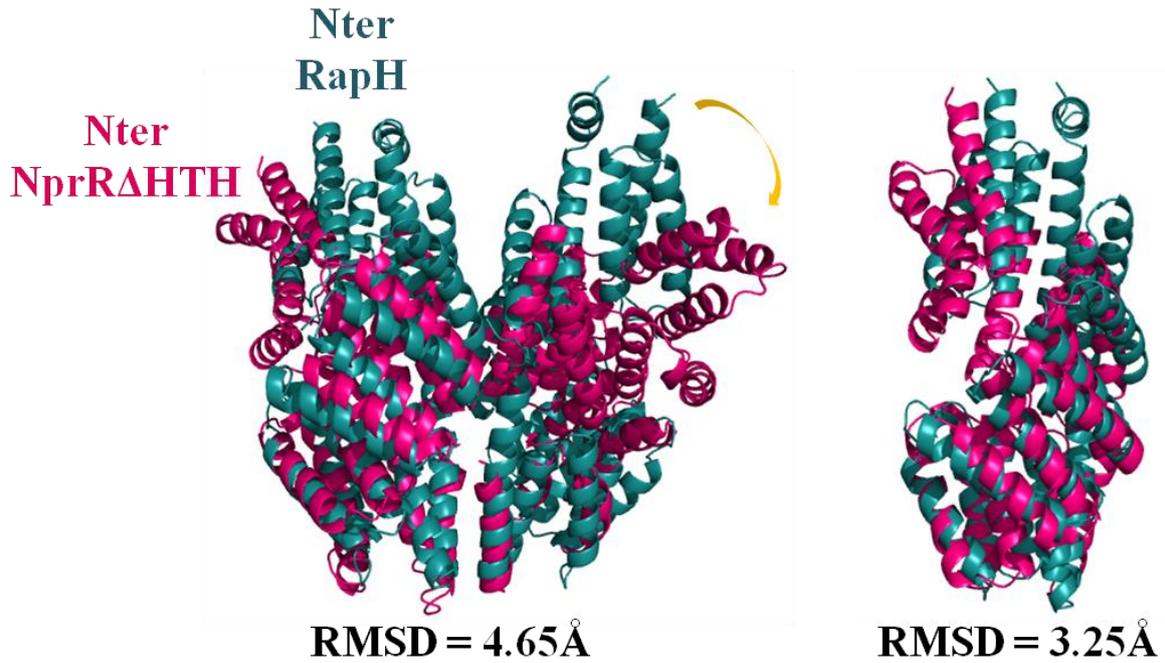


FIGURE 82: Superposition des structures RapH et NprRAHTH

A gauche, la superposition des dimères de RapH (en bleu) et de NprRAHTH (en rose) représentés en cartoon. A droite, la superposition par monomère.

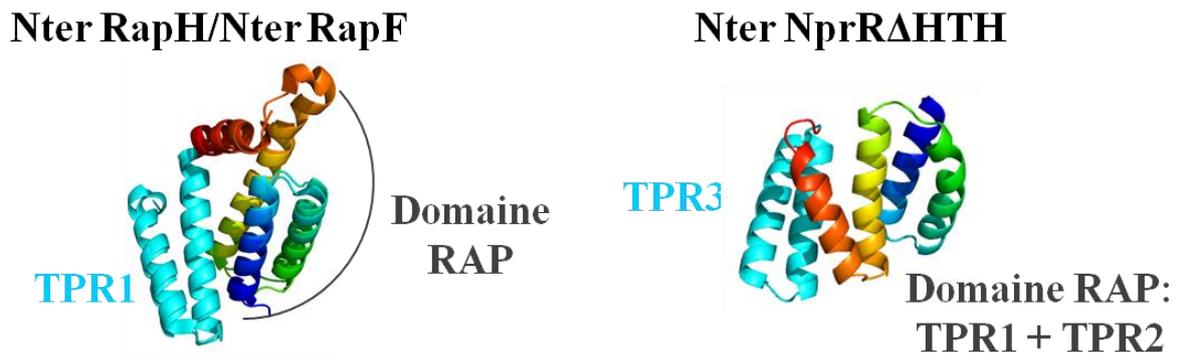


FIGURE 83: Comparaison des domaines RAP de NprR, RapH et RapF

Les structures sont représentées en cartoon, coloré en rainbow pour les domaines RAP et en cyan pour le premier motif TPR qui suit. A droite la superposition des domaines RAP de RapH et RapF, à gauche le domaine RAP de NprR

2. Le domaine RAP

Le dimère-II de Npr Δ HTH et le dimère de RapH se superposent avec un RMSD global de 4.35Å sur 349 C α alignés, et un RMSD de 3.25Å sur 218 C α pour la superposition des monomères (**FIGURE 82**). Ces fortes valeurs sont essentiellement dues à la différence d'orientation des régions Nter correspondant au domaine RAP et au fait que les structures de Npr Δ HTH et des protéines Rap sont dans des conformations différentes. Les structures de RapH (Parashar, Mirouze et al. 2011) et RapF (Baker and Neiditch 2011) ont été résolues en absence de peptide et en complexe avec leurs substrats respectifs Spo0F et ComAc. Les deux protéines Rap se trouvent donc dans la conformation inhibiteur de la sporulation (RapH) et inhibiteur de la compétence (RapF). Leur domaine RAP est directement impliqué dans l'interaction avec les protéines substrats et conserve la même architecture (**FIGURE 83**). Il forme un faisceau de 3 hélices α antiparallèles suivies d'un linker flexible et d'une petite hélice α alors que dans la structure de Npr Δ HTH, il correspond aux deux premiers motifs TPR, appelés TPR1 et TPR2 (**FIGURE 83**). La structure de Npr Δ HTH a quant à elle été obtenue en complexe avec son peptide de signalisation NprX, c'est à dire dans sa conformation tétramérique correspondant à son activité facteur de transcription.



FIGURE 84: Alignement des séquences des domaines RAP de NprR et des Rap

Les séquences ont été alignées par ClustalW et mises en forme par ESPrInt. Tous les résidus conservés sont représentés sur fond rouge parmi lesquels les résidus Trp (W), Leu (L) et Arginine (R). La numérotation utilisée correspond à la séquence de NprR-Bt407. Un alignement complet est présenté en

ANNEXE I.

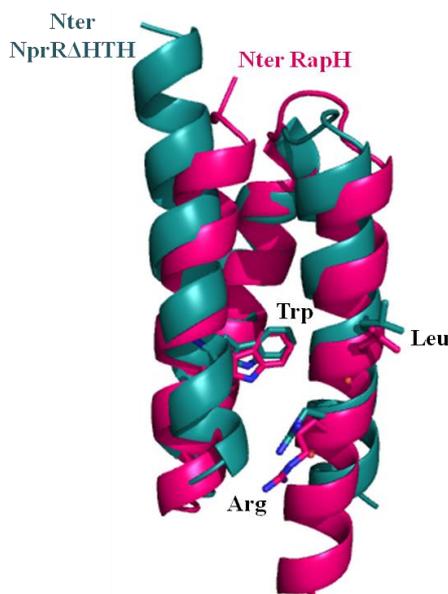


FIGURE 85: Superposition structurale des domaines RAP de NprR et RapH

Les trois premières hélices composant le domaine de NprR (bleu) et RapH (rose) sont représentées en cartoon. Les résidus conservés en séquence : Trp (W), Leu (L) et Arg (R) sont représentés en sticks

Les alignements de séquences entre les différents groupes de NprR et les Rap montrent que le domaine RAP correspond à la région la mieux conservée (**FIGURE 84**). La superposition des 3 premières hélices α de RapH sur celles de NprR Δ HTH présente un RMSD moyen de 2.75Å sur les ^{43}Ca alignés (**FIGURE 85**). Les résidus conservés en séquence W, L et R le sont également dans les structures, suggérant que le faisceau de 3 hélices et la région linker des protéines Rap pourraient correspondre aux deux motifs TPR de NprR, avec le TPR2 partiellement déstructuré. Cette déstructuration du TPR2 pourrait être induite par l'interaction des Rap avec leur protéines cibles Spo0F et ComA Elle pourrait également être due à l'absence de peptide et pourrait donc également se produire dans le dimère Apo de NprR.

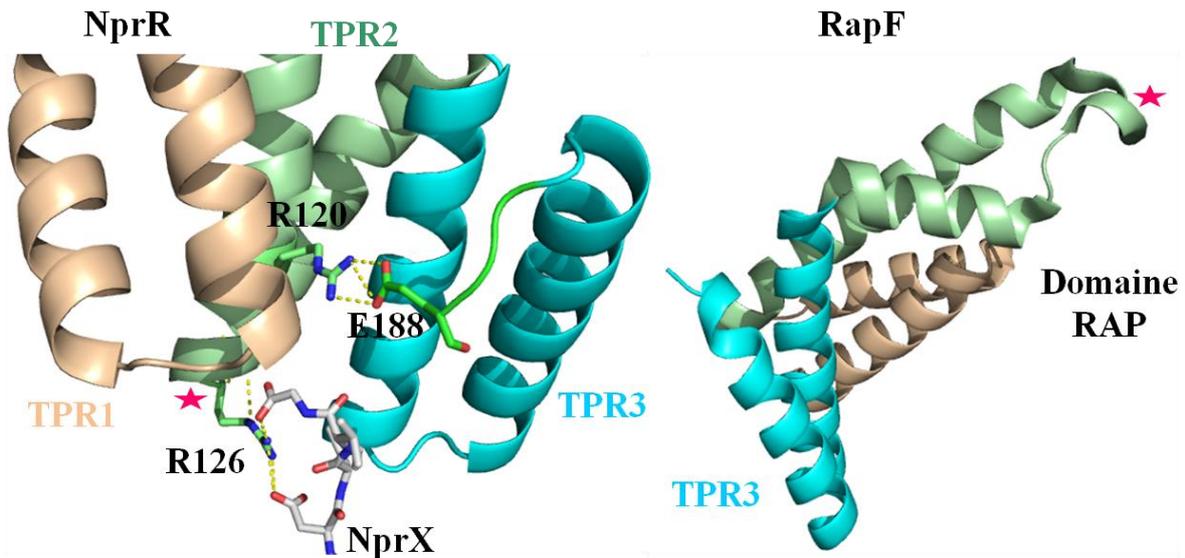


FIGURE 86: Conformation du domaine RAP dans NprR et RapF

Les chaînes de protéine sont représentées en cartoon et colorées selon le code couleur des TPR de NprR (à gauche). Le peptide NprX est représenté en sticks et coloré par atomes. Le résidu R126 qui interagit avec le Cter du peptide est également représenté en sticks, tout comme les résidus en interaction R120 et E188. L'étoile rose dans RapF désigne la région qui correspond à la boucle du TPR2 de NprR également désigné par une étoile rose.

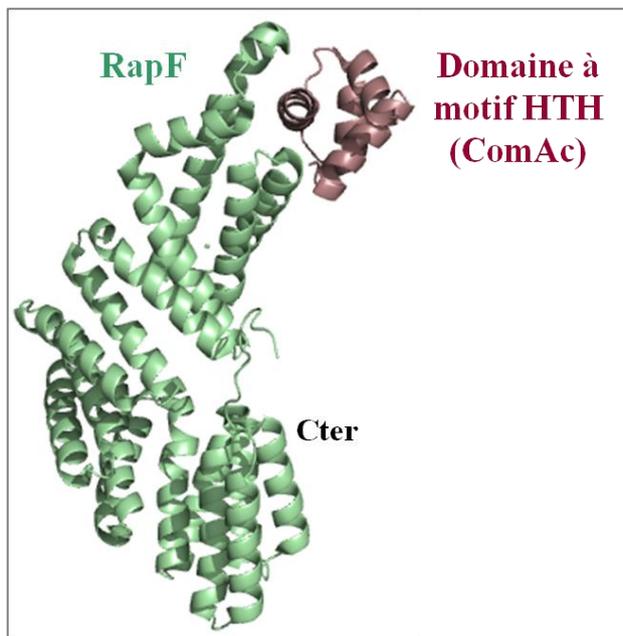


FIGURE 87: Complexe RapF/ComAc

Le complexe est représenté en cartoon, RapF est coloré en vert et interagit avec ComAc (en rose) au niveau de son domaine RAP.

L'Arginine 126 qui interagit spécifiquement avec l'Aspartate et le carboxylate Cter du peptide NprX dans le complexe NprR/NprX se trouve sur la boucle du TPR2, enfouie dans le cœur de la protéine. La boucle correspondante dans les Rap se trouve quant à elle, exposée au solvant (**FIGURE 86**). Ceci suggère que la perte de cette interaction pourrait être à l'origine du changement conformationnel du domaine RAP. On pourrait donc envisager un mécanisme de régulation commun, selon lequel en absence de peptide NprR adopterait une conformation dimérique similaire à celle observée pour les Rap avec déstructuration du TPR2 en présence du partenaire ciblé par son activité inhibiteur de la sporulation. Il a d'ailleurs été émis l'hypothèse par Melinda D. Baker et al que le complexe entre RapF et le domaine HTH de ComAc pourrait s'apparenter à la structure Apo de NprR (**FIGURE 87**) (Baker and Neiditch 2011). La fixation du peptide induirait alors une restructuration du motif TPR2 qui se retrouve en partie enfoui dans le cœur de la protéine. Chez les Rap, ce changement de conformation empêcherait la fixation des protéines substrats et expliquerait donc l'inhibition par les Phr. Ce modèle est en accord avec d'une part la fonction inhibiteur de la sporulation (similaire à celle des RapA, B, E et H) portée par la forme Apo de NprR et d'autre part la ressemblance entre les peptides Phr des Rap et NprX.

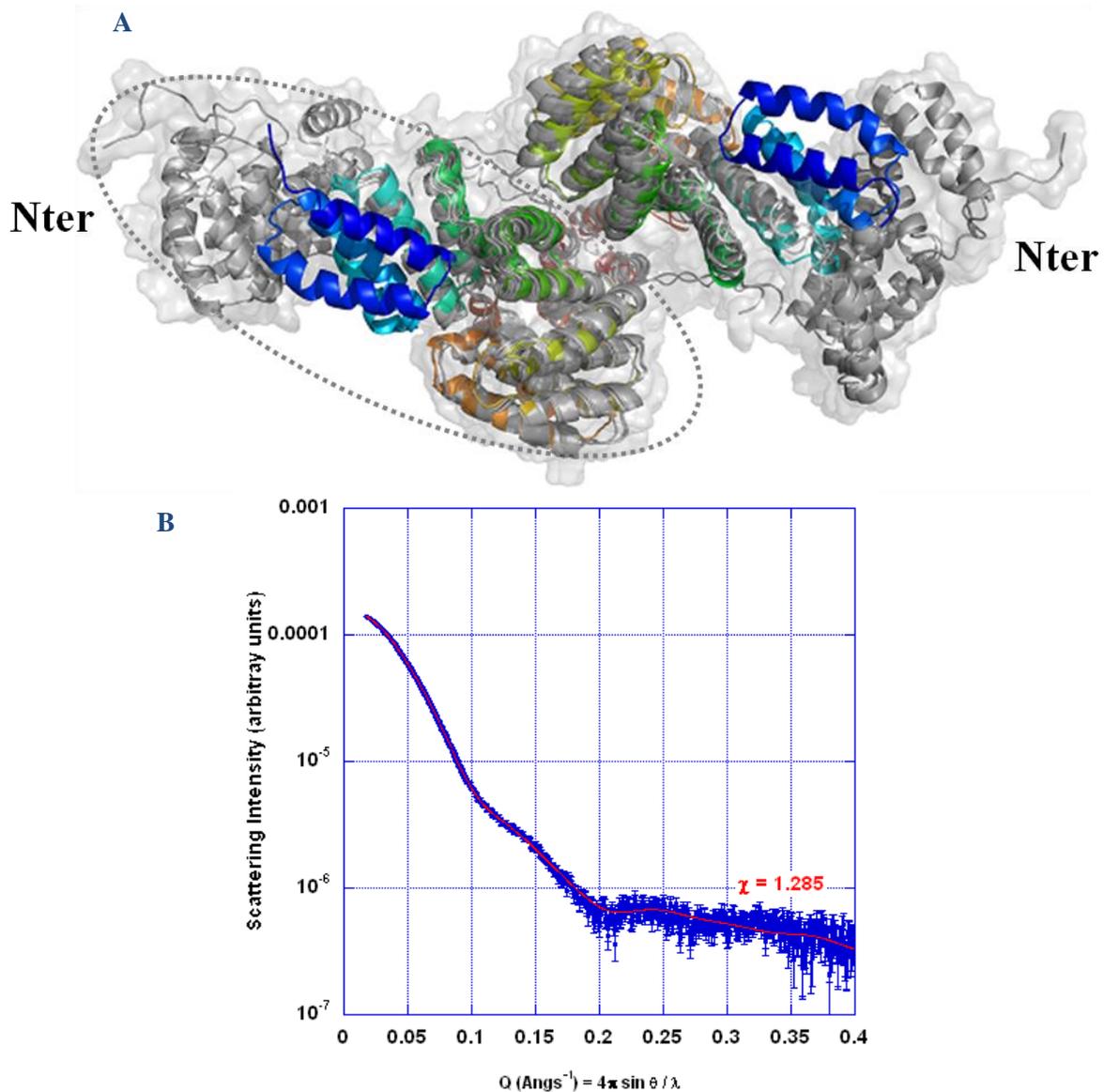


FIGURE 88: Modélisation du dimère Apo NprRAHTH à partir des données de SAXS

A. *Modèle du dimère Apo NprRAHTH* : Le dimère-II issu de la structure cristallographique du complexe NprRAHTH/NprX est représenté en cartoon et coloré en rainbow. Les 3 meilleurs modèles de dimères obtenus par modélisation après ajout des extensions N- et C-terminales sont superposés en cartoon et en surface transparente, coloré en gris. Les extrémités Nter du modèle sont indiquées.

B. *Données de SAXS* : la courbe SAXS expérimentale (en bleu) superposée à la courbe calculée (en rouge) à partir d'un des modèles présentés en A.

L'Arginine 126 dans NprR n'est pas conservé chez les Rap et la région linker présente une insertion d'une dizaine de résidus qui pourrait impliquer un changement conformationnel légèrement différent de celui de NprR. L'hypothèse selon laquelle la boucle du TPR2 de NprR serait l'endroit où a lieu le changement de conformation est supporté par les données SAXS de NprR Δ HTH. En effet, lorsqu'on ajoute à la structure cristalline du dimère-II les extrémités de chaîne flexibles (une dizaine de résidus en Nter et en Cter non visible dans la densité électronique) pour compléter le modèle, la corrélation avec les données expérimentales est perdue. En introduisant de la flexibilité au niveau du TPR2, il a été possible d'obtenir par modélisation, une conformation compatible avec les données SAXS (**FIGURE 88-A et B**). La faible résolution des données SAXS ne permet néanmoins pas de conclure que ce modèle corresponde effectivement à la conformation Apo de NprR. Il faudra attendre la résolution d'une structure cristalline de complexe Rap/Phr pour vérifier si l'on retrouve bien les TPR1 et TPR2 structurés comme dans le complexe NprR Δ HTH/NprX. De même, la détermination de la structure de NprR en complexe avec le partenaire qu'il cible en tant qu'inhibiteur de la sporulation permettra de vérifier la flexibilité conformationnelle du domaine RAP. Cependant, la recherche d'interactants par des techniques de pull down et de pontage *in vivo* a jusqu'à présent été infructueuse.

C. La famille RNPP : évolution et classification

Le domaine Rap n'est pas présent chez les facteurs de transcription PlcR et PrgX. La régulation de leur activité par la fixation du peptide de signalisation passe donc par un mécanisme moléculaire différent. Dans le cas de PrgX/cCF10, le mécanisme passe par une restructuration du dernier motif TPR en brins β qui forment un feuillet avec le peptide. Ainsi, le dernier motif TPR utilisé dans l'interface de tétramérisation de PrgX est détourné par le peptide pour rompre le tétramère, libérer le site de reconnaissance à l'ADN de moindre affinité (demi-palindrome) et lever ainsi la répression (Shi, Brown et al. 2005). En ce qui concerne PlcR, le mécanisme moléculaire est moins clair, toutefois, des analyses par mutagenèse dirigée ont également montré l'importance de la région Cter (notamment l'hélice de coiffe) dans l'activation par le peptide (Bouillaut, Perchat et al. 2008). Il semble donc que NprR soit plus proche des Rap que de PlcR et PrgX. Les TPR sont des motifs versatiles comme le montre PrgX dont la séquence ne laissait prédire la présence de ces motifs révélés par la structure et dont l'intégrité structurale peut être modulée par la fixation de ligand. En prenant ces informations en considération en plus du fait que le peptide NprX est apparenté aux peptides Phr, et sachant que NprR présente une fonction inhibiteur de la sporulation à la manière des Rap, l'analyse structurale de NprR conforte la théorie évolutive émise par nos collaborateurs (Declerck, Bouillaut et al. 2007) : NprR semble être un intermédiaire entre les protéines Rap et les facteurs de transcription spécialisés PlcR et PrgX.

La découverte de nouveaux systèmes quorum sensing directe, tels que les systèmes type Rgg, pose la question quant à leur appartenance à la famille RNPP initialement définie par les protéines Rap, NprR, PlcR et PrgX. Les membres de cette famille sont des protéines à motifs TPR qui sont régulés par leurs peptides de signalisation réimportés par des systèmes Opp (Declerck, Bouillaut et al. 2007). La caractérisation structurale de ces systèmes quorum sensing a permis de mettre en évidence un mode de fixation des peptides de signalisation commun, mais des mécanismes de régulation différents d'un système à l'autre. Les structures des 4 effecteurs ont été distinguées selon 2 modes de dimérisation : les Rap et NprR d'un côté et PlcR et PrgX de l'autre. Si on s'intéresse à la nature des peptides de signalisation, il est possible de classer ces systèmes en 3 groupes : les peptides type Phr (Rap et NprR),

les peptides type PapR (PlcR) et les peptides hydrophobes (PrgX). Au groupe des systèmes utilisant des peptides de signalisation hydrophobes pourraient s'ajouter les systèmes type Rgg, cependant, alors que les peptides de la famille RNPP varie de 5 à 7aa, SHP1358 est long de 9aa et ComS de 11aa. Par ailleurs ces nouveaux effecteurs présentent des domaines HTH de type Cro (PROSITE) comme NprR, PlcR et PrgX mais le reste des séquences n'indique pas la présence de motifs TPR. Ce cas a déjà été observé pour PrgX mais les considérations abordées ne permettent pas d'apparenter clairement les systèmes type Rgg à la famille RNPP. Il est donc nécessaire de réaliser leur étude structurale afin d'enrichir encore les connaissances sur les systèmes de quorum sensing directe.

D. Reconnaissance et spécificité du système NprR/NprX

1. Export et maturation du peptide NprX

Nos collaborateurs ont démontré que NprX est un peptide de signalisation qui est exporté puis réimporté à l'intérieur de la cellule bactérienne. Ils ont ainsi mis en évidence une forme minimale active de 7aa (SKPDIVG) pour laquelle nous avons mesuré une interaction de forte affinité avec l'effecteur NprR, par microcalorimétrie isotherme (ITC). La caractérisation des interactions entre NprR et différentes formes de NprX ont permis de mettre en évidence une certaine contrainte quant à la longueur du peptide. En effet, l'analyse de la poche de fixation démontre que le peptide ne peut être allongé en Cter (après la Gly₇) au risque de perdre en affinité comme on a pu l'observer avec NprX8c (SKPDIVGQ). En revanche l'allongement en Nter est possible tout en conservant une forte affinité. On remarque en effet que le peptide NprX8n (SSKPDIVG) présente une meilleure affinité que la forme minimale active NprX7 (SKPDIVG) et pourrait peut être correspondre à la forme physiologique du peptide. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait caractériser le processus de maturation du peptide.

Chez les bactéries à gram positif, la voie d'exportation la plus importante est représentée par le système Sec (Tjalsma, Bolhuis et al. 2000). Les précurseurs (pré-pro-peptides) sécrétés par ce système présentent une séquence signal tripartite en Nter (Yamane, Bunai et al. 2004) composée de :

- Un domaine Nter basique (domaine N)
- Un domaine central hydrophobe (domaine H)
- Un domaine Cter polaire contenant le site de clivage pour libérer le pro-peptide (domaine C)

La séquence signal prédite pour NprX, par le programme SignalP (Nielsen, Engelbrecht et al. 1997), indique un profil semblable à trois domaines, présenté dans la **FIGURE 89** ci-contre. Après leur translocation, les protéines exportées sont pris en charge par des chaperonnes telles que HtrA, qui est associée à la membrane et qui présente également une activité protéasique (Buist, Ridder et al. 2006). Chez *B. anthracis*, il a récemment été montré qu'une souche mutante $\Delta htrA$ ne sécrétait plus la métalloprotéase NprA (Chitlaru, Zaide et al. 2011).

Cependant, l'absence de NprA dans le milieu extracellulaire n'est pas due à un défaut de sécrétion mais à un défaut d'expression du gène *nprA* (Chitlaru, Zaide et al. 2011), or nos collaborateurs ont démontré que le système NprR/NprX contrôle directement l'expression de ce dernier (Perchat, Dubois et al. 2011). Ainsi, il est possible que HtrA soit impliquée dans la maturation de NprX. Pour vérifier cette hypothèse, nos collaborateurs envisagent d'abord de tester la délétion du gène *htrA* dans la souche *Bt* 407 pour confirmer le rôle de la chaperonne/protéase. Si c'est le cas, il faudra ensuite déterminer le ou les sites de clivages du pro-peptide de NprX.

2. Phérogroupe et activation croisée

Une étude phylogénétique du système NprR/NprX a permis à nos collaborateurs de réaliser une classification en 7 groupes, NprR/NprX-I à NprR/NprX-VII. Ils ont alors testé la spécificité de ces systèmes par des tests de complémentation sur la souche mutante *Bt* 407 $\Delta nprX$, n'exprimant que NprR du groupe I, en utilisant des heptapeptides synthétiques des différents groupes. Ils ont ainsi démontré que les couples NprR/NprX étaient bien groupe-spécifique (NprX-III, IV, V, VI et VII n'activent pas NprR-I) avec toutefois des possibilités d'activation croisée (NprX-II active NprR-I). Pour approfondir cette question de spécificité, nous avons caractérisé l'interaction entre NprR-I et les peptides des groupes II à VII, par des mesures de microcalorimétrie isotherme. Il en a résulté que NprR-I fixe tous les peptides avec des affinités variables : une forte affinité pour les peptides des groupes II et III, comparables avec celle observée pour NprX-I ($K_d = 80$ à 250 nM) et une plus faible affinité pour ceux des groupes IV à VII ($K_d = 3$ à 6 μ M). Des effets d'encombrement stérique peuvent expliquer la moindre affinité et par conséquent l'inactivité des peptides NprX-IV à VII (SRPDVLT et WKPDTLG). Cependant, l'inactivité du peptide NprX-III (SNPDIYG) est plus difficile à comprendre. La substitution du résidu V dans NprX-I (SKPDIYG) par le résidu Y étant également présente dans le peptide actif NprX-II (SKPDTYG), il semblerait que soit la substitution du résidu K par le résidu N qui rend NprX-III incapable de faire basculer NprR-I de dimère à tétramère, comme on a pu l'observer dans les expériences de gels natifs. Dans la structure du complexe NprR-I/NprX-I, le résidu K du peptide est en interaction hydrophobe avec le résidu H201 de l'effecteur, on pourrait donc envisager que la perte de cette interaction dans le complexe NprR-I/NprX-III soit à l'origine du défaut de switch.

Cependant, l'analyse des séquences des différents groupes de NprR montre que cette Histidine 201 est conservée au sein du groupe III (ANNEXE E). L'Asparagine étant un plus petit résidu que la Lysine, elle peut s'accommoder plus librement dans la poche de fixation et pour comprendre la subtilité de ces jeux d'interaction il faudrait résoudre la structure des 2 complexes NprR-I/NprX-III et NprR-III/NprX-III. Ainsi, j'ai récemment initié les essais de cristallisation du complexe inactif et obtenu plusieurs cristaux qui n'ont cependant diffracté qu'à très basse résolution ($\approx 20\text{\AA}$) et les conditions doivent encore être optimisées.

En tant que peptide inactif qui se fixe avec une aussi bonne affinité sur NprR-I que NprX-I, NprX-III peut être impliqué dans un phénomène de quorum quenching du système NprR-I/NprX-I. Le quorum quenching représente tous les mécanismes pouvant interférer avec la signalisation quorum sensing comme la dégradation des phéromones, ou encore des mécanismes de compétition comme cela a pu être abordé en introduction et illustré avec le système Agr chez *S. aureus* (Lyon, Wright et al. 2002). Par analogie, on peut envisager pour le système NprR/NprX une compétition entre les souches bactériennes *Bacillus cereus* du groupe I et celles du groupe III. En s'inspirant du mécanisme d'inhibition de NprR-I par NprX-III, il serait possible de concevoir des agents antimicrobiens qui auront l'avantage de ne pas interférer directement avec le cycle cellulaire des bactéries et donc de ne pas favoriser leur capacité de résistance. *Bacillus cereus* regroupe des bactéries sporulantes opportunistes que l'on retrouve dans de très nombreux environnements comme les sols mais aussi dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires où elles contaminent les chaînes de production (Tauveron, Slomianny et al. 2006) (Stenfors Arnesen, Fagerlund et al. 2008). Ces bactéries sont capables d'adhérer fortement à des surfaces comme l'acier inoxydable (par la formation de biofilms) et de produire des spores qui résistent aux fortes températures. Chez l'homme, *Bacillus cereus* est connu pour causer des intoxications alimentaires mais est également responsable de nombreuses autres infections pouvant engendrer la mort (Bottone 2010). Il est donc important d'étudier ces systèmes quorum sensing afin de permettre le développement d'une nouvelle génération d'antimicrobien contre ces bactéries pathogènes.

V. CONCLUSION

CONCLUSION

Ce projet d'étude a été initié à mon arrivée au laboratoire et peu d'informations étaient alors connues sur le système quorum sensing NprR/NprX. Les principaux objectifs étaient d'expliquer d'une part, la fonction inhibiteur de la sporulation de NprR et d'autre part, la fonctionnalité du régulons contrôlé par l'activité transcriptionnelle de NprR/NprX.

L'étude structurale que j'ai menée, nous a permis de mieux comprendre la régulation fonctionnelle de NprR par son peptide signal NprX. J'ai démontré par des expériences en solution que Apo NprR existe majoritairement sous forme dimérique et que la fixation du peptide entraîne sa tétramérisation, lui permettant alors d'interagir spécifiquement avec des régions cibles de l'ADN pour induire l'expression du régulons

La structure cristallographique de la forme tétramérique suggère une double fixation à l'ADN. Cependant, la séquence consensus (ou NprR-box) n'a pas été identifiée et seule la structure d'un complexe NprR/NprX/ADN non spécifique a pu être résolue. Les recherches se poursuivent pour une meilleure description de la fonction facteur de transcription.

La forme Apo NprR n'a donné que des cristaux de trop mauvaise qualité pour résoudre la structure cristalline de cette conformation. Des expériences de SAXS en solution, associées à des analyses par mutagenèse dirigée, m'ont cependant permis de proposer un modèle dimérique de la forme Apo NprR. Le mode de dimérisation de ce dernier ressemble à celui des protéines Rap.

La recherche de protéines ciblées par l'activité inhibiteur de la sporulation de NprR est également en cours d'investigation. La comparaison avec les structures de RapH et RapF laisse supposer un mécanisme commun par changement de conformation au niveau des domaines RAP. Cette hypothèse doit encore être confirmée par l'étude structurale des complexes NprR/Partenaire et Rap/Phr.

Pris ensemble, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de mieux comprendre le switch moléculaire induit par le peptide et de mieux caractériser la famille RNPP.

VI. ANNEXES

ANNEXE A

Entrée UniProtKB/TrEMBL NprR : C3CDX3

Names and origin

Protein names	<i>Submitted name:</i> Helix-turn-helix domain protein EMBL EEM30614.1
Gene names	ORF Names: bthur0002_5080 EMBL EEM30614.1
Organism	Bacillus thuringiensis
Taxonomic identifier	1428 [NCBI]
Taxonomic lineage	Bacteria › Firmicutes › Bacillales › Bacillaceae › Bacillus › Bacillus cereus group

Protein attributes

Sequence length	423 AA.
Sequence status	Complete.
Protein existence	Predicted

General annotation (Comments)

Caution	The sequence shown here is derived from an EMBL/GenBank/DDBJ whole genome shotgun (WGS) entry which is preliminary data.
----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ontologies

Gene Ontology (GO)

Molecular function	sequence-specific DNA binding Inferred from electronic annotation. Source: InterPro
Complete GO annotation...	

Sequences

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
----------	--------	-----------	-------

<input type="checkbox"/> C3CDX3 [UniParc].	FASTA	423	50,242	Blast <input type="text"/>
Last modified June 16, 2009. Version 1.				go
Checksum: 0613AD930CE04007				

Domaine
HTH

NprRAHTH (M)

10	20	30	40	50	60
MQQTLEKIGK	QVFYKRLQQK	MTQEELCQGI	CSVSYLSKIE	NGKIEASEEI	LQLLCTRLEI
70	80	90	100	110	120
AVTDLRDVEE	DVKGKLDLWL	NALVHLDKQQ	VERIYEELQG	EMKHVLDLFEI	INYYKLLYTR
130	140	150	160	170	180
YLIMKRDISA	LEEELDKLKK	VYKKYSPFQK	LLYMYGRGLL	CCLQYRWKDG	LDYLLKTEVM
190	200	210	220	230	240
AKEQGYHETG	LYYNIALAYT	HLDIHHLAIH	FVNMALEGFR	SEYKFRNIIN	CQILIAVSYT
250	260	270	280	290	300
EKGQYEEALK	MYESILREAT	SFADKDVLLA	ITLSNMGSIY	YKKGKYQQAQ	KYYLDSLQLQ
310	320	330	340	350	360
KQIDLNYLDT	IYEMALVCIK	LEELEEARTL	IDKGIDAAKQ	EERFNAKLYL	LLMLRYKYFE
370	380	390	400	410	420
EAKDYKAFLE	NEAIPLYKSA	GNKIELKKVY	VELAEHFSSL	SRFEESNRYY	RLVIDLMNDN
KEE					

« Hide

ANNEXE B

Compositions des milieux de cultures

Milieu Luria-Bertani (LB) pour 1 litre :

10g NaCl

10g Tryptone

5g extrait de levure

Milieu minimum M9 pour 1 litre :

6g Na₂HPO₄

3g KH₂PO₄

0.5g NaCl

1g NH₄Cl

10g Glucose

2mM final MgSO₄

100μM final CaCl₂

100mg Lysine

100mg Thréonine

100mg Phénylalanine

50mg Leucine

50mg Isoleucine

50mg Valine

50mg Méthionine ou Séléno-Méthionine

ANNEXE C

ProtParam

User-provided sequence: NprR-(6 HisTag)

```
      10      20      30      40      50      60
MQQTLEKIGK QVFKRLQOK MTQEELCQGI CSVSYLSKIE NGKIEASEEI LQLLCTRLEI

      70      80      90     100     110     120
AVTDLRDVEE DVKGLDEWL NALVHLDKQQ VERIYEELQG EMKHVLD FEI INYYKLLYTR

     130     140     150     160     170     180
YLIMKRDISA LEEELDKLKK VYKKYSPFQK LLYMYGRGLL CCLQYRWKDG LDYLLKTEVM

     190     200     210     220     230     240
AKEQGYHETG LYYNIALAYT HLDIHHLAIH FVNMALEGFR SEYKFRNIIN CQILIAVSYT

     250     260     270     280     290     300
EKGQYEEALK MYESILREAT SFADKDVLLA ITLSNMGSIY YKKGKYQQA KYYLDSLQLQ

     310     320     330     340     350     360
KQIDLNYLDT IYEMALVCIK LEELEEARTL IDKGIDAAKQ EERFNAKLYL LMLRYKYFE

     370     380     390     400     410     420
EAKDYKAFLE NEAIPLYKSA GNKIELKKVY VELA EHFSSL SRFEESNRY Y RLVIDLMNDN

     430
KEERSHHHHH H
```

Number of amino acids: 431

Molecular weight: 51308.2

Theoretical pI: 6.11

Amino acid composition:

Ala (A)	25	5.8%
Arg (R)	18	4.2%
Asn (N)	15	3.5%
Asp (D)	21	4.9%
Cys (C)	7	1.6%
Gln (Q)	22	5.1%
Glu (E)	47	10.9%
Gly (G)	16	3.7%
His (H)	14	3.2%
Ile (I)	29	6.7%
Leu (L)	61	14.2%
Lys (K)	43	10.0%
Met (M)	12	2.8%
Phe (F)	12	2.8%
Pro (P)	2	0.5%
Ser (S)	19	4.4%
Thr (T)	13	3.0%
Trp (W)	2	0.5%
Tyr (Y)	36	8.4%

Val (V)	17	3.9%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 68
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 61

Atomic composition:

Carbon	C	2325
Hydrogen	H	3643
Nitrogen	N	595
Oxygen	O	673
Sulfur	S	19

Formula: $C_{2325}H_{3643}N_{595}O_{673}S_{19}$
Total number of atoms: 7255

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 65015
Abs 0.1% (=1 g/l) **1.267**, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 64640
Abs 0.1% (=1 g/l) **1.260**, assuming all Cys residues are reduced

User-provided sequence: NprRAHTH-(6 HisTag)

10 20 30 40 50 60
MAVTDLRDVE EDVKGKLDDEW LNALVHLDKQ QVERIYEELQ GEMKHVLDLFE IINYYKLLYT
70 80 90 100 110 120
RYLIMKRDIS ALEEELDKLK KVKYKYSPPQ KLLYMYGRGL LCCLQYRWKD GLDYLLKTEV
130 140 150 160 170 180
MAKEQGYHET GLYYNIALAY THLDIHHLAI HFVNMALEGF RSEYKFRNII NCQILIAVSF
190 200 210 220 230 240
TEKGQYEEAL KMYESILREA TSFADKDVLL AITLSNMGSI YYKKGKYQQA KKYYLDSLQL
250 260 270 280 290 300
QKQIDLNYLD TIYEMALVCI KLEEELEART LIDKGIDAAK QEERFNAKLY LLLMLRYKYF
310 320 330 340 350 360
EEAKDYKAFL ENEAIPLYKS AGNKIELKKV YVELAEHFSS LSRFEESNRY YRLVIDLMND
370
NKEERSHHHH HH

Number of amino acids: 372

Molecular weight: 44464.2

Theoretical pI: 6.10

Amino acid composition:

Ala (A)	24	6.5%
Arg (R)	16	4.3%
Asn (N)	14	3.8%
Asp (D)	21	5.6%
Cys (C)	4	1.1%
Gln (Q)	14	3.8%
Glu (E)	39	10.5%
Gly (G)	13	3.5%
His (H)	14	3.8%
Ile (I)	23	6.2%
Leu (L)	53	14.2%
Lys (K)	37	9.9%
Met (M)	11	3.0%
Phe (F)	11	3.0%
Pro (P)	2	0.5%
Ser (S)	15	4.0%
Thr (T)	10	2.7%
Trp (W)	2	0.5%
Tyr (Y)	34	9.1%
Val (V)	15	4.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 60

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 53

Atomic composition:

Carbon	C	2025
Hydrogen	H	3143
Nitrogen	N	515
Oxygen	O	580
Sulfur	S	15

Formula: $C_{2025}H_{3143}N_{515}O_{580}S_{15}$

Total number of atoms: 6278

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 61910
Abs 0.1% (=1 g/l) 1.392, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 61660
Abs 0.1% (=1 g/l) 1.387, assuming all Cys residues are reduced

ANNEXE D

Compositions des solutions utilisées en électrophorèse

Tampon Laemmli 4x :

0.25M Tris HCl pH 6.8

3mM β Mercaptoethanol

8% SDS

40% glycérol

Bleu brillant de Coomassie

Tampon de migration pH 8.8 pour 1 litre 5x :

30g Tris

144g Glycine

10% SDS à ajouter au dernier moment dans la solution 1x

Composition pour 2 gels de 0.75mm d'épaisseur :

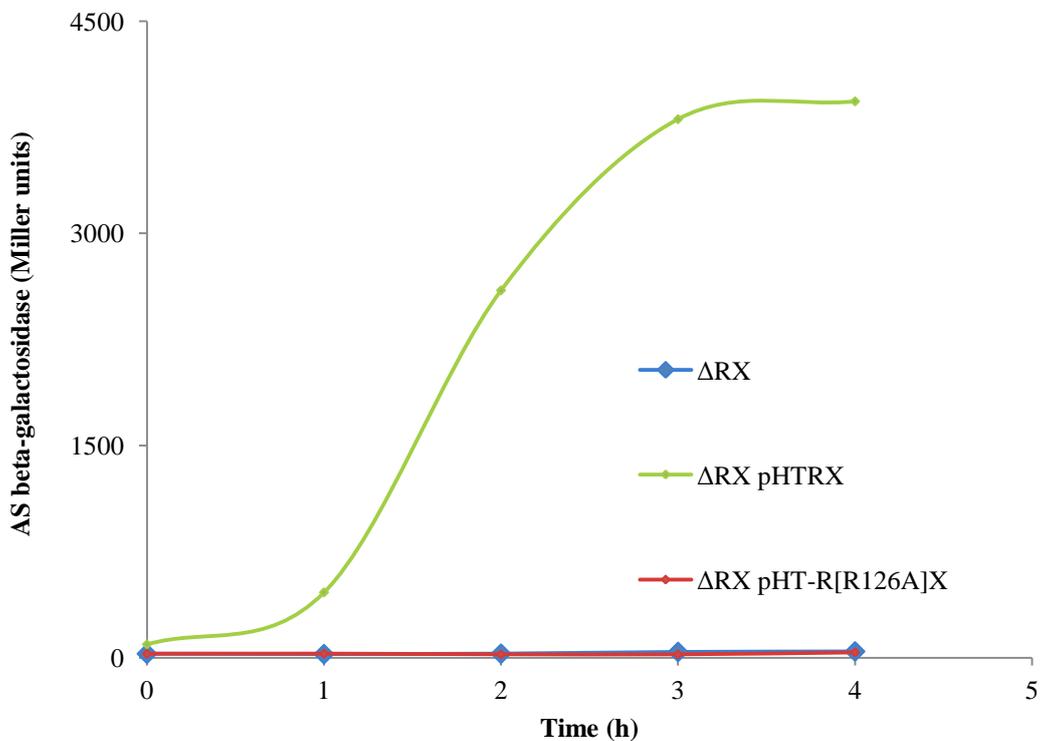
Gel de séparation	8%	12,5%	Gel de concentration	3,75%
H ₂ O	6.12ml	5ml	H ₂ O	3ml
Acrylamide 40%	2ml	3.12ml	Acrylamide 40%	375 μ l
Tris-HCl 1M pH8,8	1.88ml		Tris-HCl 1M pH6,8	335 μ l
SDS 10% *	100 μ l		SDS 10% *	30 μ l
APS 10%	100 μ l		APS 10%	60 μ l
Temed	12.5 μ l		Temed	5 μ l

* En condition native, le volume de SDS est remplacé par de l'eau.

wpra-nt407	421	KRR...
wpragroupe-ib	420	KRR...
wpragroupe-ic	420	KRR...
wpragroupe-ic	421	KRR...
wpragroupe-ic	420	KRR...
wpragroupe-if	421	KRR...
wpragroupe-ig	403	KRR...
wpragroupe-ih	421	KRR...
wpragroupe-ii	421	KRR...
wpragroupe-iaa	421	KRRK.
wpragroupe-rib	421	KRRK.
wpragroupe-ric	421	KRRK.
wpragroupe-riaa	421	KRRK.
wpragroupe-riib	421	KRRK.
wpragroupe-riic	421	KRRK.
wpragroupe-iva	421	KRRK.
wpragroupe-ivb	421	KRRK.
wpragroupe-ivc	421	KRRK.
wpragroupe-va	421	GGK...
wpragroupe-vb	421	GGK...
wpragroupe-vc	421	GGK...
wpragroupe-vd	421	GGK...
wpragroupe-via	
wpragroupe-vib	
wpragroupe-vic	
wpragroupe-vid	
wpragroupe-vie	
wpragroupe-vf	421	GGVIV.
wpragroupe-vig	421	GGVIV.
wpragroupe-vih	421	GGVIV.
wpragroupe-vii	
wpragroupe-vix	421	RRGGK

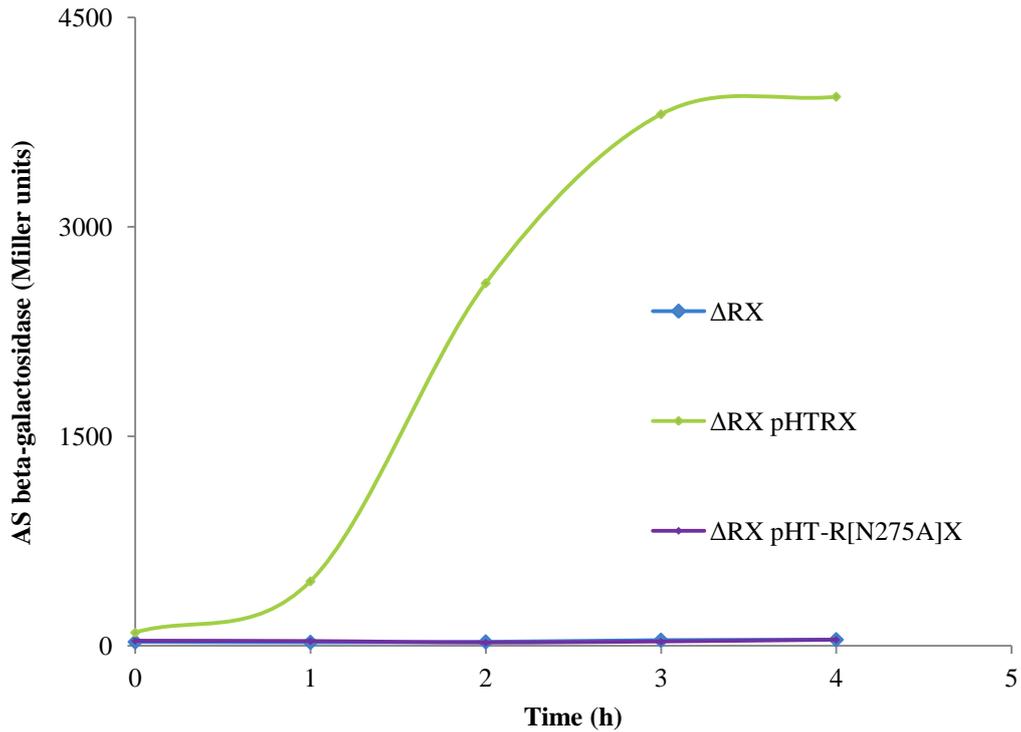
ANNEXE G

L'activité β -Galactosidase d'une souche mutante Bt 407 Δ RX, délété des gènes *nprR* et *nprX*, a été mesurée par complémentation avec des plasmides exprimant le peptide NprX et une forme mutée de NprR. Les souches ont été mises en cultures à 37°C dans un milieu favorisant la sporulation (milieu HCT). Les différents graphes, représentent l'activité β -Galactosidase mesurée en fonction du temps, le temps 0 correspondant au début de la phase stationnaire.



Mesure de l'activité transcriptionnelle de NprR-R126A

La souche mutante Bt 407 délétée des gènes *nprR* et *nprX* (courbe bleue Δ RX) a été complétementée par un plasmide exprimant l'effecteur sauvage et le peptide (courbe verte Δ RX pHTRX) ou un plasmide exprimant le peptide et le mutant R126A de NprR (courbe rouge Δ pHT-R[R126A]X).

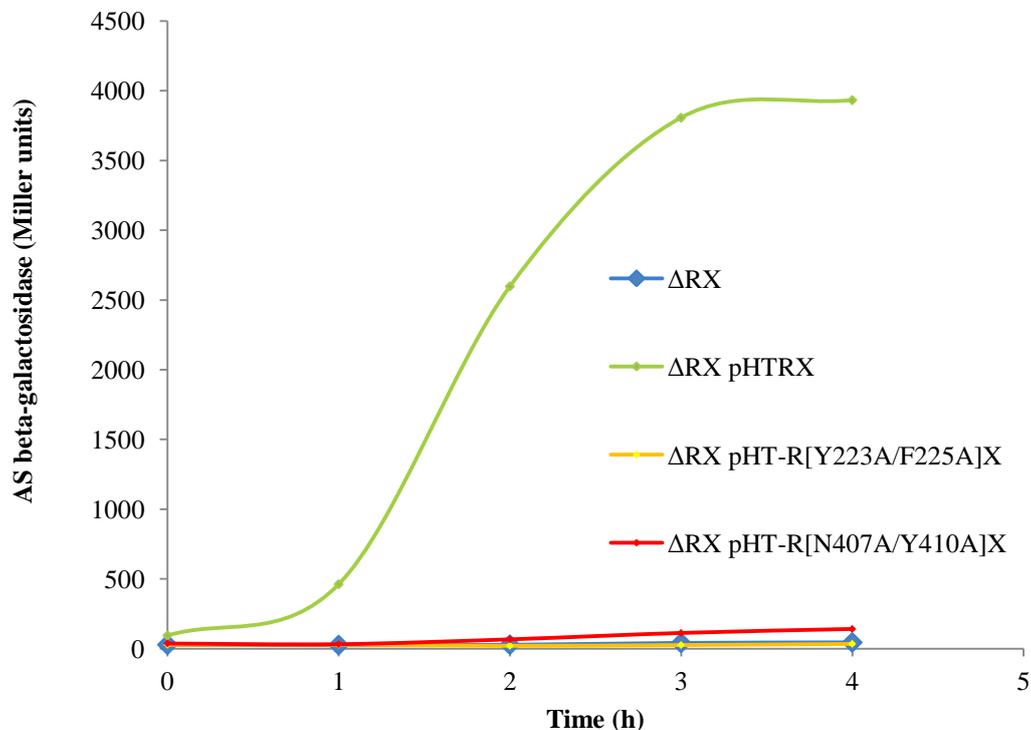


Mesure de l'activité transcriptionnelle de NprR-N275A

La souche mutante Bt 407 délétée des gènes *nprR* et *nprX* (courbe bleue ΔRX) a été complétée par un plasmide exprimant l'effecteur sauvage et le peptide (courbe verte ΔRX pHTRX) ou un plasmide exprimant le peptide et le mutant N275A de NprR (courbe violette $\Delta pHT-R[R126A]X$).

ANNEXE H

L'activité β -Galactosidase d'une souche mutante Bt 407 Δ RX, délété des gènes *nprR* et *nprX*, a été mesurée par complémentation avec des plasmides exprimant le peptide NprX et une forme mutée de NprR. Les souches ont été mises en cultures à 37°C dans un milieu favorisant la sporulation (milieu HCT). Les différents graphes, représentent l'activité β -Galactosidase mesurée en fonction du temps, le temps 0 correspondant au début de la phase stationnaire.



Mesures de l'activité transcriptionnelle des mutants NprR-Y223A/F225A et NprR-N407A/Y410A

La souche mutante Bt 407 délétée des gènes *nprR* et *nprX* (courbe bleue Δ RX) a été complétementée par un plasmide exprimant l'effecteur sauvage et le peptide (courbe verte Δ RX pHTRX) ou un plasmide exprimant le peptide et le double mutants Y223A/F225A de NprR (courbe jaune Δ pHT-R[Y223A/F225A]X) ou N407A/Y410A de NprR (courbe rouge Δ pHT-R[N407A/Y410A]X).

ANNEXE I

Alignement de séquences des Rap et NprR

	a1									
	a2									
	a3									
	a4									
	a5									
	a6									
	a7									
	a8									
	a9									
	a10									
	a11									
	a12									
NprR-nt407	1	10	20	30	40	50	60	70		
RAPF_BACSU										
RAPN_BACSU										
NprR-nt407	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g11	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g12	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g13	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g14	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g15	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g16	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
NprR-g17	NQQTLEKKGKQVFFYKRLQKMTQERLCCQGISVSYLSKIRNGKIRASERILQLLCTRLLEI...									
RAPA_BACSU									
RAPB_BACSU									
RAPC_BACSU									
RAPD_BACSU									
RAPF_BACSU									
RAPG_BACSU									
RAPH_BACSU									
RAPI_BACSU									
RAPJ_BACSU									
RAPK_BACSU									
NprR-nt407										
RAPF_BACSU										
RAPN_BACSU										
NprR-nt407	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g11	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g12	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g13	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g14	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g15	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g16	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
NprR-g17	DGLNALVHLDKQVRRITRELGGRMKHY..LDPRIINYYDLTYTYLIMKRD.....									
RAPA_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPB_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPC_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPD_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPF_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPG_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPH_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPI_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPJ_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
RAPK_BACSU	NGLYHILAFQVADAVLKKKIDLDIQMREKQGLLQYDGLINYYDMFPHHMLDYKPPFG..									
NprR-nt407	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g11	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g12	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g13	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g14	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g15	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g16	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
NprR-g17	YPPFKLLYMTGKGLLCCLYRWKQGLDYLKTYVMAKKGG..YHRTGLTYNIALAVYTRLDI...									
RAPA_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPB_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPC_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPD_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPF_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPG_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPH_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPI_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPJ_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
RAPK_BACSU	IQGLLEKYYTFFKMGMYEFPKMPVFAAMYYTKNAKMLALVDDIEKARPFKVAAYVYIMKQ...									
NprR-nt407	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g11	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g12	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g13	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g14	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g15	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g16	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
NprR-g17	YKFRNINCCQILIAVYTRKGGYRRDLKMYHSILREATFP..ADKDVLLAFLRMSITFKKGYQAKKYLDLQ...									
RAPA_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPB_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPC_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPD_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPF_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPG_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPH_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPI_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPJ_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									
RAPK_BACSU	RYTYRRIQCFVFIAGNYDDMQYFRRLPHLRLALDLAKK..KGFPHLISGALTYGNCYRMRGELQAAEYFPGKALVFI									

```

                                a13          a14          q2          a15          a16
NPER-nt407  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG
RAPP_BACSU  GG  GG GGGGGG GGGGGG GGGGGG  GG GGGGGG GGGGGG GGGGGG  GG GGGGGG GGGGGG GGGGGG  GG GGGGGG GGGGGG GGGGGG
RAPP_BACSU  GGG  GG GGGGGG GGGGGG GGGGGG  GG GGGGGG GGGGGG GG  TT  GGGGGG GGGGGG  GG GGGGGG GGGGGG

                                310          320          330          340          350          360          370
NPER-nt407  KQ...IDLNYLDTIYKMALVCIKLELRARTLIDKGIDAAKQ...EKNFNAKLVLLLMLNYKYFFRAKDYKAPLNHAIP
NPER-gi1  KQ...IDLNYLDTIYKMAVVICIKLELRAKALIDKGIDAAKQ...EKNFNAKLVLLLMLNYKYFFRAKDYKAPLNHAIP
NPER-gi2  KQ...IDLNYLDTIYKMALACIKLLDPFRRAKRWIDKGIVAAKN...EKNFNTKLYLLLMLRNKYFFRARYKQPLNHAIP
NPER-gi3  KT...VNNNYIDTIYGLAKYIHLKYRAQRWIKKGIDCGKS...DKKYNKMIYSPCIFKYFFRGSGQFRKPLNHAIP
NPER-gi4  QH...KDNNYLDTLYRTALCIHLKQMDRANQWIKKGISIAQR...EKKYRVLYLLLILQYKYFFRTSGDYKPLNHAIP
NPER-gi5  KR...KDLNYIDAYTEIALCIKLKPFRAKDWINKGIDVAKR...DKKYGMLVLLLMLKNKYFFRTKDVYKPLNHAIP
NPER-gi6  KR...KDNNYIDAMYTELSLCIQLQIIRRAKWIKKGIIAAKK...DKRYGMLVLLLMLRYKYFFRRNDVYKPLNHAIP
NPER-gi7  KKKKEDNYIDAYTEISLCVQLQPFRRAKRWIDKGIVAAKN...DKRYKGMLVLLILQYKYFFRKRYKPLNHAIP
RAPA_BACSU  KSR...KPNLPNSIYSLTVLYLKKQDDAAQKYRAGLIARQTS...DLFVLQPPLHALYGKNIDTESGHTPPLNHAIP
RAPP_BACSU  KQY...QLRQLPKALFSLTRVLYLFKKQSRAAINYREKGIAIAQKNN...DFFLAKYKFLQALYVRSVNLNMIQEVFYMEEK
RAPS_BACSU  KSR...IVNSLPQAYFPLITLIYLYKQKNDASRYKKGYRAKKTD...DADYAVKYKFLQSLYLDQPNRGIRCCPYLEEK
RAPP_BACSU  KKI...NSDYLPQATHDLALIYFPKQKGCANDCFRKGIRSAVDPK...DLFPNLFRALDVLYIRNGDTPKLLNIFRLENG
RAPP_BACSU  KRSN...ILPSLPQAYFPLITIQIRYKLGKIDRHYSKGMAYSQKAG...DVIYLSRPFLKSLYLGQPDREAIQGGFFLESK
RAPS_BACSU  KYA...RSAYTYHSATLLIRLFKIKKRALSYTQVKRELTARP...NRICRAKIDIYAITARGGGARTFPLCKRSMDDL
RAPP_BACSU  KRK...VPLLPKVLPGLSWLCRAQTQAQPFRKGLDITARS...KKFYKELLQVAVYKTVDERKIDLLYFREK
RAPP_BACSU  KRS...KHFLTNTLTLTYVRAQQYNVYFYRKGFIADKSD...DKEYSAKFILGLFPSDQRTQLIKNAFYLAS
RAPP_BACSU  KRH...NFQAVQAFPSLTRIYCHRQYDAVYDKIGAAANWE...DDYLTKPRLIRELYLGSGDLNVLTRCDLLER
RAPP_BACSU  SWL...NSIYTYINSLPMIKLPKIDKMKAINFYNKAQRLILMR...NKVYRAKISILNYCGRLKNPNFNCIIRFLK

                                a17          a18
NPER-nt407  GGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG
RAPP_BACSU  GGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG
RAPP_BACSU  GGG  GGGGGG GGGGGG GGGGGG  G GGGGGG GGGGGG GGGGGG

                                380          390          400          410          420
NPER-nt407  LYKSAGNKIELKKVYVELAENPSSLSRPRGNRYLVLIDLMNDNKER...
NPER-gi1  LYKSAGNKIELKKVYIELAENPSSLSRPRGNRYLVLIDLMNDN.KER...
NPER-gi2  FYKSAGNKIELKKVYMELAYPSSLLNPQSNHYKLVIRMLESYKEDE...
NPER-gi3  FPKSVGSMKELKNAYLELAMYLENRPKYRGNKYYKEVIVLER...KEELN...
NPER-gi4  FPKGRGLVTLKQVYLEIAHYFEGIENPRGSRTYKETIFLLEKGGEK...
NPER-gi5  FPKRENKEDLKKITLELAEYLECDDPQRGNHYYKLAINLER...
NPER-gi6  FPKRENKEDLKKITLELAEYLECDDPQRGNHYYKLAINLER...
NPER-gi7  FPKRENKEDLKKITLELAEYLECDDPQRGSHYYKLAVLLEREGGK...
RAPA_BACSU  NL...YFTIRELANDAAQFYIENGQPKALSYFYKMVHAQKQIQSGDCLYEI...
RAPP_BACSU  GL...YVYIREPALDAAQFYPSRRQYKAVYYFYKAVSMRMIQRNDCLYEV...
RAPP_BACSU  NM...YADIRDLALEVAKYTYRQKWPKSASTPLQVERARKQIQSRGLYERI...
RAPP_BACSU  IR...ANVDLEVLEDITRYYEKKDDFKAAFYIMRG...
RAPP_BACSU  KG...YFTIRELLLGNLPDYNGIMSIICPKMYYAQKQISKGCMYEI...
RAPP_BACSU  NL...YADIEDPAIDVAKYTHERKNPKSAFLVRVQLIQGGSLYERV...
RAPP_BACSU  LS...KEKYDSVRELSLAGHEYNELLYKHAAHFFYSALQIERLIKRTEVI...
RAPP_BACSU  NL...HAYIRACASGAAAVFRSSGHPQAAAFYKVLAQRDILKGCLYAT...
RAPP_BACSU  KM...PADVRNFSIEVADYFRQGNLMLGNRYYMRIARKKIKKGIDENQPDSIGSSDFK...
RAPP_BACSU  QL...LADAEDLLDTAAKFPNQLENYSAFYRLMNIKKLARQRFQ...
RAPP_BACSU  QQ...NRLSVDRLEYIAAKFPSIGAFRKATPFNAKIWARQKMNQVRGIL...

```


VII. BIBLIOGRAPHIE

- Agaisse, H., M. Gominet, et al. (1999). "PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*." *Mol Microbiol* **32**(5): 1043-53.
- Aravind, L., V. Anantharaman, et al. (2005). "The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond." *FEMS Microbiol Rev* **29**(2): 231-62.
- Bae, T., B. Kozłowicz, et al. (2002). "Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation." *J Mol Biol* **315**(5): 995-1007.
- Baker, M. D. and M. B. Neiditch (2011). "Structural basis of response regulator inhibition by a bacterial anti-activator protein." *PLoS Biol* **9**(12): e1001226.
- Bassler, B. L. and R. Losick (2006). "Bacterially speaking." *Cell* **125**(2): 237-46.
- Bassler, B. L., M. Wright, et al. (1994). "Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway." *Mol Microbiol* **13**(2): 273-86.
- Berg, H. C. (2008). "Bacterial flagellar motor." *Curr Biol* **18**(16): R689-91.
- Blanc, E., P. Roversi, et al. (2004). "Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2210-21.
- Blatch, G. L. and M. Lassel (1999). "The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions." *Bioessays* **21**(11): 932-9.
- Bongiorni, C., S. Ishikawa, et al. (2005). "Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems." *J Bacteriol* **187**(13): 4353-61.
- Bottone, E. J. (2010). "*Bacillus cereus*, a volatile human pathogen." *Clin Microbiol Rev* **23**(2): 382-98.
- Bouillaut, L., S. Perchat, et al. (2008). "Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides." *Nucleic Acids Res* **36**(11): 3791-801.
- Boyer, M. and F. Wisniewski-Dye (2009). "Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum." *FEMS Microbiol Ecol* **70**(1): 1-19.
- Buist, G., A. N. Ridder, et al. (2006). "Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria." *Microbiology* **152**(Pt 10): 2867-74.
- Chandler, J. R. and G. M. Dunny (2004). "Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity." *Peptides* **25**(9): 1377-88.
- Chandler, J. R. and G. M. Dunny (2008). "Characterization of the sequence specificity determinants required for processing and control of sex pheromone by the intramembrane protease Eep and the plasmid-encoded protein PrgY." *J Bacteriol* **190**(4): 1172-83.
- Chenna, R., H. Sugawara, et al. (2003). "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3497-500.
- Chitlaru, T., O. Gat, et al. (2006). "Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities." *J Bacteriol* **188**(10): 3551-71.
- Chitlaru, T., G. Zaide, et al. (2011). "HtrA is a major virulence determinant of *Bacillus anthracis*." *Mol Microbiol* **81**(6): 1542-59.
- Chung, M. C., T. G. Popova, et al. (2006). "Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors." *J Biol Chem* **281**(42): 31408-18.
- Clewell, D. B. (1990). "Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**(2): 90-102.
- Clewell, D. B., F. Y. An, et al. (2000). "Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins." *Mol Microbiol* **35**(1): 246-7.
- Core, L. and M. Perego (2003). "TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **49**(6): 1509-22.
- Cowtan, K. (2006). "The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 9): 1002-11.
- D'Andrea, L. D. and L. Regan (2003). "TPR proteins: the versatile helix." *Trends Biochem Sci* **28**(12): 655-62.
- Das, A. K., P. W. Cohen, et al. (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." *EMBO J* **17**(5): 1192-9.

- Declerck, N., L. Bouillaut, et al. (2007). "Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18490-5.
- Dubnau, D. (1991). "Genetic competence in *Bacillus subtilis*." *Microbiol Rev* **55**(3): 395-424.
- Dubnau, D., J. Hahn, et al. (1994). "Two-component regulators and genetic competence in *Bacillus subtilis*." *Res Microbiol* **145**(5-6): 403-11.
- Dubois, T., K. Faegri, et al. (2012). "Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002629.
- Dunny, G. M. and B. A. Leonard (1997). "Cell-cell communication in gram-positive bacteria." *Annu Rev Microbiol* **51**: 527-64.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Engbrecht, J. and M. Silverman (1984). "Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(13): 4154-8.
- Federle, M. J. (2009). "Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling." *Contrib Microbiol* **16**: 18-32.
- Fleuchot, B., C. Gitton, et al. (2011). "Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci." *Mol Microbiol* **80**(4): 1102-19.
- Fontaine, L., C. Boutry, et al. (2010). "A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*." *J Bacteriol* **192**(5): 1444-54.
- Freeman, J. A., B. N. Lilley, et al. (2000). "A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*." *Mol Microbiol* **35**(1): 139-49.
- Friedman, A. M., T. O. Fischmann, et al. (1995). "Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping." *Science* **268**(5218): 1721-7.
- Fuqua, C., M. R. Parsek, et al. (2001). "Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing." *Annu Rev Genet* **35**: 439-68.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, et al. (1994). "Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators." *J Bacteriol* **176**(2): 269-75.
- Gohar, M., K. Faegri, et al. (2008). "The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*." *PLoS One* **3**(7): e2793.
- Gohar, M., N. Gilois, et al. (2005). "A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes." *Proteomics* **5**(14): 3696-711.
- Gohar, M., O. A. Okstad, et al. (2002). "Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon." *Proteomics* **2**(6): 784-91.
- Gominet, M., L. Slamti, et al. (2001). "Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence." *Mol Microbiol* **40**(4): 963-75.
- Gouet, P., X. Robert, et al. (2003). "ESPrpt/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3320-3.
- Gouy, M., S. Guindon, et al. (2010). "SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building." *Mol Biol Evol* **27**(2): 221-4.
- Gross, R., B. Arico, et al. (1989). "Families of bacterial signal-transducing proteins." *Mol Microbiol* **3**(11): 1661-7.
- Hanzelka, B. L., M. R. Parsek, et al. (1999). "Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein." *J Bacteriol* **181**(18): 5766-70.
- Heras, B., M. A. Edeling, et al. (2003). "Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution." *Structure* **11**(2): 139-45.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hooshangi, S. and W. E. Bentley (2008). "From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications." *Curr Opin Biotechnol* **19**(6): 550-5.
- Ivanova, N., A. Sorokin, et al. (2003). "Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*." *Nature* **423**(6935): 87-91.

- Ji, G., R. C. Beavis, et al. (1995). "Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12055-9.
- Kabsch, W. (2010). "Xds." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 2): 125-32.
- Karpenahalli, M. R., A. N. Lupas, et al. (2007). "TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences." *BMC Bioinformatics* **8**: 2.
- Kataoka, M., T. Tanaka, et al. (2008). "The carboxyl-terminal domain of TraR, a Streptomyces HutC family repressor, functions in oligomerization." *J Bacteriol* **190**(21): 7164-9.
- Kendall, M. M. and V. Sperandio (2007). "Quorum sensing by enteric pathogens." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(1): 10-5.
- Kim, K., J. Oh, et al. (2006). "Crystal structure of PilF: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in Pseudomonas aeruginosa." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(4): 1028-38.
- Kozlowski, B. K., K. Shi, et al. (2006). "Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides." *Mol Microbiol* **62**(4): 958-69.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2004). "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2256-68.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2007). "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state." *J Mol Biol* **372**(3): 774-97.
- Lanigan-Gerdes, S., A. N. Dooley, et al. (2007). "Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of Bacillus subtilis." *Mol Microbiol* **65**(5): 1321-33.
- Laskowski, R. A. (2009). "PDBsum new things." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D355-9.
- Lereclus, D., H. Agaisse, et al. (1996). "Identification of a Bacillus thuringiensis gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase." *J Bacteriol* **178**(10): 2749-56.
- Lewis, M., G. Chang, et al. (1996). "Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer." *Science* **271**(5253): 1247-54.
- Lorber, B., C. Sauter, et al. (2009). "Crystal growth of proteins, nucleic acids, and viruses in gels." *Prog Biophys Mol Biol* **101**(1-3): 13-25.
- Lowery, C. A., T. J. Dickerson, et al. (2008). "Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing." *Chem Soc Rev* **37**(7): 1337-46.
- Lyon, G. J., J. S. Wright, et al. (2002). "Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of Staphylococcus aureus." *Biochemistry* **41**(31): 10095-104.
- McCoy, A. J. (2004). "Liking likelihood." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2169-83.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, et al. (2007). "Phaser crystallographic software." *J Appl Crystallogr* **40**(Pt 4): 658-674.
- Miguel, V., R. J. Pezza, et al. (2007). "The C-terminal region of Escherichia coli MutS and protein oligomerization." *Biochem Biophys Res Commun* **360**(2): 412-7.
- Nakayama, J., R. E. Ruhfel, et al. (1994). "The prgQ gene of the Enterococcus faecalis tetracycline resistance plasmid pCF10 encodes a peptide inhibitor, iCF10." *J Bacteriol* **176**(23): 7405-8.
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings (1979). "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." *Microbiol Rev* **43**(4): 496-518.
- Newman, J. (2006). "A review of techniques for maximizing diffraction from a protein crystal in stilla." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 1): 27-31.
- Ng, W. L. and B. L. Bassler (2009). "Bacterial quorum-sensing network architectures." *Annu Rev Genet* **43**: 197-222.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, et al. (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." *Protein Eng* **10**(1): 1-6.
- Novick, R. P., S. J. Projan, et al. (1995). "The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus." *Mol Gen Genet* **248**(4): 446-58.
- Novick, R. P., H. F. Ross, et al. (1993). "Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule." *EMBO J* **12**(10): 3967-75.
- Okstad, O. A., M. Gominet, et al. (1999). "Sequence analysis of three Bacillus cereus loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin." *Microbiology* **145** (Pt 11): 3129-38.

- Pabo, C. O. and R. T. Sauer (1984). "Protein-DNA recognition." *Annu Rev Biochem* **53**: 293-321.
- Parashar, V., N. Mirouze, et al. (2011). "Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases." *PLoS Biol* **9**(2): e1000589.
- Parsek, M. R., D. L. Val, et al. (1999). "Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4360-5.
- Pearson, J. P., C. Van Delden, et al. (1999). "Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals." *J Bacteriol* **181**(4): 1203-10.
- Perchat, S., T. Dubois, et al. (2011). "A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group." *Mol Microbiol* **82**(3): 619-33.
- Perego, M. and J. A. Brannigan (2001). "Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases." *Peptides* **22**(10): 1541-7.
- Perego, M., C. Hanstein, et al. (1994). "Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*." *Cell* **79**(6): 1047-55.
- Perego, M. and J. A. Hoch (1996). "Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1549-53.
- Perego, M. and J. A. Hoch (1996). "Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems." *Trends Genet* **12**(3): 97-101.
- Pomerantsev, A. P., O. M. Pomerantseva, et al. (2009). "PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(3): 361-77.
- Porter, S. L., G. H. Wadhams, et al. (2011). "Signal processing in complex chemotaxis pathways." *Nat Rev Microbiol* **9**(3): 153-65.
- Pottathil, M. and B. A. Lazazzera (2003). "The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*." *Front Biosci* **8**: d32-45.
- Raffa, R. B., J. R. Iannuzzo, et al. (2005). "Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(2): 417-23.
- Rasmussen, T. B. and M. Givskov (2006). "Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs." *Int J Med Microbiol* **296**(2-3): 149-61.
- Rocha-Estrada, J., A. E. Aceves-Diez, et al. (2010). "The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria." *Appl Microbiol Biotechnol* **87**(3): 913-23.
- Roy, V., B. L. Adams, et al. (2011). "Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing." *Enzyme Microb Technol* **49**(2): 113-23.
- Saenz, H. L., V. Augsburg, et al. (2000). "Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone." *Arch Microbiol* **174**(6): 452-5.
- Sheldrick, G. M. (2008). "A short history of SHELX." *Acta Crystallogr A* **64**(Pt 1): 112-22.
- Shi, K., C. K. Brown, et al. (2005). "Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18596-601.
- Sifri, C. D. (2008). "Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense." *Clin Infect Dis* **47**(8): 1070-6.
- Slamti, L. and D. Lereclus (2002). "A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group." *EMBO J* **21**(17): 4550-9.
- Slamti, L. and D. Lereclus (2005). "Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group." *J Bacteriol* **187**(3): 1182-7.
- Smits, W. K., C. Bongiorno, et al. (2007). "Temporal separation of distinct differentiation pathways by a dual specificity Rap-Phr system in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **65**(1): 103-20.
- Solomon, J. M., B. A. Lazazzera, et al. (1996). "Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*." *Genes Dev* **10**(16): 2014-24.
- Solomon, J. M., R. Magnuson, et al. (1995). "Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*." *Genes Dev* **9**(5): 547-58.

- Sonenshein, A. L. (2000). "Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*." Curr Opin Microbiol **3**(6): 561-6.
- Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund, et al. (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." FEMS Microbiol Rev **32**(4): 579-606.
- Stephenson, S., C. Mueller, et al. (2003). "Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **185**(16): 4861-71.
- Tauveron, G., C. Slomianny, et al. (2006). "Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment." Int J Food Microbiol **110**(3): 254-62.
- Terwilliger, T. C. (2000). "Maximum-likelihood density modification." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 8): 965-72.
- Thoendel, M. and A. R. Horswill (2010). "Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria." Adv Appl Microbiol **71**: 91-112.
- Tjalsma, H., A. Bolhuis, et al. (2000). "Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 515-47.
- Visick, K. L., J. Foster, et al. (2000). "*Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ." J Bacteriol **182**(16): 4578-86.
- Wadhams, G. H. and J. P. Armitage (2004). "Making sense of it all: bacterial chemotaxis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 1024-37.
- Walter, T. S., C. Meier, et al. (2006). "Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization." Structure **14**(11): 1617-22.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 319-46.
- West, A. H. and A. M. Stock (2001). "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems." Trends Biochem Sci **26**(6): 369-76.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W668-73.
- Wintjens, R. and M. Rooman (1996). "Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes." J Mol Biol **262**(2): 294-313.
- Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2003). "LuxS quorum sensing: more than just a numbers game." Curr Opin Microbiol **6**(2): 191-7.
- Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2005). "Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication." Nature **437**(7059): 750-3.
- Yamane, K., K. Bunai, et al. (2004). "Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*." Biosci Biotechnol Biochem **68**(10): 2007-23.