



HAL
open science

La régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis* : BvgS, modèle original de capteur de système à deux composants

Elian Dupré

► **To cite this version:**

Elian Dupré. La régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis* : BvgS, modèle original de capteur de système à deux composants. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S022 . tel-01138645

HAL Id: tel-01138645

<https://theses.hal.science/tel-01138645>

Submitted on 2 Apr 2015

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.

Thèse de Doctorat

De l'Université Lille 2 – Droit et Santé

Présentée par

Elian DUPRÉ

Soutenue Publiquement le 27/09/2013

La régulation de la virulence chez
Bordetella pertussis :
BvgS, modèle original de capteur de
système à deux composants

Composition du Jury

Dr Michel SIMONET	Président
Dr Philippe DELEPELAIRE	Rapporteur
Dr Bernard JORIS	Rapporteur
Dr Xavier HANOULLE	Examineur
Dr Alexandre WOHLKONIG	Examineur
Dr Françoise JACOB-DUBUISSON	Directrice de thèse

Tuteurs : Drs Camille Locht, Françoise Jacob-Dubuisson et Rudy Antoine

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'Institut Pasteur de Lille ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale pour leur financement au cours de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Camille Loch, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli dans son unité et m'avoir permis d'y effectuer mes travaux de thèse en tant que co-tuteur.

Je ne sais pas comment exprimer ma profonde gratitude envers Françoise Jacob-Dubuisson, co-tutrice de thèse, et Rudy Antoine, qui m'ont encadré au quotidien. Votre aide et vos conseils ont été inestimables dans l'avancée de ce travail et dans mon évolution personnelle. Vous formez une équipe complémentaire dans vos approches du sujet et il a été plus qu'agréable d'être à vos côtés pendant ces quelques années. Merci encore pour votre soutien et votre compréhension tout au long de ma thèse, vous m'avez permis de m'épanouir dans mon travail et de conserver mon enthousiasme initial pour ce sujet. Sans vous, la réalisation d'un tel projet me semble insurmontable avec le recul.

A Julien Herrou, qui m'a précédé dans la caractérisation de BvgS, merci infiniment. Non seulement ta contribution à la collecte de données clés dans la compréhension du système, mais aussi tout ce que tu as pu m'enseigner lorsque j'ai eu la chance de travailler à tes côtés, m'ont permis de mener à bien ce projet. Ton côté amical et ta capacité étonnante de travail m'ont permis de me surpasser.

Merci particulièrement à ceux qui ont été mes « voisins de paillasse ». A Pierre Lebrun, ton grain de folie et ta sympathie nous ont permis de passer de bons moments sans jamais nuire aux expériences, voire même en nous permettant d'en faire toujours plus. A Elodie Lesne, que j'ai eu le plaisir de former, merci pour les bons moments et les discussions qui ont pu m'aider dans la compréhension des résultats. Je te décerne la « palme d'or du stagiaire », non seulement tu apprends très vite, mais ton efficacité à la paillasse n'a rien à envier à des personnes plus expérimentées.

Je remercie aussi les autres stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Mlles Sophie Tronet et Justine Ecotière, bien que vous soyez resté assez peu de temps parmi nous, vous avez été très appréciées, et vos travaux m'auront permis de tester des hypothèses supplémentaires et apporter ainsi des éléments de réponse importants.

A Hana Kammoun, nous aurons effectué un sacré bout de chemin ensemble dans ce laboratoire. Merci d'avoir toujours été si gentille et souriante, tu es un peu notre rayon de soleil. Même dans les moments difficiles tu as su rester toi-même et il a été fort agréable de te côtoyer.

Impossible de remercier Hana sans remercier Anne-Sophie Debrie, éternel acolyte. Merci à toi pour ta gentillesse, contrairement à ce que tu voudrais que l'on croit ! Merci pour tes

conseils avisés, les bons moments et toutes les discussions intéressantes, tant scientifiquement que d'autres points de vue, que l'on a partagés.

A Nicolas Blondiaux, un grand merci pour ta sympathie et ta collection musicale très intéressante... Tes connaissances impressionnantes et la facilité de ton contact m'auront beaucoup apporté. Je n'ajouterai qu'une chose « .|.| », vive le métal!

A Jérémy Guérin, je crois que tu me dois une bière. Merci beaucoup pour les bons moments que l'on a pu partager aussi bien dans le laboratoire qu'en-dehors. Merci aussi pour toutes les discussions scientifiques, on n'a pas fait que s'amuser finalement, tes idées m'auront parfois aidé à mieux appréhender mon sujet.

Merci également à Sophie Lecher, les plus beaux gels d'acrylamide que j'ai pu utiliser étaient les tiens ! Evidemment, ce n'est pas ta seule qualité et j'ai été presque étonné de ta sympathie et de ton humour. Merci donc pour les bons moments et pour ton aide générale dans le laboratoire.

Merci à Jérôme Segers pour sa folie assumée, sa grande sympathie et tous les échanges que l'on a pu avoir, scientifiques ou personnels. Désolé de t'avoir rendu accroc à la culture nippone !

A toute l'unité BRIPT, ex U629, je vous remercie pour l'atmosphère particulière que vous transmettez au laboratoire. Grâce à vous, lorsqu'il faut venir travailler, c'est généralement avec le sourire qu'on entame la journée. Je suis désolé de ne pas prendre le temps de remercier chacun d'entre vous personnellement, l'équipe est grande ! Je tiens cependant à remercier plus particulièrement Dominique Raze, pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter au laboratoire et sa sympathie.

Je remercie ma famille et particulièrement ma mère pour sa présence tout au long de ces années, et bien avant. Nous avons traversé une douloureuse épreuve et c'est en se soutenant mutuellement à notre façon que nous avons pu y faire face.

Merci à mes amis, particulièrement Loïc et Gaëtan, pour tous les bons moments partagés, que ce soit en face ou en ligne. Sans ces moments de détente je ne sais pas s'il est possible de rester soi-même. Je remercie par la même occasion les différents créateurs de jeux vidéo et de jeux de société pour faciliter ces bons moments, rien de tel qu'une activité commune pour se relaxer et enrichir les liens d'amitié.

Enfin je tiens à remercier ma chérie, Audrey, pour tout ce qu'elle m'a apporté, son soutien sans faille et sa compréhension. Sans toi je ne sais pas ce que je serais devenu et tu as su rendre ma vie particulièrement agréable. Non seulement tu m'as apporté énormément d'amour, mais aussi un gentil Sacha, dont les moustaches sont les meilleures amies du cristallographe !

PS : Merci aux milliards (de milliards ?) de bactéries qui se sont sacrifiées pour la science et ont toujours souffert en silence.

Avant Propos

Lorsque je suis arrivé au laboratoire en 2008 pour y effectuer mon stage de recherche de master 2, j'étais émerveillé face au système BvgAS. Sa composition complexe et originale permettait un travail imaginaire des mécanismes de régulation fort intéressant. L'organisation structurale de ces domaines était inconnue et même si leur repliement de base était somme toute connu, leur organisation quaternaire semblait être un défi lancé à notre communauté. La perception et la transduction de signaux par un tel système m'a alors semblé d'une complexité inintelligible au vu de nos connaissances actuelles. Les nombreuses questions qu'une telle protéine pouvait poser semblaient toutes passionnantes et le champ d'investigation très large, ce qui n'a fait que confirmer mon engouement pour ce système.

Au fil du temps et des expériences, quelques réponses ont pu être apportées, mais de nouvelles questions sont apparues avec elles. C'est en arpentant le long chemin de la thèse que l'on peut se rendre compte que mener un projet scientifique n'est pas de tout repos, chaque question n'apporte pas forcément une réponse, et la majorité des réponses apportent de nouvelles questions.

Cette expérience si enrichissante, autant au niveau intellectuel qu'humain, apporte parfois des déceptions, mais aucune d'entre elles n'a su entacher mon enthousiasme. Même si BvgS est loin de nous avoir livré ses secrets à l'heure où j'écris ces lignes, ce manuscrit décrit en grande majorité les pistes que nous avons suivies au fil de nos questionnements et découvertes. J'espère que l'avenir nous permettra de mieux comprendre encore ce système, et de révéler des mécanismes généraux et particuliers de transduction du signal dans les systèmes à deux composants.

De nombreuses personnes se sont penchées sur ce système au fil du temps permettant la construction de l'édifice de nos connaissances, sans doute bien d'autres suivront nos pas, et j'espère avoir apporté une pierre à cet édifice.

« *Nous ne sommes pas seuls.* » (Fox Mulder). La recherche est avant tout un travail d'équipe et plusieurs cerveaux valent mieux qu'un pour tenter de percer un mystère. Ce manuscrit reflète donc ma réflexion personnelle mais aussi celles de collaborateurs proches sans qui rien de cela n'aurait été possible.

« *S'il n'y a pas de solution c'est qu'il n'y a pas de problème.* » (Devise Shadok)

*A la mémoire de mon père,
A ma famille et à mes amis.*

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette, Cassette de liaison à l'ATP

ACT : « Adenylate Cyclase Toxin », toxine adénylate cyclase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPA(R) : (Récepteurs à l')acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isozazolepropionique

AMPC : AMP cyclique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

bvg : *Bordetella* virulence genes

BvgA : Bvg Activator

BvgS : Bvg Sensor

c-di-GMP : cyclic-di-GMP, di-GMP cyclique

CA : Catalytic ATP-binding (domain), domaine catalytique de liaison à l'ATP

CACHE : Calcium channels and CHEmotaxis protein, canaux calciques et protéines de la chimiotaxie.

CDC : Center for Disease Control and Prevention, Centre pour le contrôle et la prévention des maladies

CyaA : cf. ACT

DHp : Dimérisation et Histidine phosphotransfert

DNT : DermoNecrotic Toxin, toxine dermonécrotique

DOS : Direct Oxygen Sensor, senseur direct de l'oxygène

ERG : Ether-a-go-go Related Genes, gènes homologues à la protéine Ether-a-go-go

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FHA : Filamentous haemagglutinin, Hémagglutinine Filamenteuse

Fim : Fimbriae

FMN : Flavine MonoNucléotide

GAF : phosphodiesterases spécifique du cGMP, Adénylate cyclase et FhlA

GMP : Guanosine MonoPhosphate

GMPc : GMP cyclique

HAMP : Histidine kinases (HKs), Adénylates cyclases, protéines accepteuses de Méthyl et Phosphatases

HERG : Human ERG, ERG humain

HK : Histidine-Kinase

HPt : Histidine Phosphotransfert

HTH : Helix-Turn-Helix, Hélice-Tour-Hélice

KR : Kainate Receptor, Récepteur au kaïnate

LAOBP : Lysine-Arginine-Ornithine-Binding Protein, protéine de liaison à la lysine, l'arginine et l'ornithine

LIVBP : Leucine-Isoleucine-Valine-Binding Protein, protéine de liaison à la leucine, l'isoleucine et la valine

LOV : Light, Oxygen or Voltage, domaines sensible à la lumière, l'oxygène ou le voltage

LPS : Lipopolysaccharide

MCP : Methyl-accepting Chemotaxis Protein, protéine de la chimiotaxie accepteuse de méthyl

NMDA(R) : (Récepteur au) N-Méthyl-D-Aspartate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAC : PAS-Associated C-terminal (motif), (motif) C-terminal associé au motif PAS

PAS : Per-Arnt-Sim

PBP : Periplasmic (solute-)Binding Protein, protéine de liaison (de solutés) périplasmique ; ou Penicillin-Binding Protein, protéine de liaison de la pénicilline ; ou Pheromone-Binding Protein, protéine de liaison des phéromones

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDC : PhoQ-DcuS-CitA

PELDOR : Pulsed ELection-electron DOuble Resonance

pGpG : 5'-phosphate-guanylyl-(3'-5')-guanosine, 5'-phosphate-guanylate-(3'-5')-guanosine ou di-GMP linéaire

PRN : Pertactine

PTX : Pertussis ToXin, toxine pertussique

PYP : Photoactive Yellow Protein, protéine jaune photoactive

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

RR : Response Regulator, Régulateur de Réponse

SCOP : Structural Classification Of Proteins, classification structurale des protéines

SS : Stainer-Scholte (broth), milieu de culture liquide Stainer-Scholte

STAS : Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist, transporteur de sulfate et antagoniste de facteur anti-sigma

Tcf : Tracheal colonization factor, facteur de colonisation trachéale

TCT : Tracheal CytoToxin, cytotoxine trachéale

TMAO : TriMéthylAmine-N-Oxide

vag : virulence-activated genes

vrg : virulence-repressed genes

VFT : Venus FlyTrap, Vénus piège à mouches (du nom de la dionée)

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. <i>Bordetella pertussis</i>, la coqueluche et les Bordetelles	1
A. Les origines et le genre <i>Bordetella</i>	1
1. <i>Bordetella pertussis</i> et le genre <i>Bordetella</i>	1
2. Traitement, prévention et épidémiologie.....	2
3. Pathogénie de la coqueluche	3
B. Facteurs de virulence	4
1. Adhésines	4
2. Toxines	5
II. Régulation génétique et systèmes à deux composants	8
A. Les systèmes à deux composants	8
1. Autres régulateurs génétiques.....	8
2. Que sont les systèmes à deux composants ?.....	9
3. Des systèmes à deux composants... et plus	13
B. Les domaines Histidine-Kinase	14
1. Classe 1	14
2. Classe 2.....	17
3. Le transfert de phosphate.....	19
III. Modulation et régulation de la virulence : le système BvgAS	21
A. Modulation de la virulence	21
1. Les modulateurs négatifs de la virulence	21
2. Sensibilité à la modulation	22
B. BvgAS, découverte et fonction	23
1. Identification du locus <i>bvgAS</i>	23
2. BvgAS, un système à deux composants.....	24
3. Le régulon <i>bvg</i>	25
4. Les différentes phases de virulence et leurs rôles.....	27
C. BvgS, un capteur kinase remarquable	29
1. Pourquoi un rhéostat ?.....	29
2. Particularités de BvgS	29
3. Architecture de BvgS	30
IV. Les domaines « Venus FlyTrap »	33
A. Structure et classification	33

1.	Periplasmic binding protein-like I ou VFT de type 1	33
2.	Periplasmic binding protein-like II ou VFT de type 2.....	34
3.	Chelatase-like - "Helical backbone" metal receptor ou VFT de type 3.....	34
4.	Classification « fonctionnelle »	34
B.	Une famille, des familles : les nombreux visages des domaines VFT.....	35
1.	Attrape-moi si tu peux ! Liaison du ligand et mobilité.....	35
2.	Une fonction enzymatique.....	37
3.	Les VFT et la régulation transcriptionnelle.....	38
4.	Les VFT et le transport.....	38
5.	Les VFT dans la signalisation	40
6.	Conclusions sur l'utilisation des VFT	51
V.	Les domaines « Per-Arnt-Sim »	52
A.	Que sont les domaines Per-Arnt-Sim (PAS) ?.....	52
1.	Caractéristiques structurales	52
2.	La superfamille des domaines PAS	53
3.	Autour des domaines PAS.....	54
B.	Une structure, de nombreux rôles.....	54
1.	Ecartez-vous, on sort !.....	55
2.	PAS, je vous « hème ».....	56
3.	Potentiel RedOx	59
4.	Une idée lumineuse	61
C.	Transduction du signal	65
1.	Enroulements d'hélices	65
2.	Transduction entre deux domaines senseurs	66
3.	Transduction du signal vers la kinase.....	67
VI.	Objectifs de la thèse.....	70
	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	72
VII.	Études des domaines VFT de BvgS.....	73
A.	Etudes des cavités et des résidus conservés.....	73
1.	VFT2, un domaine atypique	73
2.	Résultats complémentaires	94
3.	Combinaison de substitutions.....	100
4.	Premiers éléments de réponses et nouvelles questions.....	103
B.	Etudes de la portion périplasmique complète.....	105

1. Une organisation dimérique originale	105
2. Résultats complémentaires	136
3. Nouvelles protéines recombinantes.....	140
4. La mobilité des domaines VFT	146
C. Conclusion des expériences sur les domaines VFT.....	149
1. De l'état des domaines VFT à la conformation de H19	149
2. Un mécanisme asymétrique ?.....	151
VIII. Études du domaine PAS de BvgS	154
A. Etudes de la fonction du domaine PAS.....	154
1. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission.....	154
B. Les régions flanquantes du domaine PAS.....	171
1. Jonction avec l'histidine-kinase	171
2. Jonction avec les domaines en amont.....	175
3. Délétion du domaine PAS	178
C. Conclusions des expériences sur le domaine PAS.....	182
IX. La perception de la température	184
A. Méthodes	184
B. Résultats et discussion.....	185
1. Modulation d'un gène <i>vag</i> tardif	185
2. Modulation d'un gène <i>vag</i> précoce	186
C. Conclusions	188
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	190
X. Conclusions générales et perspectives	191
A. BvgS, un système complexe et original.....	191
B. Perspectives.....	194
APPENDICE	196
BvgS of Pathogenic <i>Bordetellae</i> : A Paradigm for Sensor kinases with Venus Flytrap Perception Domains	196
Le mini-guide des mutants de BvgS.....	224
BIBLIOGRAPHIE	232

INTRODUCTION

I. *Bordetella pertussis*, la coqueluche et les Bordetelles

A. Les origines et le genre *Bordetella*

Notre histoire commence au XVI^e siècle (1578) lorsqu'une épidémie, décrite comme un violent rhume, frappe Paris. Un médecin français, Guillaume de Baillou, nomme cette maladie *Tussis quintina*. Cette maladie n'a pas été décrite uniquement en France, et chaque culture lui a attribué un nom particulier, comme en Chine où elle est connue sous le nom de « toux des cents jours », ou encore en Allemagne *Wolfshusten* (la toux du loup). Les Anglais l'ont nommée « whooping cough » à cause du son caractéristique de la toux chez les personnes infectées (« whoop », qui signifie cri, <http://en.wikipedia.org/wiki/Pertussis>). Le terme français de coqueluche n'est apparu que plus tard et par dérive au fil du temps. Le terme peut provenir ici aussi du son produit lors de la toux, rappelant le chant du coq. Une autre théorie voudrait que le nom provienne du coqueluchon, sorte de capuchon porté par les personnes atteintes. La maladie a été très rapidement reconnue par les médecins comme provenant d'un agent atmosphérique qui se propagerait par la toux, et donc cette mesure permettait d'éviter la propagation (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Coqueluche>).

Il aura fallu attendre plus de trois siècles, et les travaux de deux Belges, un médecin et biologiste, Jules Bordet, et un bactériologiste, Octave Gengou, pour que l'agent pathogène soit caractérisé.

1. *Bordetella pertussis* et le genre *Bordetella*

C'est en 1906 que Bordet et Gengou ont pour la première fois isolé la bactérie responsable de la coqueluche, à partir d'expectorations d'un nourrisson. La bactérie a pu être cultivée sur un milieu agar contenant du sang (milieu de Bordet-Gengou, encore utilisé aujourd'hui avec quelques différences) et premièrement nommé *Haemophilus pertussis* ou *Bacillus pertussis* avant d'être renommé *Bordetella pertussis* en hommage à Jules Bordet par Moreno Lopez qui décrit le genre *Bordetella* dans les années 1950 (Moreno Lopez, 1954).

Le genre *Bordetella* comprend aujourd'hui neuf espèces distinctes. Parmi elles, *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* sont très proches génétiquement, dérivant d'un ancêtre commun, et considérées comme des sous-espèces (Park et al., 2012). Ces deux dernières furent identifiées quelques temps après *B. pertussis* dans les années 30 (Eldering and Kendrick, 1937). Elles sont capables d'infecter l'Homme mais les symptômes semblent moins sévères. Contrairement à *B. pertussis*, *B. parapertussis* est aussi retrouvée chez le mouton et *B. bronchiseptica* peut infecter de nombreux mammifères. On cite régulièrement ces 3 espèces comme formant le « complexe *bronchiseptica* ».

Les autres espèces ont été isolées plus récemment. *B. holmesii*, *B. trematum* et *B. ansorpii* ont été retrouvées dans des infections humaines. *B. avium* et *B. hinzii* ont été décrites dans des infections chez l'oiseau. Enfin, *B. petrii* est une bactérie environnementale isolée d'un bioréacteur anaérobie (Gerlach et al., 2001; Gross et al., 2010).

Ces bactéries sont des petits **bacilles à Gram négatif, de la classe des β -protéobactéries** dans l'ordre des *Burkholderiales* et de la famille des *Alcaligenaceae*. Ce sont des bactéries aérobies strictes à l'exception de *B. pertussis*, la plus éloignée phylogénétiquement, bien que des réminiscences des gènes nécessaires à la vie anaérobie soient encore présentes sur le génome de *B. bronchiseptica* par exemple (Gross et al., 2008).

2. Traitement, prévention et épidémiologie

B. pertussis est sensible à plusieurs antibiotiques, notamment l'érythromycine. Cet antibiotique est généralement utilisé afin de réduire la durée de la maladie et prévenir la contagion. Cependant, le traitement devient inefficace s'il est administré au-delà d'une semaine après l'apparition de la maladie et donc doit être administré rapidement. Il peut être utilisé en prophylaxie par l'entourage afin de réduire les risques de transmission (Sinha and Heath, 2005).

La meilleure des prophylaxies restant la vaccination, différents vaccins ont été développés pour se prémunir de la coqueluche et sont utilisés dans le monde. Ainsi sont utilisés des vaccins à germes entiers et des vaccins acellulaires.

Les vaccins à germes entiers ont été les premiers utilisés et le sont encore dans des pays en développement vu leur faible coût. Il s'agit de bactéries issues de cultures *in vitro* standardisées qui sont ensuite inactivées par voie chimique ou thermique avant administration avec un adjuvant.

Les vaccins acellulaires, utilisés dans de nombreux pays industrialisés, comportent différentes protéines antigéniques liées à la virulence de la bactérie. On y retrouve généralement l'hémagglutinine filamenteuse et la toxine pertussique inactivée (cf. I.A.4. Facteurs de virulence), mais parfois d'autres antigènes (Locht and Mielcarek, 2012).

Malgré une bonne couverture vaccinale (83% estimés en 2011), l'incidence de la maladie semble relativement stable au niveau mondial (200 milliers de décès pour plus de 30 millions de cas estimés en 2008 par l'OMS, fig. 1). Cependant, dans les pays industrialisés où la vaccination est depuis longtemps en vigueur, **on note une certaine résurgence de la maladie**, comme aux Etats-Unis (recensée par le CDC, « Center for Disease Control and Prevention ») et en France (surveillance par des réseaux comme « Renacoq », Guiso et al., 2011).

Le seul réservoir connu de *B. pertussis* est l'Homme. Elle est très contagieuse et capable d'infecter un individu immunocompétent, mais sa gravité est surtout mesurée chez **les nourrissons**, qui **représentent la population la plus à risque**, le programme vaccinal se terminant vers l'âge de 6 mois. Ainsi une nouvelle stratégie de vaccins vivants atténués qui seraient administrés à la naissance est à l'étude (Mielcarek et al., 2006a). De plus, l'immunité induite par les vaccins (comme celle induite par la maladie, mais qui serait tout de même plus forte) s'estompe au cours du temps, avec une durée estimée d'une dizaine d'années. Ce sont les adultes qui sont le plus grand réservoir, assurant environ 80% de la transmission de la maladie.

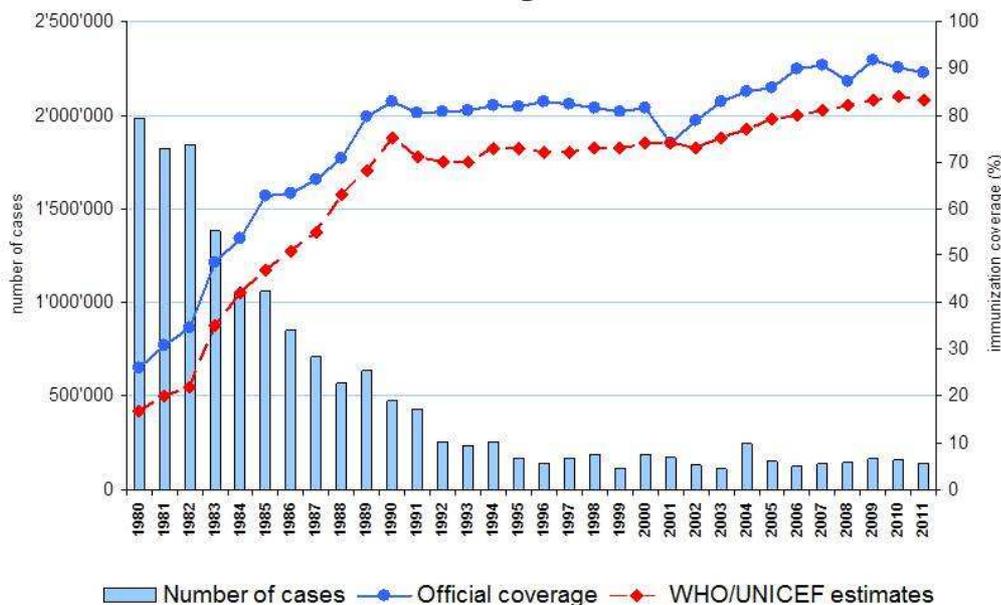


Figure 1 Représentation graphique de l'incidence de la maladie et de la couverture vaccinale contre la coqueluche entre 1980 et 2011.
Source : WHO/IVB Database, 2012.

3. Pathogénie de la coqueluche

La maladie se déroule suivant un cycle particulier. Tout d'abord la contamination se fait par aérosol au contact d'une personne infectée. La bactérie va alors coloniser l'épithélium du tractus respiratoire supérieur, la trachée et les bronches particulièrement au niveau de cellules ciliées, grâce à ses facteurs de virulence de type adhésines (fig. 2). La colonisation est accentuée lors du **syndrome infectieux**, les bactéries se répliquent activement au niveau de cet épithélium. Suite à cette multiplication intensive, les toxines de la bactérie entrent en jeu et génèrent le **syndrome toxinique** au cours duquel l'épithélium cilié est détruit (Hewlett, 1997).



Figure 2 Image recomposée de microscopie électronique. *Bordetella pertussis* infectant des cellules ciliées. Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings

Les symptômes engendrés par la maladie suivent alors trois phases :

- La **phase catarrhale**, commence généralement 4 à 10 jours après infection et peut s'étendre sur 2 semaines. Elle ressemble tout d'abord à un rhume mais, durant cette phase, les symptômes empirent au cours du temps. On peut notamment trouver de la fièvre en réaction à l'inflammation locale, et il y a hypersécrétion de mucus générant la toux pour qu'il soit éliminé avec des débris tissulaires et des bactéries. C'est donc au cours de cette phase que la contagion devient possible. Le traitement doit être administré durant cette phase pour être efficace et en son absence la phase suivante sera atteinte.
- La **phase paroxystique** va durer de 1 à 4 semaines. Pendant cette phase la toux est encore plus présente, se présentant sous forme de quintes de toux spasmodiques accompagnées d'une forte sécrétion de mucus et régulièrement de vomissements. Le « chant

du coq » est la toux caractéristique de la phase paroxystique mais ne se retrouve généralement pas chez l'adulte. Des complications peuvent survenir durant cette phase comme des infections bactériennes secondaires. Dans les cas les plus graves, la mort peut survenir suite à ces complications, essentiellement chez les nourrissons.

- La **phase de convalescence** qui peut durer plusieurs semaines correspond à la diminution progressive des symptômes. L'hyperlymphocytose qui a pu être observée dans la phase précédente se normalise mais souvent des infections respiratoires secondaires sont constatées. En absence de traitement une toux sèche peut persister plusieurs mois chez l'adulte qui peut alors devenir un réservoir de *B. pertussis* pour son entourage (Gregory, 2006).

Nous avons ainsi vu la pathogénie de *B. pertussis* qui n'infecte que les hôtes humains. Notons tout de même l'**importance vétérinaire du genre *Bordetella***, particulièrement au travers du pathogène à large spectre d'hôtes *B. bronchiseptica*, responsable d'infections chroniques comme la rhinite du porc qui peut être problématique dans les élevages ou encore la « toux du chénil » chez le chien (Gerlach et al., 2001).

B. Facteurs de virulence

La pathogénie de la bactérie est intimement liée à sa capacité de synthèse d'un grand nombre de facteurs de virulence, largement divisés en adhésines et toxines (Locht et al., 2001), que nous allons décrire ici. Il existe d'autres effecteurs de la virulence, notamment un système de sécrétion de type 3 dont la fonction chez *B. pertussis* est mal caractérisée, qui ne seront pas présentés ici.

1. Adhésines

Il existe plusieurs types d'adhésines et *B. pertussis* est capable de synthétiser plusieurs d'entre elles, ainsi nous verrons brièvement certaines de celles présentes chez *B. pertussis*.

- **L'hémagglutinine filamenteuse (FHA)** est l'adhésine majoritaire de *B. pertussis* et est donc toujours utilisée dans le vaccin acellulaire. Elle permet, entre autres, à la bactérie de coloniser les cellules épithéliales ciliées grâce à un domaine de reconnaissance de glucides (Prasad et al., 1993) ainsi qu'en ayant une certaine affinité pour les glycosaminoglycanes sulfatés, comme l'Héparine, présents à la surface des cellules épithéliales et dans la matrice extracellulaire (Hannah et al., 1994). La FHA est aussi capable d'interagir avec les intégrines via un motif RGD (Relman et al., 1990). Elle possède aussi des propriétés d'immuno-modulation complexes (Locht et al., 2001) que nous ne discuterons pas. Elle a aussi été décrite comme intervenant dans la formation de biofilms par interactions bactérie-bactérie (et ainsi impliquée dans l'auto-agrégation) et bactérie-substrat (Serra et al., 2011).

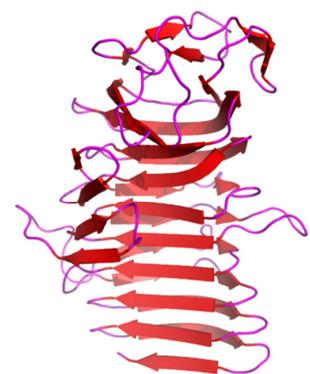


Figure 3 Représentation d'une portion de la FHA montrant son repliement bêta caractéristique (code PDB : 1RWR)

La FHA est une grande protéine, sa forme mature est d'environ 220 kDa. Elle se replie sous une forme d'hélice bêta allongée (fig. 3). Elle est prise en charge par le système de sécrétion sec afin d'être dirigée dans le périplasme d'où elle sera sécrétée vers le milieu extérieur par le transporteur FhaC, un des prototypes de la superfamille des transporteurs Omp85-TpsB («Outer Membrane Protein - Two-Partner Secretion», Clantin et al., 2007). Après sa maturation par une protéase spécifique, SphB1, elle reste partiellement, associée à la surface bactérienne ou est relarguée dans le milieu extracellulaire (Coutte et al., 2001).

- **Les fimbriae (Fim)** aussi nommés pili ou agglutinogènes sont de longues structures filamenteuses. Chez *B. pertussis*, il existe 2 protéines majeures Fim2 et Fim3 qui sont accompagnées d'une même sous-unité mineure FimD pour la construction du pilus. Ils sont capables de lier l'héparine et ainsi jouent un rôle important dans l'adhérence aux cellules épithéliales en coopération avec la FHA (Geuijen et al., 1998; Mooi et al., 1992). Les protéines Fim2 et Fim3 sont parfois présentes dans les vaccins acellulaires.

- **La pertactine (PRN)** est une protéine de la famille des auto-transporteurs. Elle permet l'adhésion aux intégrines, notamment des cellules épithéliales, par l'intermédiaire d'un motif RGD, et serait impliquée dans la résistance aux neutrophiles (Inatsuka et al., 2010). La pertactine peut être associée aux vaccins acellulaires.

- **Le facteur de colonisation trachéale (Tcf)** fait aussi partie de la famille des auto-transporteurs et peut se retrouver associé à la bactérie ou être relargué dans le milieu extracellulaire. Il est spécifique de *B. pertussis* et est impliqué, sans surprise, dans la colonisation de la trachée (Finn and Stevens, 1995).

2. Toxines

Diverses toxines sont synthétisées par *B. pertussis* et seront exemplifiées ici.

- **Le lipopolysaccharide (LPS)**, aussi nommé **endotoxine**, est une structure **commune aux bactéries à Gram négatif** ancrée dans leur membrane externe. Grossièrement, le LPS se compose d'une partie hydrophobe (le lipide A), et d'une partie hydrophile, polysaccharidique, composée d'un noyau (core) auquel se greffe l'antigène O (fig. 4). Le lipide A représente la partie toxique et n'est normalement relargué en quantité que lors de la lyse bactérienne. Il a été montré que chez *B. pertussis* le LPS agit en collaboration avec la toxine cytotrachéale (Turcotte et al., 1997). Le LPS peut être modifié entre les phases de virulence chez *B. bronchiseptica* et *B. parapertussis* au moins au niveau de l'antigène O qui n'est ainsi produit qu'en phase d'avirulence (Cummings et al., 2006).

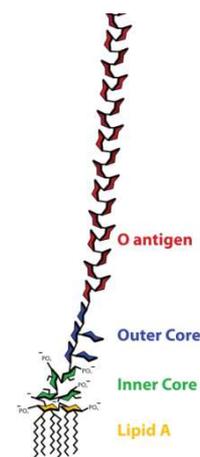


Figure 4
Représentation schématique de la structure du LPS. Source : <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide>

- **La toxine cytotrachéale (TCT)** est en fait un glycopeptide provenant de la dégradation du peptidoglycane. Chez *B. pertussis*, le transporteur AmpG est inefficace dans

son recyclage et ainsi la TCT est relarguée (Mielcarek et al., 2006b). Elle provoque la destruction des cellules ciliées et empêche leur réparation, entravant ainsi l'élimination du mucus (Cookson et al., 1989).

- **La toxine pertussique (PTX)** est la toxine de *B. pertussis* la plus importante du point de vue immunitaire et est donc partie intégrante du vaccin acellulaire sous forme détoxifiée (génétiquement par substitutions des résidus catalytiques, par la chaleur ou par voie chimique). Elle va entraîner des perturbations de la signalisation dans de nombreux types cellulaires chez l'hôte causant de nombreux troubles systémiques (hyperinsulinémie, lymphocytose...). Ces troubles sont liés à son activité d'ADP-ribosylation de protéines G trimériques. En effet, elle entraîne une perte de l'inhibition de l'activité adénylate cyclase ce qui génère une augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, un important messager dans la signalisation cellulaire (Locht et al., 2011).

La PTX est une toxine soluble très complexe composée de 5 sous-unités distinctes nommées de S1 à S5 par ordre de grandeur. La structure de la protéine (code PDB : 1PRT) révèle une forme pyramidale et la présence de 2 sous-unités S4 dans la toxine complète. La sous-unité S1 forme le sommet de la pyramide et possède l'activité d'ADP-ribosylation (fig. 5). Cette toxine serait assemblée dans le périplasma après transport par le système sec et sécrétée sous sa forme complète par la machinerie Ptl, un système de sécrétion de type IV (Locht et al., 2011).

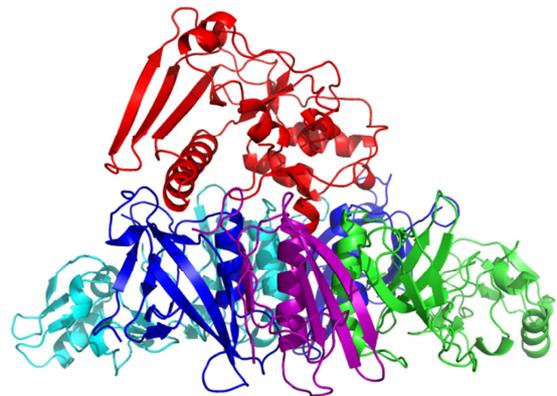


Figure 5 Vue de face de la toxine pertussique (code pdb : 1BCP). Sont figurés en rouge la sous-unité S1, en vert S2, en cyan S3, en bleu les deux sous-unités S4 et en violet S5.

Des souches ayant une expression accrue de la toxine sont associées à la résurgence de la maladie en Europe et en Amérique (Mooi, 2009).

- **L'adénylate cyclase / hémolysine (CyaA ou ACT)** va pouvoir elle aussi influencer sur les voies de signalisation des cellules hôtes par production d'AMP cyclique. Elle possède dans sa partie N-terminale le domaine catalytique adénylate cyclase dont l'activité est très fortement accrue par la calmoduline (fig. 6, Guo et al., 2005). Sa partie C-terminale définit quant à elle un domaine permettant la translocation du domaine catalytique au travers d'une membrane plasmique. Ce domaine forme ainsi des pores qui vont mener à la lyse cellulaire (Basler et al., 2006; Ladant and Ullmann, 1993).

Outre son importance dans la pathogénie, il a été démontré que la séparation en fragments du domaine catalytique de CyaA (fig. 6) empêche son activité en absence de calmoduline. L'implication de l'AMP cyclique comme second messager, permettant l'activation de la transcription de gènes spécifiques chez les procaryotes, a permis la

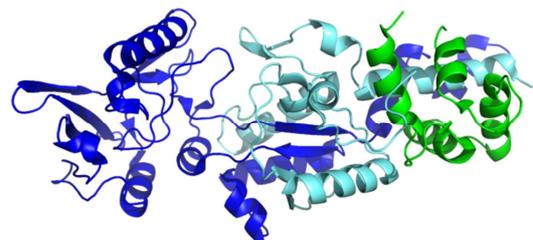


Figure 6 Représentation du domaine catalytique adénylate cyclase CyaA (code PDB : 1ZOT) en nuance de bleus, représentant les fragments séparables. La calmoduline est représentée en vert.

création d'un système original de double hydride bactérien permettant d'identifier des interactions entre deux partenaires protéiques (Karimova et al., 1998).

- **La toxine dermonécrotique (DNT)** est une protéine cytoplasmique, sans doute libérée uniquement lors de la lyse bactérienne, et dont le rôle dans la pathogénie reste mal défini. Cependant, elle est létale chez la souris injectée sous forme purifiée et serait capable de modifier la petite GTPase Rho par déamination ou polyamination rendant son activité constitutive (Locht et al., 2001).

Ces facteurs de virulence sont en réalité majoritairement conservés au sein du genre *Bordetella*, particulièrement au sein du complexe *bronchiseptica* hormis la toxine pertussique et le facteur de colonisation trachéale, spécifiques à *B. pertussis* (Gross et al., 2010). Leur expression est sous la dépendance d'un régulateur central de virulence, le système à deux composants BvgAS (fig. 7).

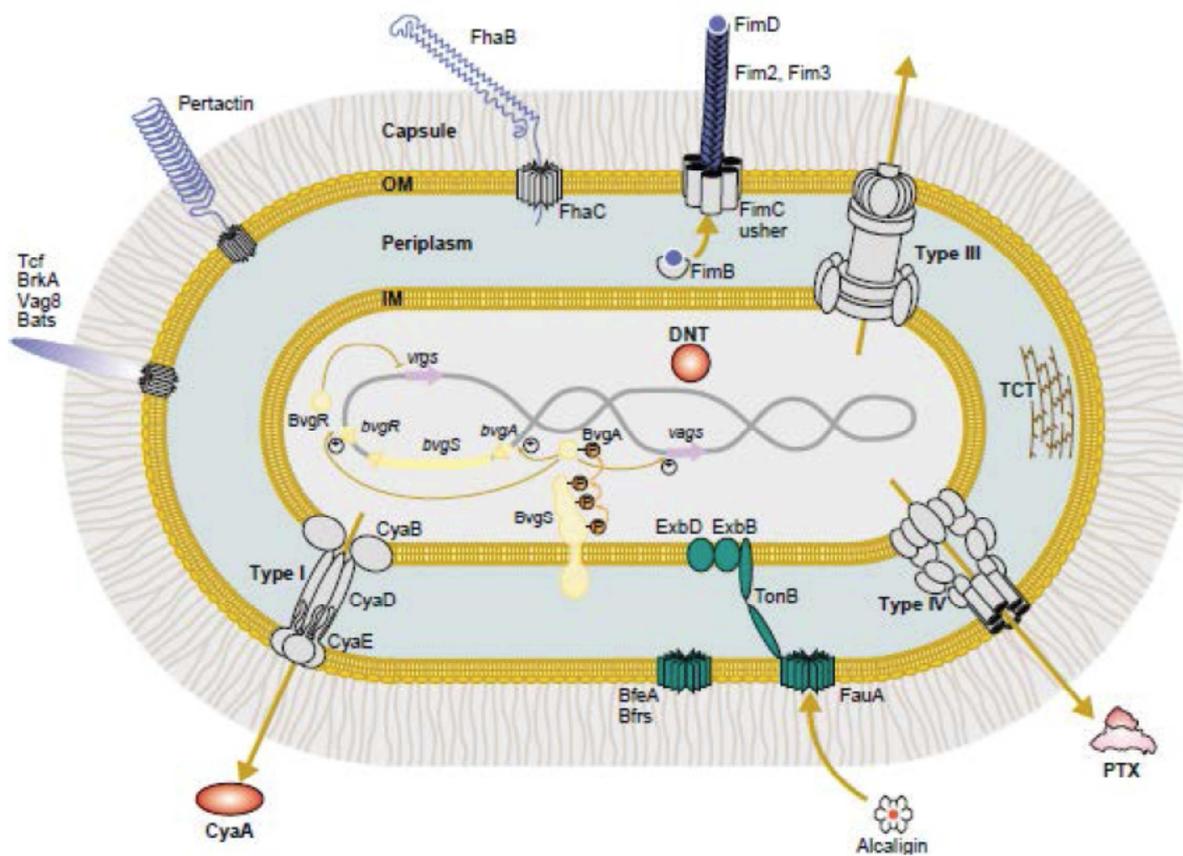


Figure 7 Représentation schématique d'une cellule de *B. pertussis* avec ces différents facteurs de virulence dont la synthèse est sous la dépendance de l'activité du système à deux composants BvgAS. Tiré de Locht et al., 2001.

Ce système à deux composants va particulièrement nous intéresser étant donné son rôle primordial dans la régulation de la virulence de *B. pertussis*. Ainsi nous verrons d'abord ce que sont les systèmes à deux composants au travers de généralités et d'exemples avant de faire le point des connaissances actuelles disponibles sur ce système particulier qu'est BvgAS.

II. Régulation génétique et systèmes à deux composants

Afin de s'adapter à leur environnement, les bactéries ont dû mettre en œuvre des systèmes permettant la régulation de l'expression de leur matériel génétique. En effet, les conditions environnementales vont varier et ainsi le métabolisme de la bactérie doit s'adapter pour permettre sa survie. De plus, la synthèse protéique a un coût énergétique élevé et il est donc préférable de n'exprimer que ce qui est utile à la vie dans le milieu environnant, qu'il s'agisse d'adaptation aux nutriments pour une meilleure utilisation, de facteurs permettant une meilleure colonisation de l'environnement ou encore une résistance à divers stress rencontrés. Ainsi **il est nécessaire à la bactérie de pouvoir percevoir des stimuli particuliers** qui reflètent les conditions extérieures **et de transmettre ces signaux** pour qu'ils puissent être **interprétés au niveau génétique** particulièrement, mais aussi au niveau comportemental comme dans le cas de la chimiotaxie.

A. Les systèmes à deux composants

La régulation génétique se fait au travers de mécanismes complexes. Les trois classes majoritaires de systèmes intervenant dans cette régulation sont les facteurs sigma, les systèmes à un composant et les systèmes à deux composants, qui vont nous intéresser particulièrement ici.

1. Autres régulateurs génétiques

Commençons donc par voir très sommairement les systèmes de régulation autres que les systèmes à deux composants employés par les bactéries.

a. Facteurs sigma

Les facteurs sigma sont en réalité des sous-unités protéiques de l'ARN polymérase et vont ainsi permettre la transcription des gènes nécessitant leur présence spécifique. Cette propriété fait d'eux les régulateurs majeurs de l'expression génétique chez les procaryotes. Ainsi, ils vont être impliqués dans la régulation de nombreux processus, et la virulence est aussi l'un d'entre eux (Wilson, 2002). Ils peuvent être complexés à des facteurs « anti-sigma » qui les séquestrent en attente du signal libérateur adéquat.

b. Systèmes à un composant

Les systèmes à un composant sont des protéines solubles, contenant généralement un domaine senseur (de petites molécules) directement lié à un domaine effecteur, le plus souvent un domaine de liaison de l'ADN. Ces systèmes sont les plus répandus chez les procaryotes où ils assurent la majorité de la transduction de signal au niveau cytoplasmique. Certains systèmes à deux composants sont aussi entièrement cytoplasmiques mais ils représentent moins de 20% de cette famille de systèmes (Ulrich et al., 2005).

2. Que sont les systèmes à deux composants ?

Comme leur nom l'indique, **les systèmes à deux composants sont des systèmes impliquant deux partenaires protéiques**. Le premier est **le capteur** qui va permettre la captation des signaux au travers d'un domaine senseur et leur transduction grâce à un domaine Histidine-Kinase (HK) qui va s'autophosphoryler dans des conditions activatrices. Le second est **un régulateur de réponse**, possédant typiquement un domaine receveur pouvant être phosphorylé et qui va réguler la capacité de fixation à l'ADN de son second domaine, souvent de type Hélice-Tour-Hélice (HTH, Stock et al., 2000; Wuichet et al., 2010).

On retrouve ce type de systèmes dans tous les règnes du vivant hormis chez les animaux, ce qui en fait une **cible thérapeutique potentielle** dans la lutte contre les infections bactériennes où ils sont particulièrement bien représentés, soit environ 1% des protéines encodées (Casino et al., 2010; West and Stock, 2001). Au vu de la grande variété de ces systèmes, et de leurs régulons associés au travers de l'ensemble des procaryotes notamment, il est impossible d'être exhaustif sur leurs capacités. Nous illustrerons donc ici en partie la variété de ces systèmes à deux composants au travers de la composition, l'architecture et l'espace de perception du capteur.

Ainsi, les systèmes à deux composants permettent la perception dans différents compartiments : le cytoplasme, la membrane et le milieu extracytoplasmique (Fig. 8, Cheung and Hendrickson, 2010; Mascher et al., 2006). Enfin, nous décrivons brièvement les régulateurs de réponse associés.

a. Perception cytoplasmique

Il existe divers senseurs cytoplasmiques pouvant être liés à des histidine-kinases. Dans ce cas, le capteur-kinase peut être entièrement cytoplasmique ou lié à la membrane par un ou plusieurs segments transmembranaires (Mascher et al., 2006). Des domaines de la famille **GAF** (phosphodiesterases spécifique du GMPc, Adénylate cyclase et FhlA) ainsi que **des phytochromes** peuvent être présents dans ces capteurs. On peut aussi retrouver **des domaines de la superfamille PAS** que nous verrons en partie V et dont les mécanismes de perception cytoplasmique ne seront pas détaillés ici. On retrouve parfois tous ces types de domaines combinés (Cheung and Hendrickson, 2010). Ainsi ces domaines vont permettre la perception de nombreux signaux différents, comme **la lumière, l'oxygène, le potentiel rédox, de petites molécules** souvent liées au métabolisme (Krell et al., 2010; Mascher et al., 2006)...

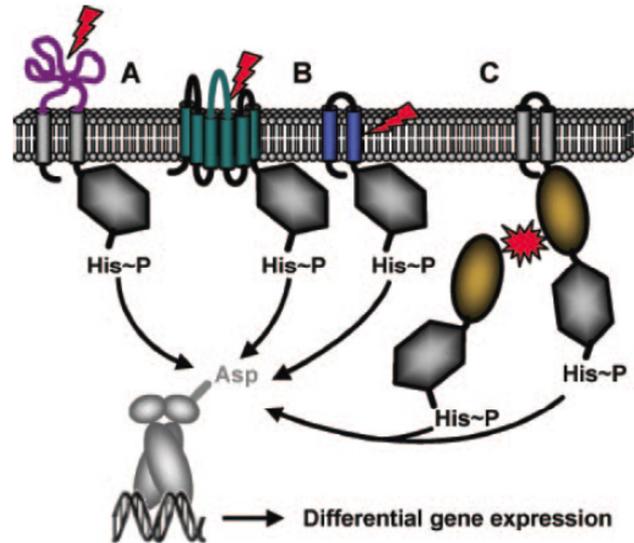


Figure 8 Représentation schématique de l'organisation des capteurs de systèmes à deux composants. A : la perception extracytoplasmique, B : la perception membranaire et C : la perception cytoplasmique, l'éclair rouge représentant un stimulus.

De façon intéressante, on retrouve aussi, au niveau cytoplasmique de certains capteurs-kinases liés à la membrane, **des domaines HAMP** (un type de domaine protéique souvent associé à des Histidine-kinases (HKs), des Adénylates cyclases, des protéines accepteuses de Méthyl et des Phosphatases). Cependant, ces domaines ne seraient pas liés à la perception de signaux mais plutôt à la **transduction du signal** provenant d'autres domaines de perception vers l'histidine-kinase (Parkinson, 2010).

b. Perception membranaire

Certains capteurs-kinases possèdent des **domaines transmembranaires de perception**. Il en existe une grande variété, **possédant de deux à vingt segments transmembranaires**. Ils vont permettre de répondre à des stimuli différents comme **la température, la pression de turgescence ou d'autres stress liés à l'enveloppe bactérienne** (Mascher et al., 2006). Un exemple intéressant est celui du capteur-kinase DesK de *B. subtilis* qui permet la perception des basses températures en « mesurant » l'épaisseur de la membrane. Cette protéine contient normalement cinq segments transmembranaires mais un système minimal contenant un seul segment peut être fonctionnel (Cybulski et al., 2010). BvgS étant sensible à la température comme nous le verrons ensuite, on ne peut exclure que cette sensibilité pourrait suivre les mêmes modalités.

c. Perception extracytoplasmique

Différents domaines protéiques sont associés aux kinases pour permettre la perception dans cet espace. On peut notamment citer **des domaines de type VFT** auxquels la partie IV est dédiée ou **des domaines PAS** auxquels la partie V est consacrée. Cependant il ne s'agit pas des seuls types de domaines que l'on peut retrouver dans cet espace de perception, ainsi d'autres petits domaines permettent la perception extracytoplasmique, dont **des domaines entièrement en hélices alpha**, ou encore de petits domaines globulaires, voire des boucles extracytoplasmiques reliant deux segments transmembranaires (Mascher et al., 2006).

Ainsi nous verrons les exemples des systèmes TorRS, possédant un domaine en hélices alpha, et PhoPQ ayant un domaine PAS périplasmique, les systèmes possédant des domaines VFT étant traités dans une partie ultérieure (IV.B.5.a.2.).

1) PhoPQ

Le système à deux composants PhoPQ existe dans plusieurs espèces bactériennes à Gram négatif, pathogènes ou non. **Ce système permet une réponse adaptative dans un milieu carencé en magnésium**. Cependant, la composition de son régulon va varier en fonction de l'espèce à laquelle il appartient. En effet, l'adaptation aux conditions environnementales doit aussi refléter le mode de vie de la bactérie, ainsi entre une bactérie non pathogène comme certains *E. coli* et une bactérie pathogène proche comme *Salmonella typhimurium* (Wilson, 2002), une carence en magnésium n'a pas la même signification. En effet, chez le pathogène, cette carence indique l'entrée dans un milieu intracellulaire chez l'hôte et va donc contribuer à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la virulence. Ainsi, le régulon entre ces espèces est très différent et seulement quelques gènes sont communs (Monsieurs et al., 2005).

PhoQ est un régulateur de réponse classique activant le régulon une fois phosphorylé par PhoP, le capteur-kinase. **PhoP se compose d'un domaine PAS périplasmique** (possédant de petites extensions N- et C-terminales) précédé et suivi par **des hélices transmembranaires** puis **un domaine HAMP** et enfin **une histidine-kinase** (Goldberg et al., 2010). C'est le domaine PAS périplasmique qui va conférer la sensibilité à la concentration en magnésium en interagissant avec ces cations divalents. Celui-ci possède une surface acide conservée orientée vers la membrane qui est capable de maintenir une interaction avec les têtes polaires de lipides chargées négativement par l'intermédiaire de cations métalliques (Cho et al., 2006). Ainsi l'absence de ces cations entraînerait une répulsion entre cette surface acide et les lipides, générant un changement conformationnel permettant l'activation de la kinase. Notons que le segment transmembranaire a un rôle clé dans la transmission de signal du domaine PAS vers le domaine HAMP, probablement en relayant une différence de tension, et ainsi sa composition est importante (Goldberg et al., 2010).

Chez *S. typhimurium*, le système PhoPQ est **impliqué dans la régulation de la virulence** et régule, entre autres, la modification du lipide A et la résistance aux peptides antimicrobiens. Ainsi il a été démontré qu'il était aussi **capable de répondre à la présence de ces peptides antimicrobiens**. Ces derniers vont provoquer un déplacement des cations en venant s'insérer à leur place agissant comme un levier et mimant l'absence de cations (fig. 9, Mascher et al., 2006). Chez un autre pathogène, *Edwardsiella tarda* notamment responsable de septicémies chez l'Homme, l'homologue du système est aussi impliqué dans la régulation de la virulence. A l'instar des autres systèmes homologues, il permet la perception du magnésium pour réagir à une carence mais dans ce système il a été démontré que **la température est aussi perçue** pour permettre l'activation du système. La température est un facteur important de régulation pour la survie et la pathogénie, par exemple la température corporelle de l'hôte est généralement en adéquation avec la capacité de synthèse maximale de certains facteurs de virulence. Ainsi, il semble normal que la température puisse être perçue par des systèmes de régulation de la virulence (Chakraborty et al., 2010).

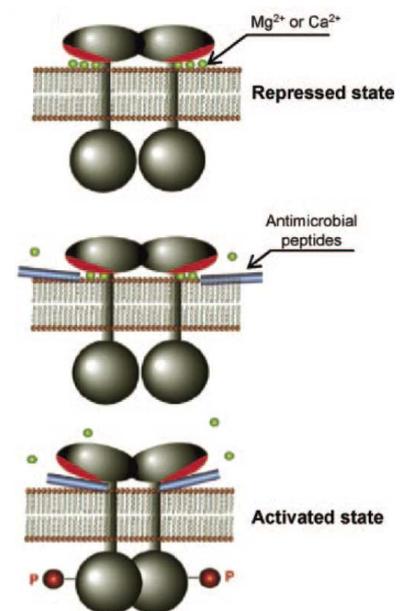


Figure 9 Représentation schématique du mécanisme d'activation du système PhoPQ de *S. typhimurium* par des peptides antimicrobiens. Ce mécanisme reflète aussi l'activation en absence de cation. Tiré de Mascher et al., 2006.

2) TorRS

Le système à deux composants **TorRS est impliqué dans la régulation de la réponse au triméthylamine N-oxyde (TMAO)**. Le TMAO est un composé chimique utilisé généralement dans les organismes aquatiques comme osmorégulateur. Il est aussi souvent utilisé comme accepteur terminal d'électrons de la chaîne respiratoire en conditions anaérobies. Chez *E. coli* ou *Vibrio parahaemolyticus* par exemple, **il va permettre la régulation de l'opéron torCAD**. Ainsi, lorsque le régulateur de réponse TorR est phosphorylé, les protéines TorC, un cytochrome de type c, TorA, une réductase terminale du TMAO, et TorD, une chaperone

spécifique de TorA, sont produites et permettent la réduction du TMAO et finalement son utilisation comme accepteur d'électrons (Moore and Hendrickson, 2009).

Une caractéristique intéressante de ce système est qu'**il consiste en fait en trois composants, faisant intervenir** en sus **un domaine VFT** (de type 1, cf. IV.A.1.), TorT, capable de lier le TMAO et indispensable au fonctionnement du système, puisque son absence rend le système inactif. En effet, après liaison du TMAO, TorT va avoir une meilleure capacité d'interaction avec le domaine périplasmique de TorS et serait ainsi responsable de modification structurale induisant l'activation du système. Ce domaine VFT n'a pas été décrit comme impliqué dans le transport (Baraquet et al., 2006).

Le domaine périplasmique de TorS est aussi particulier. Il s'agit d'un domaine entièrement en hélices alpha formant des paquets de quatre hélices. Sa topologie dans la région précédant immédiatement la membrane est semblable à celle de domaines senseurs d'autres protéines d'*E. coli* comme NarX (un senseur à nitrate) ou Tar (récepteur à l'aspartate dans la chimiotaxie) mais avec un paquet d'hélices supplémentaires formant la zone d'arrimage de TorT (Moore and Hendrickson, 2009).

Dans le cas de TorS, c'est la conformation du VFT (ligandé ou non) qui va induire les changements conformationnels. En effet, le domaine périplasmique de TorS en interaction avec TorT va former un hétérotétramère (un dimère de TorS associé à deux molécules de TorT, fig. 10). Ainsi, le changement conformationnel induit par la liaison du TMAO par TorT sera répercuté au niveau de TorS. Ce changement conformationnel induit une transition entre une conformation asymétrique (en absence de TMAO) vers une conformation symétrique (en présence de TMAO) du domaine périplasmique de TorS. La symétrie permettrait donc une activité de phosphorylation tandis que l'asymétrie permettrait une activité phosphatase de l'histidine-kinase. Ce mécanisme pourrait être commun à de nombreux capteurs-kinases (Moore and Hendrickson, 2012).

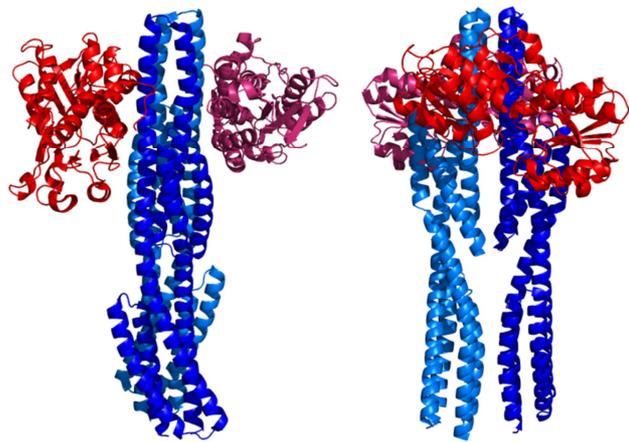


Figure 10 Représentation du domaine périplasmique de TorS de *V. parahaemolyticus* (en bleu) en interaction avec TorT (en rouge) sous sa forme non ligandée (code PDB : 3O1I). La nuance de couleur représente les monomères distincts. Une rotation de 90° est présente entre les 2 images.

d. Multiplicité de la perception

Evidemment, **les différentes zones de perception de signaux** décrites précédemment **ne sont pas exclusives** et ainsi de nombreux capteurs-kinases possèdent plusieurs domaines de perceptions dans des compartiments différents. BvgS fait partie de cette catégorie, possédant trois domaines putatifs de perception, deux domaines périplasmiques de type VFT et un domaine cytoplasmique de type PAS, reliés par un segment transmembranaire qui pourrait lui aussi percevoir des signaux relatifs à la membrane (comme la température) bien qu'il ne s'agisse que de spéculations. L'exemple de BvgS est loin d'être unique, en effet il existe toute

une famille de capteurs de ce type (cf. IV.B.5.a.2). Outre cette famille, d'autres exemples existent mais ne seront pas discutés ici au vu de leur diversité.

e. Régulateurs de réponse

Les régulateurs de réponses (RR) sont typiquement composés d'un domaine receveur phosphorylable suivi d'un domaine de liaison à l'ADN. Ils ont une structure très conservée de type $(\beta\alpha)_5$ où chaque brin bêta est suivi d'une hélice et s'organisent ainsi autour d'un feuillet beta parallèle central de cinq brins entourés de cinq hélices alpha (fig. 11). Ils sont partie intégrante du régulateur de réponse mais dans certains cas ils sont aussi directement associés à un capteur kinase ou présents seuls sous forme soluble (Bourret, 2010).

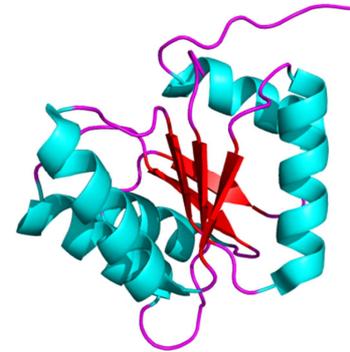


Figure 11 Représentation d'un domaine receveur classique (code PDB : 2R25). L'hélice alpha 1 est à droite.

La phosphorylation du domaine receveur va entraîner un réarrangement structural qui va permettre la fonction du régulateur de réponse, par exemple en **permettant** la dimérisation mais particulièrement **la fixation de l'ADN** (Bourret, 2010; Foussard et al., 2001).

Il existe une spécificité d'interactions entre le régulateur de réponse et le domaine qui va lui transférer le groupement phosphate ce qui va permettre d'éviter au maximum les interférences entre systèmes indépendants, un point sur lequel nous reviendrons (cf. II.B.3. Transfert de phosphate, Szurmant and Hoch, 2010).

3. Des systèmes à deux composants... et plus

Nous avons donc vu que les systèmes à deux composants permettent la transduction d'un grand nombre de signaux en ayant recruté des domaines protéiques variés permettant leur perception. **La régulation de l'activité kinase va alors dépendre de ces domaines de perception, mais d'autres systèmes ou des protéines accessoires peuvent aussi intervenir** (Goulian, 2010), notamment des phosphatases (Silversmith, 2010) à l'instar de SixA, une phosphatase spécifique de ArcB dont des homologues se retrouvent dans de nombreuses bactéries (Krell et al., 2010; Malpica et al., 2006). De même **il peut y avoir une interconnexion entre des systèmes à deux composants et des systèmes de transport** (Tetsch and Jung, 2009), un exemple frappant est celui du régulon phosphate chez *E. coli* dans lequel la régulation des différents gènes du régulon est liée à l'activité du transporteur (Hsieh and Wanner, 2010) et nous reviendrons brièvement sur cette particularité dans une partie ultérieure (IV.B.5.a.1).

D'un autre côté, **de nombreux systèmes différents peuvent être présents au sein d'une cellule et ainsi il existe une spécificité entre un capteur particulier et le régulateur de réponse qui lui est associé** (Szurmant and Hoch, 2010). Cependant, **il existe des interactions entre plusieurs systèmes** comme des kinases phosphorylant plusieurs régulateurs de réponse, un même régulateur de réponse phosphorylé par plusieurs kinases... Ces interférences entre

systèmes **sont des éléments de régulation possibles dans la signalisation cellulaire** parfois nécessaires, parfois accessoires, ce qui définit différentes catégories d'interconnexion entre systèmes (Laub and Goulian, 2007). Il est possible qu'un régulateur de réponse soit phosphorylé par une kinase autre que celle qui lui est normalement associée (avec une cinétique tout de même bien plus lente) et dans ce cas c'est l'activité phosphatase du domaine kinase qui va permettre la déphosphorylation du régulateur et ainsi prévenir des erreurs de signalisation (Podgornaia and Laub, 2013). Malgré l'importance possible de ces mécanismes et les exemples existants, nous ne les discuterons pas plus avant.

Ainsi, **l'activité de l'histidine-kinase**, régulée par les domaines de perception des protéines capteurs des systèmes à deux composants, **est la clé de l'activité du système** en régulant la phosphorylation du régulateur de réponse associé. Nous allons donc voir plus précisément ce que sont les histidine-kinases et comment elles permettent de modifier l'état de phosphorylation dudit régulateur.

B. Les domaines Histidine-Kinase

L'activité des systèmes à deux composants dépend du domaine enzymatique qui leur est associé, l'histidine-kinase. Il existe deux architectures différentes d'histidine-kinases (HK), dont les fonctions et les mécanismes de régulation sont distincts. Elles représentent ainsi les classes 1 (dont la kinase EnvZ d'*E. coli* est le prototype) et 2 (dont la kinase CheA d'*E. coli* est le prototype) que nous allons voir ici (fig. 12, Dutta et al., 1999). Nous nous intéresserons ensuite aux mécanismes de transfert d'un groupement phosphate entre les différents partenaires.

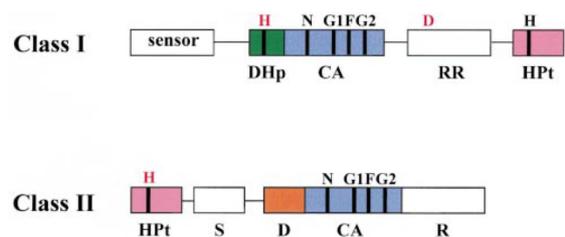


Figure 12 Représentation schématique de l'organisation des histidine-kinases de classes 1 et 2. Le H rouge représente l'histidine phosphorylable. Les domaines RR et Hpt représentés dans la classe 1 ne sont pas toujours présents. Les abréviations sont reprises dans le texte ci-après. Tiré de Dutta et al., 1999.

1. Classe 1

La classe 1 des histidine-kinases est la plus courante. Elle se retrouve en majorité dans des systèmes homodimériques liés à la membrane, et le domaine histidine-kinase de BvgS appartient à cette classe d'où son intérêt particulier pour notre étude. Ces domaines font donc partie de protéines capteurs multi-domaines, et des domaines senseurs situés en position N-terminale de la kinase vont réguler son activité (Dutta et al., 1999). Nous nous intéresserons à cette régulation dans une partie ultérieure (V.C.3. Transduction du signal vers la kinase) et ici nous verrons les mécanismes de phosphorylation intrinsèques au fonctionnement de ces domaines.

a. Architecture

Les domaines Histidine-Kinase de la classe 1 ont une taille d'environ 250 résidus et se composent de deux sous-domaines de fonctions distinctes (Marina et al., 2005):

- **le domaine DHp** (Dimérisation et Histidine phosphotransfert), qui permet la dimérisation et porte l'histidine phosphorylable. Il se compose de deux hélices alpha ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) qui forment un paquet de quatre hélices ; l'histidine phosphorylable se trouve sur l'hélice de la portion N-terminale ($\alpha 1$) et est normalement orientée vers le solvant.

- **le domaine CA** (Catalytic ATP-binding) qui est le domaine actif de phosphorylation de l'histidine permettant la liaison de l'ATP. Il est repérable par la présence de motifs conservés que sont les boîtes N, G1, F et G2 (Foussard et al., 2001). Il se replie de façon particulière, suivant un sandwich mix α/β comportant 5 brins bêta et trois hélices alpha aussi nommé « repliement Bergerat ». Cette structure s'apparente aux domaines de liaison de l'ATP de la famille des ATPases et forme avec elle la superfamille GHKL (Casino et al., 2010; Marina et al., 2005).

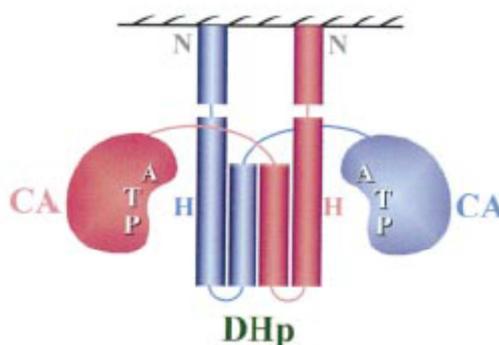


Figure 13 Représentation schématique de l'organisation de l'histidine-kinase de type 1 de EnvZ. Chaque monomère a sa propre couleur. Les abréviations sont reprises dans le texte. Tiré de Dutta et al., 1999.

Dans la classe 1 ces deux sous-domaines sont directement reliés par une boucle non structurée (fig. 13, Dutta et al., 1999; Stewart, 2010).

b. Activité kinase et phosphatase

Afin qu'il puisse y avoir une réaction de phosphorylation, **il est d'abord nécessaire que la kinase forme un dimère**. Cette dimérisation se fait au niveau du domaine DHp comme nous l'avons vu précédemment. **Elle est permise par de larges zones d'interfaces entre les hélices de ce domaine**. Les DHp des monomères vont s'associer de sorte à former un paquet de quatre hélices stabilisé par des interactions entre résidus conservés selon une alternance de résidus hydrophobes enfouis dans l'interface (cf. V.C.1. Enroulement d'hélices) et de résidus hydrophiles exposés mais permettant aussi la formation de ponts hydrogène ou salins entre les chaînes (Marina et al., 2005). Les hélices $\alpha 1$ ont aussi tendance à former un enroulement d'hélices (« coiled-coil ») dimérique qui va permettre entre autres le couplage aux domaines en amont et nous y reviendrons dans une partie ultérieure (V.C.3.).

La première étape dans la signalisation par les systèmes à deux composants est la phosphorylation de l'histidine du domaine DHp. Cette étape est rendue possible par la proximité entre le domaine DHp et le domaine catalytique au travers d'interactions situées entre eux grâce à des résidus particuliers du domaine catalytique particulièrement au niveau du site de fixation de l'ATP. Ainsi le groupement phosphate γ de l'ATP va être exposé et proche de l'histidine du DHp qui va pouvoir l'attaquer et ainsi être phosphorylée. Le

phosphate sera transféré très rapidement au domaine receveur associé (Casino et al., 2010; Dago et al., 2012).

Dans de nombreuses kinases il a été démontré que **la phosphorylation se fait en « trans »** (le domaine catalytique d'un monomère phosphoryle le résidu histidine de l'autre) mais **la phosphorylation en « cis »** (au sein d'un même monomère) existe dans certains systèmes. Les particularités amenant à ces deux procédés différents sont mal comprises mais la longueur et l'orientation de la connexion entre les domaines DHp et CA semblent être particulièrement importantes (Casino et al., 2010).

Le phosphate peut alors être transféré vers le domaine receveur (cf. III.B.3. Le transfert de phosphate), qui est en contact avec le domaine histidine-kinase. **Le processus de phosphorylation est dépendant de l'organisation relative des domaines CA et DHP.** Ainsi selon leur conformation, il va pouvoir y avoir phosphorylation de l'histidine du DHp et transfert vers le domaine receveur, soit l'activité kinase, ou déphosphorylation du domaine receveur, soit l'activité phosphatase. Il ne s'agit donc pas d'une déphosphorylation de l'histidine du DHp, bien qu'une substitution de ce résidu diminue la cinétique de cette réaction. Ces réactions de phosphorylation et déphosphorylation sont différentes, et ne font pas intervenir les mêmes atomes. En effet la position relative des domaines DHp et CA est différente entre les deux états, et ainsi les distances entre différents résidus impliqués dans ces réactions et leur exposition sont modifiées permettant l'un ou l'autre des mécanismes (Casino et al., 2009, 2010). Ainsi, **un mécanisme de rotation des hélices du domaine DHp est envisagé comme permettant le passage entre les différents états d'activité de la kinase** (fig. 14, Stewart, 2010).

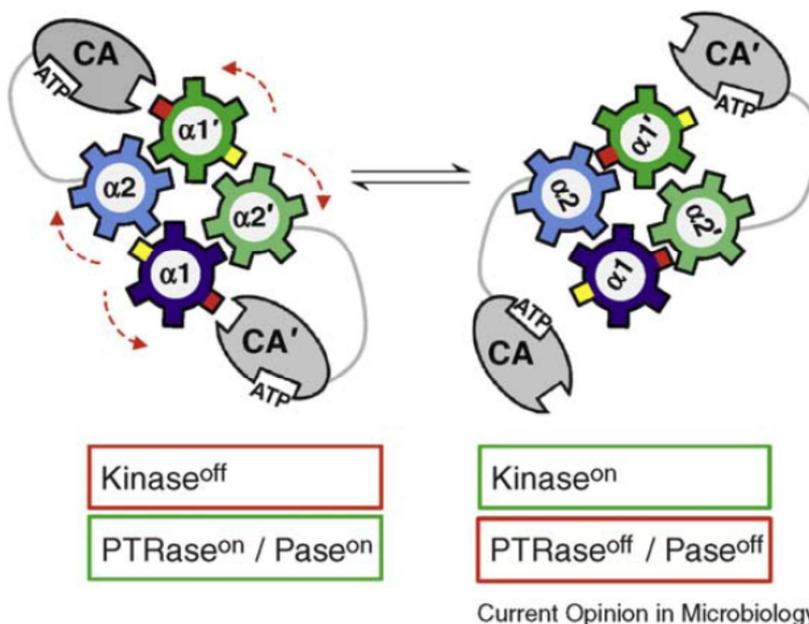


Figure 14 Représentation schématique de la régulation de l'activité kinase par le positionnement des hélices du DHP et l'accessibilité de l'histidine phosphorylable. En rouge une surface d'interaction du domaine DHp avec le domaine CA permettant sa séquestration. En jaune, surface permettant l'assemblage du site actif et la phosphorylation de l'histidine, Kinase : Activité kinase, Pase : activité phosphatase. PTRase : activité de phosphotransfert vers le receveur. Tiré de Stewart, 2010.

La liaison du domaine receveur au domaine histidine-kinase semble très importante dans l'activité kinase et est indissociable de l'activité phosphatase. Ces deux activités sont complémentaires dans la régulation de l'activité du régulateur de réponse. Ainsi l'agencement de la kinase et l'état phosphorylé ou non du domaine receveur vont modifier les interactions

entre ces domaines et en conséquence l'activité du régulateur de réponse (Casino et al., 2010; Kenney, 2010).

2. Classe 2

Cette classe d'histidine-kinases a été définie grâce au prototype CheA dont il est le seul représentant chez *E. coli* (Dutta et al., 1999). Ainsi les caractéristiques de cette famille seront définies au travers de CheA utilisé ici comme seul exemple.

a. Architecture

CheA a une architecture différente des histidine-kinases de type 1. En effet, elle peut être décomposée en cinq sous-domaines :

- **Le domaine Histidine Phosphotransfert (HPt)**, contenant l'histidine phosphorylable.
- **Un domaine de liaison du substrat (S)**, permettant l'interaction avec les protéines effectrices phosphorylables CheY et CheB.
- **Un domaine de dimérisation (D)**, qui ne sert ici qu'à la dimérisation ne contenant pas d'histidine phosphorylable.
- **Le domaine catalytique (CA)**, permettant la fixation de l'ATP et la phosphorylation.
- **Un domaine régulateur (R)**, qui permet la liaison aux récepteurs de la chimiotaxie (Baker et al., 2005; Dutta et al., 1999; Mo et al., 2012).

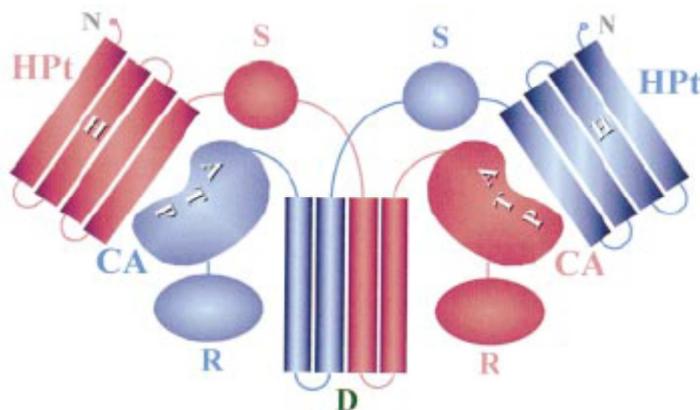


Figure 15 Représentation schématique de l'organisation des domaines de CheA. Chaque monomère a sa propre couleur. Les abréviations sont reprises dans le texte. Tiré de Dutta et al., 1999.

b. Chimiotaxie

Les mécanismes de phosphorylation, et particulièrement leur régulation, sont différents entre les domaines histidine-kinases de classe 1 et 2. Nous nous sommes intéressés à la classe 1 représentative du domaine HK de BvgS, mais nous passerons sous silence les mécanismes de la classe 2. Cependant, la réponse comportementale induite par la phosphorylation de CheA a été très largement étudiée et nous verrons brièvement ses bases ici.

La chimiotaxie est le nom donné à la régulation de l'activité des moteurs flagellaires, permettant à la bactérie de se mouvoir vers un environnement qui lui serait plus favorable en réponse à des stimuli environnementaux particuliers.

Il existe divers stimuli étant perçus par des récepteurs de la chimiotaxie, qui ont une composition en domaines particulière (fig. 16). Parmi ces stimuli, on peut citer les acides aminés perçus par Tar et Tsr, les dipeptides perçus par Tap, les sucres perçus par Trg, ou encore l'oxygène grâce au récepteur Aer (cf. V.B.3.a.), mais ces mécanismes de perception ne seront pas décrits ici. La régulation de l'activité de la kinase CheA se fait au travers de domaines de signalisation conservés formés d'hélices alpha dans ces récepteurs.

Ces cinq récepteurs vont s'organiser dans de très grands complexes (fig. 17) dans lesquels interviennent six protéines essentielles pour la chimiotaxie. Il s'agit de CheA, CheW, CheY, CheZ, CheR et CheB. Chacune de ces protéines a un rôle particulier.

Comme nous l'avons vu, **CheA est une histidine-kinase qui peut phosphoryler CheY**, l'effecteur qui va influencer directement sur les moteurs flagellaires. A l'état phosphorylé, CheY agit comme un régulateur allostérique du moteur flagellaire et induit la rotation horaire des flagelles, qui ont normalement une rotation antihoraire. C'est la combinaison de ces mouvements entre les différents moteurs qui va permettre le déplacement de la bactérie en alternant les phases de nage (« smooth-swimming » ou « running », environ 20µm/sec, rotation antihoraire) et de « tumbling » (la bactérie reste sur place, rotation horaire). Après le tumbling la bactérie va de nouveau nager mais dans une direction aléatoire. CheW est aussi capable de se lier aux récepteurs de la chimiotaxie et va ainsi permettre une régulation de l'activité kinase de CheA sur CheY.

Les trois autres protéines Che sont des enzymes périphériques du système. CheZ est une phosphatase associée aux complexes de signalisation. Elle va accélérer la déphosphorylation de CheY et est ainsi un élément régulateur. CheR et CheB sont respectivement une méthyl-transférase et une méthyl-esthérase qui agissent sur les récepteurs de la chimiotaxie. Elles permettent ainsi un niveau de régulation supplémentaire et une « mémoire » qui va modifier la réponse à des stimuli subséquents. De plus, de par la nature stochastique de leur activité, les différents récepteurs auront une sensibilité différente entre deux bactéries, ce qui augmenterait les chances de survie dans une population (Baker et al., 2005). CheB, tout comme CheY, peut être phosphorylé par CheA. Ainsi, la phosphorylation de CheB est un mécanisme supplémentaire de régulation et illustre la capacité de phosphorylation de protéines distinctes par une même histidine-kinase (Baker et al., 2005).

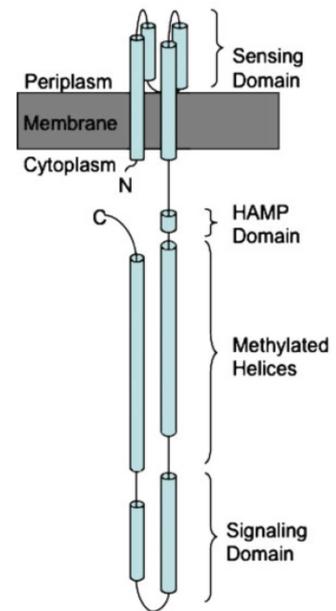


Figure 16 Représentation schématique de l'organisation des domaines d'un récepteur classique de la chimiotaxie. Tiré de Baker et al., 2005

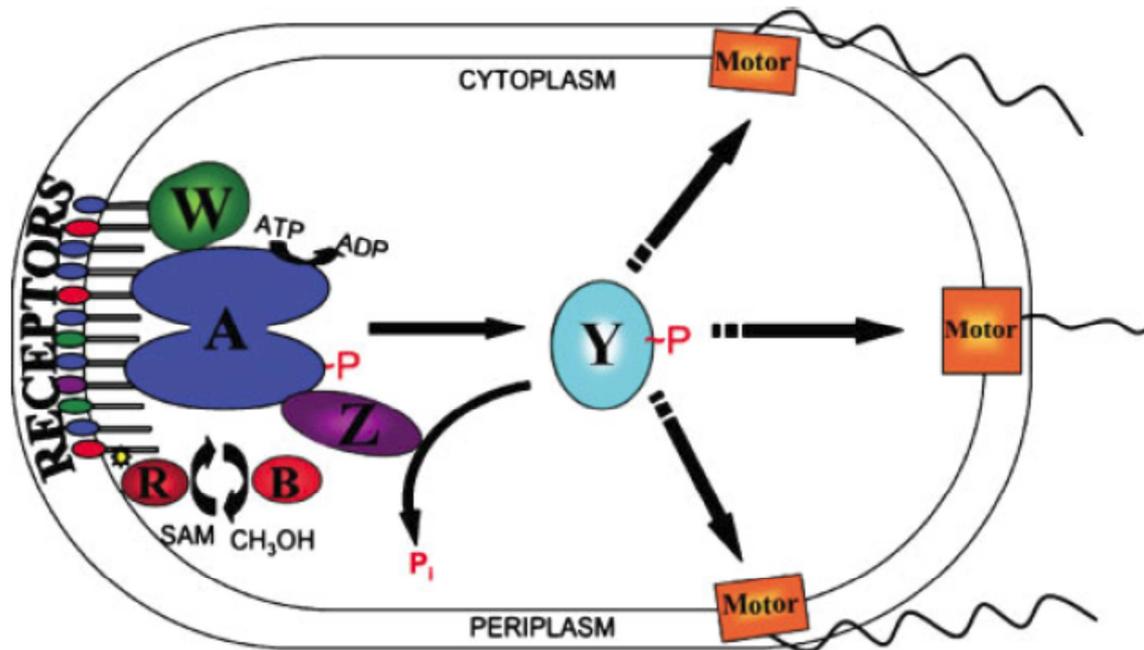


Figure 17 Représentation schématique de l'organisation polaire de grands complexes de signalisation de la chimiotaxie. Les différentes protéines Che sont représentées avec leur lettre, P représente un groupement phosphate lié à une protéine et P_i le phosphate inorganique libre. SAM représente la S-adosyl-méthionine (donneuse de méthyl) et CH_3OH le méthanol relargué après estérification du groupement méthyl. Tiré de Baker et al., 2005.

3. Le transfert de phosphate

Le domaine histidine-kinase n'est pas directement relié au domaine effecteur, ainsi il est nécessaire que le groupement phosphate soit transféré jusqu'au régulateur de réponse sur son domaine receveur. La phosphorylation de l'histidine-kinase se fait sur une histidine, et le groupement phosphate pourra ensuite être transféré sur un résidu aspartate du domaine receveur. **Dans les histidine-kinases de classe 1** qui nous intéressent ici, **ce domaine peut être lié à la kinase ou isolé**. Dans certains cas, le phosphorelais est plus complexe, faisant intervenir un domaine receveur, puis un domaine HPT qui transférera finalement son phosphate au domaine receveur du régulateur de réponse. Ceci se fait le long d'une cascade de phosphorylation qui impliquera successivement un résidu histidine (celui de la kinase) puis un résidu aspartate (de domaine receveur), à nouveau un résidu histidine (du domaine HPT) et enfin le résidu aspartate phosphorylable du domaine receveur du régulateur de réponse (fig. 18). **Les capteur-kinases ayant des domaines phosphorylables au-delà de leur histidine-kinase sont appelés « hybrides » ou « non orthodoxes »** (Laub et al., 2007). BvgS et ses homologues font partie de cette famille de senseurs, premièrement décrit dans le système ArcAB d'*E. coli* (Kwon et al., 2000).

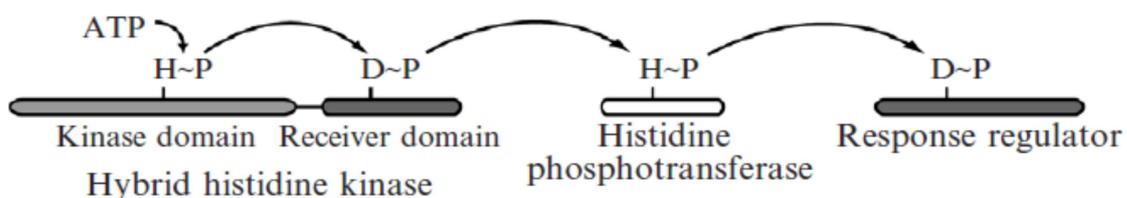


Figure 18 Schéma de la cascade de phosphorylation partant d'une histidine kinase de capteur hybride. Le domaine receveur et le domaine HPT sont présents dans les capteurs hybrides et donc absents dans de nombreux systèmes. Ils peuvent être tous deux liés au capteur-kinase ou libres. Tiré de Laub et al., 2007

Il peut y avoir plusieurs dizaines de systèmes à deux composants au sein d'une cellule. Ainsi **il y a une nécessité de reconnaissance entre les différents domaines** pour que la cascade de phosphorylation ne soit pas interrompue. Lorsque les domaines sont associés dans une même protéine on peut imaginer que la proximité va être maîtresse dans la capacité d'interaction entre domaines et en effet les résidus d'interactions entre la kinase et le receveur sont moins sujets à la covariance (Townsend et al., 2012). Cependant, lorsque ceux-ci sont séparés, des motifs de reconnaissance sont nécessaires et doivent être conservés pour le maintien de l'activité (Hoch, 2001).

Des structures de domaines histidine-kinases ont été obtenues, co-cristallisés avec leur domaine receveur associé, permettant de définir des zones d'interactions. Des études bioinformatiques de covariance ont aussi contribué à la définition des interactions nécessaires à la reconnaissance entre domaines et la spécificité du transfert de phosphate. Ces connaissances ont permis de modifier la spécificité entre domaines histidine-kinases et receveurs de systèmes à deux composants et de systèmes de la chimiotaxie prouvant ainsi leur véracité (Bell et al., 2010; Skerker et al., 2008).

L'interface majoritaire se situe entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du domaine DHp. Les boucles $\beta 4\alpha 4$ et $\beta 5\alpha 5$ du receveur font partie de cette interface et des résidus de cette zone doivent être conservés (ou les substitutions doivent être compensées par d'autres dans le domaine kinase) pour maintenir la spécificité d'interaction. Les hélices $\alpha 1$ du DHp et du receveur sont en contact et placées parallèlement, ce qui est nécessaire à la formation du complexe et au bon positionnement relatif des domaines et particulièrement à la proximité des résidus histidine donneur et aspartate receveur (Casino et al., 2010). De plus, ces domaines sont capables de lier un ion métallique divalent (souvent Mg^{2+}) qui est nécessaire à la chimie du transfert de phosphate, mais ceci ne sera pas détaillé ici (Bourret, 2010; Szurmant and Hoch, 2010).

Finalement, c'est la composition du domaine de liaison à l'ADN qui va définir la capacité de fixation du régulateur de réponse au niveau de séquences spécifiques permettant la régulation (souvent l'activation) de la transcription de loci donnés (Bourret, 2010).

III. Modulation et régulation de la virulence : le système BvgAS

Nous avons donc vu ce que sont les systèmes à deux composants et ainsi nous pouvons nous pencher sur le système particulier BvgAS. Nous verrons donc les mécanismes impliqués dans la régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis* au travers du fonctionnement global de ce système et en suivant le fil des connaissances.

A. Modulation de la virulence

Au début des travaux sur *B. pertussis*, et particulièrement lors de la mise au point de milieux de culture permettant une bonne croissance de la bactérie en vue de la production de vaccins, il a rapidement été observé que la bactérie était capable de changer de phénotype. En effet, un sérum permettant l'agglutination de *B. pertussis* cultivée en milieu normal, était incapable d'avoir le même effet sur la bactérie cultivée dans un même milieu où le chlorure de sodium était remplacé par du sulfate de magnésium ou dans le milieu normal à plus basse température (25°C). **Cette différence de phénotype est réversible** et donc une bactérie du mode C (avirulent) subséquentement cultivée dans un milieu normal retournera dans le mode X (virulent) et inversement. Ainsi, le terme de **modulation phénotypique** (ou encore modulation antigénique) a été proposé pour caractériser ce phénomène (Coote, 1991; Lacey, 1960).

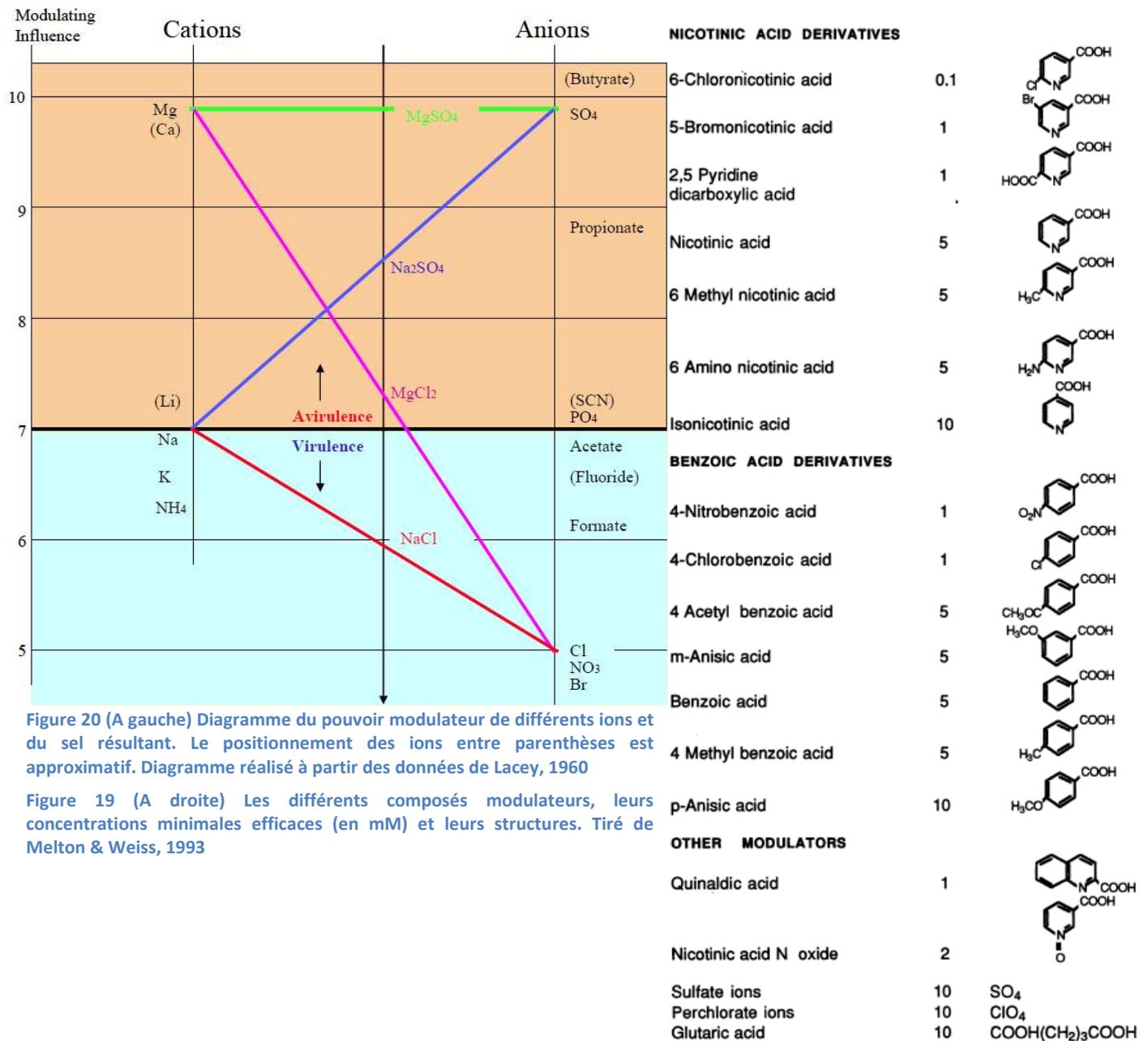
1. Les modulateurs négatifs de la virulence

Alors que les mécanismes gouvernant cette modulation phénotypique étaient encore inconnus, Lacey s'est intéressé à déterminer des conditions permettant ce changement (Lacey, 1960). Il a alors nommé mode X la phase dans laquelle *B. pertussis* produit ses facteurs de virulence et est donc agglutiné par le sérum susnommé et mode C la phase dans laquelle *B. pertussis* est non agglutinable et ne produit pas ses facteurs de virulence mais un autre set d'antigènes. Il a aussi pu mettre en évidence un mode I, dans lequel la bactérie reste agglutinable mais de façon fortement diminuée par rapport au mode X. Ces trois phases seront renommées plus tard **Bvg⁺ (mode X, virulent)**, **Bvgⁱ (mode I, intermédiaire)** et **Bvg⁻ (mode C, avirulent)** en fonction du nom attribué au locus BvgAS, mais les déterminants antigéniques de ces phases sont évidemment les mêmes et nous y reviendrons (Coote, 1991).

Différents sels ont été utilisés dans le milieu de culture en remplacement du NaCl afin de déterminer le **potentiel de modulation** « pro mode X » (pro-virulent) ou « pro mode C » (pro-avirulent) de chaque ion qui le compose (fig. 19, Lacey, 1960). En 1967, un nouveau modulateur a été décrit, **l'acide nicotinique**. Ce composé est utilisé en tant que vitamine dans le milieu de culture et une augmentation de sa concentration de l'ordre de cent fois rend la bactérie avirulente (Pusztai and Joó, 1967).

Ces travaux ont été complétés par Melton et Weiss dans les années 1990 afin de caractériser d'autres modulateurs de la virulence chez *B. pertussis* à la lumière des caractérisations apportées au système durant ce laps de temps. Ces molécules sont majoritairement des dérivés de l'acide nicotinique et de l'acide benzoïque (fig. 20). Leur mode d'action reste inconnu, mais il semblerait qu'une interaction de type charge-charge entre les modulateurs et la portion

périplasmique de BvgS soit importante pour la capacité de modulation (Melton and Weiss, 1993).



2. Sensibilité à la modulation

Les modulateurs négatifs de la virulence couramment utilisés sont l'acide nicotinique et le sulfate de magnésium et, dans une moindre mesure, les basses températures. Ils sont communs, au moins, aux différentes espèces du complexe *bronchiseptica*. Cependant, **il existe des différences dans la concentration nécessaire à la modulation entre les différentes souches**, particulièrement entre *B. pertussis* et *B. bronchiseptica*. Alors que la totalité des souches de *B. bronchiseptica* testée et la majorité des isolats de *B. pertussis* montrent une sensibilité « élevée » aux modulateurs (4 mM d'acide nicotinique ou 10 mM de MgSO₄ ou une température inférieure à 26°C permettent le passage en phase Bvg⁻), la souche

de *B. pertussis* Tohamal, souche de laboratoire par excellence, a une sensibilité moindre et nécessite 16 mM d'acide nicotinique ou 40 mM de MgSO₄ ou une température inférieure à 20°C pour passer en phase Bvg⁻ (Martinez de Tejada et al., 1996; Prugnola et al., 1995).

Ces différences de sensibilité peuvent s'expliquer par des substitutions dans la séquence de BvgS, notamment par la substitution d'un résidu glutamate par un résidu lysine dans la région de liaison entre le domaine PAS et l'histidine-kinase de BvgS dans la souche Tohamal (E₇₀₅K, Herrou et al., 2009). Cette simple substitution est responsable en grande majorité de la diminution de la sensibilité de cette souche pour les modulateurs négatifs. Ainsi dans notre système d'étude au laboratoire de la souche Tohamal, nous avons choisi de substituer cette lysine par son résidu original l'acide glutamique. D'autres zones de substitutions sont observées par exemple au niveau des domaines périplasmiques et influent sur la sensibilité du système dans une moindre mesure (Herrou et al., 2009) mais ne seront pas discutées ici.

Notons qu'il a été décrit **un mécanisme de « variation de phase » irréversible**, qui a lieu suite à une modification génétique au niveau du locus de BvgAS induisant un changement du cadre de lecture. Ceci entraîne donc une inactivation totale du système générant des bactéries incapables de synthétiser leurs facteurs de virulence, soit entièrement avirulentes, de façon stable dans le temps (Stibitz et al., 1989), même s'il a été rapporté que des révertants pouvaient apparaître très sporadiquement (Weiss and Falkow, 1984).

B. BvgAS, découverte et fonction

C'est en 1983 que la première évidence d'**un régulateur commun à la synthèse de différents facteurs de virulence** a été obtenue par mutagenèse à l'aide de transposons. En effet des mutants contenant un seul transposon inséré s'avéraient incapables de produire les différents facteurs de virulence testés (Weiss et al., 1983).

1. Identification du locus *bvgAS*

Ces premières évidences ont été approfondies et le locus *bvg* (d'abord nommé *vir*) a été identifié. Le concept était alors qu'un effecteur positif permettant la transcription des gènes des facteurs de virulence était encodé dans ce locus. C'est la transcription de ce locus qui serait affecté par les signaux environnementaux décrits comme modulateurs (Weiss and Falkow, 1984).

Des études complémentaires ont montré qu'en plus des gènes de virulence induits par le locus, d'autres gènes étaient réprimés définissant les classes de gènes ***vag* (*vir-activated genes*) et *vrg* (*vir-repressed genes*)** et que deux gènes distincts seraient impliqués dans cette régulation (Knapp and Mekalanos, 1988). **Le locus codant BvgAS** étant alors défini, il a été prouvé que ce locus **est nécessaire et suffisant à l'induction de la transcription des gènes *vag*** clonés et introduits dans l'organisme hétérologue *E. coli* (Miller et al., 1989). De même la notion que **ce locus code un système de transduction de signal** a émergé à cette époque, même si la définition du locus était encore imparfaite, supposée contenir 3 gènes *bvgABC*

(Arico et al., 1989). Ce n'est que plus tard que la preuve que *bvgBC* représentent en réalité *bvgS* a été obtenue (Stibitz and Yang, 1991).

Aujourd'hui, les génomes complets de *B. pertussis* TohamaI mais aussi d'autres *Bordetellae* ont été séquencés (Parkhill et al., 2003) ; ainsi l'environnement génétique du locus *bvgAS* est bien défini (fig. 21).



Figure 21 Représentation du locus *bvgAS* chez *B. pertussis* et de son environnement immédiat. *bvgS* est représenté en jaune (code : BP1877) et *bvgA* est représenté en rose (code 1878) entouré par *bvgR* (BP1876, code pour le répresseur BvgR) et *fhaB* (BP1879, code pour l'adhésine FHA). La portion hachurée de *fhaB* indique qu'elle n'est pas à échelle.

2. BvgAS, un système à deux composants

Le système **BvgAS a donc été reconnu comme un système à deux composants** de transduction de signal au début des années 1990. Son implication dans la régulation de la virulence n'était plus à démontrer et ainsi un intérêt particulier a alors été apporté aux mécanismes de phosphorylation. En effet, BvgS contient une histidine-kinase suivie de deux domaines de transfert de phosphate, un domaine receveur et un domaine HPT permettant le transfert de phosphate vers BvgA le régulateur de réponse. **BvgS est donc un senseur hybride**. Ainsi, BvgS s'autophosphoryle au niveau du résidu histidine 729 (dans le domaine DHp de la kinase) et transfère ce phosphate sur le résidu aspartate 1023 du domaine receveur (Uhl and Miller, 1994) et enfin sur le résidu histidine 1172 du domaine HPT. Le domaine HPT permet alors le transfert de phosphate sur BvgA au niveau du résidu aspartate 54 (fig. 22, Uhl and Miller, 1996). Les mécanismes de phosphorylation de BvgS et de transfert du phosphate vers BvgA sont alors séparables, les domaines receveur et HPT étant nécessaires au transfert de phosphate vers BvgA mais non à l'autophosphorylation de BvgS (Uhl and Miller, 1994).

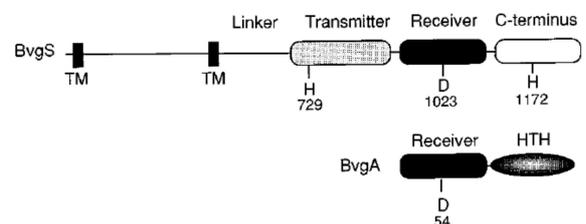


Figure 22 Représentation schématique de BvgS et BvgA. Les résidus phosphorylables des différents domaines sont représentés. Le domaine « Transmitter » représente l'histidine-kinase, « Receiver » un domaine receveur et C-terminus le domaine HPT. HTH est le domaine de liaison de l'ADN. Les domaines de perception de BvgS ne sont pas représentés, le premier segment transmembranaire (TM) est en fait un peptide signal. Tiré de Uhl and Miller, 1996.

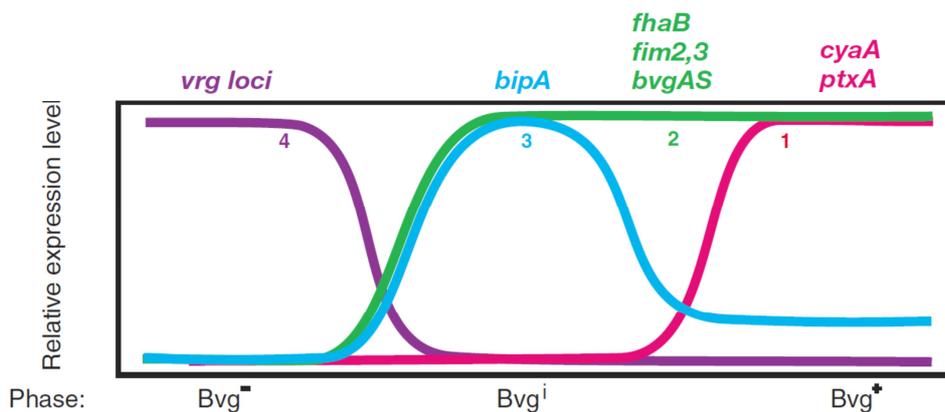
Le domaine receveur a un rôle dans l'activité phosphatase de la kinase et serait un point de contrôle dans le transfert de phosphate en permettant soit un transfert vers le domaine HPT ou la déphosphorylation. Une fois phosphorylé, **le domaine HPT permet le transfert de phosphate sur BvgA et permet sa reconnaissance et ainsi la spécificité de BvgS pour BvgA** comme démontré par des constructions chimériques entre BvgS et son homologue chez *E. coli* EvgS (Perraud et al., 1998; Uhl and Miller, 1996a, 1996b).

Il a aussi été démontré que c'est bien la phosphorylation de BvgA qui permet l'activation des gènes *vag* et ainsi que **BvgA phosphorylé est le seul élément nécessaire à l'activation de la**

transcription des gènes *vag in vitro* (Steffen et al., 1996). Ainsi BvgA serait capable de se lier à l'ADN et d'interagir avec l'ARN polymérase pour permettre l'initiation de la transcription (Steffen et al., 1996). **Il permet aussi une boucle d'amplification de l'opéron *bvgAS*** en activant sa propre transcription (Scarlato et al., 1990). BvgA est un régulateur de réponse classique et nous ne détaillerons pas plus sa structure et les résidus importants dans son fonctionnement. Notons tout de même qu'il est **dimérique même dans son état non phosphorylé** (Perraud et al., 2000). Enfin, il existe plusieurs **séquences de fixation de BvgA (sites de haute et basse affinité), ce qui rend difficile l'établissement d'une séquence consensus**. L'identification des sites de fixation et donc des régions promotrices par simple observation des séquences est alors quasi impossible.

3. Le régulon *bvg*

Le régulon *bvg* contient de très nombreux gènes. Ils vont se différencier suivant 4 classes distinctes en fonction de leur phase d'expression (Bvg⁻, Bvgⁱ et/ou Bvg⁺, fig 23). Ces différences dans la phase d'expression peuvent s'expliquer par des sites de fixation de BvgA phosphorylé qui diffèrent dans leurs positions par rapport au site d'initiation de la transcription et dans leurs affinités. La définition de ces différentes classes de gènes sera faite majoritairement à partir des travaux de Cummings et al., 2006; Jones et al., 2005; Williams and Cotter, 2007.



a. Classe 1

Cette classe représente les gènes exprimés le plus tardivement, plusieurs heures après l'entrée en phase de virulence, et uniquement en phase Bvg⁺. **Il s'agit particulièrement de toxines**, notamment la toxine pertussique (PTX) et l'adénylate cyclase hémolysine (CyaA). Leur expression nécessite une grande quantité de BvgA phosphorylé, sans doute liée à la présence de **sites de fixation de BvgA de basse affinité** (fig. 23 et 24). On cite ces gènes comme des ***vag* « tardifs »**.

b. Classe 2

Cette classe représente les gènes nécessitant une moindre quantité de BvgA phosphorylé pour être activés et ainsi induits rapidement lors de l'entrée en phase virulence. Ainsi ces gènes sont exprimés dès la phase Bvgⁱ et leur expression est maintenue en phase Bvg⁺. **Cette classe est constituée majoritairement d'adhésines** comme la FHA ou les fimbriae, mais le locus

du système BvgAS appartient lui-même à cette classe. Les promoteurs de ces gènes contiennent des **sites de fixation de BvgA de haute affinité**, d'où le simple besoin d'une faible quantité de BvgA phosphorylé pour leur activation (fig. 23 et 24). On nomme aussi cette classe de gènes *vag* « **précoces** ».

c. Classe 3

Dans cette classe, il y a présence à la fois de sites de haute et de faible affinité (fig. 23 et 24). En présence d'une faible quantité de BvgA phosphorylé, les **sites de haute affinité** seront remplis et permettront l'expression de cette classe de gène, typiquement durant la phase Bvgⁱ. Lorsque la concentration en BvgA phosphorylé atteindra un niveau suffisant pour remplir les **sites de basse affinité, en aval du départ de transcription**, leur expression sera grandement réduite (mais non éteinte), typiquement lors de la phase Bvg⁺. Ces gènes, dont *bipA* (cf ci-après, III.B.4.b. Phase Bvgⁱ) est le représentant le plus courant, sont donc représentatifs de la phase Bvgⁱ.

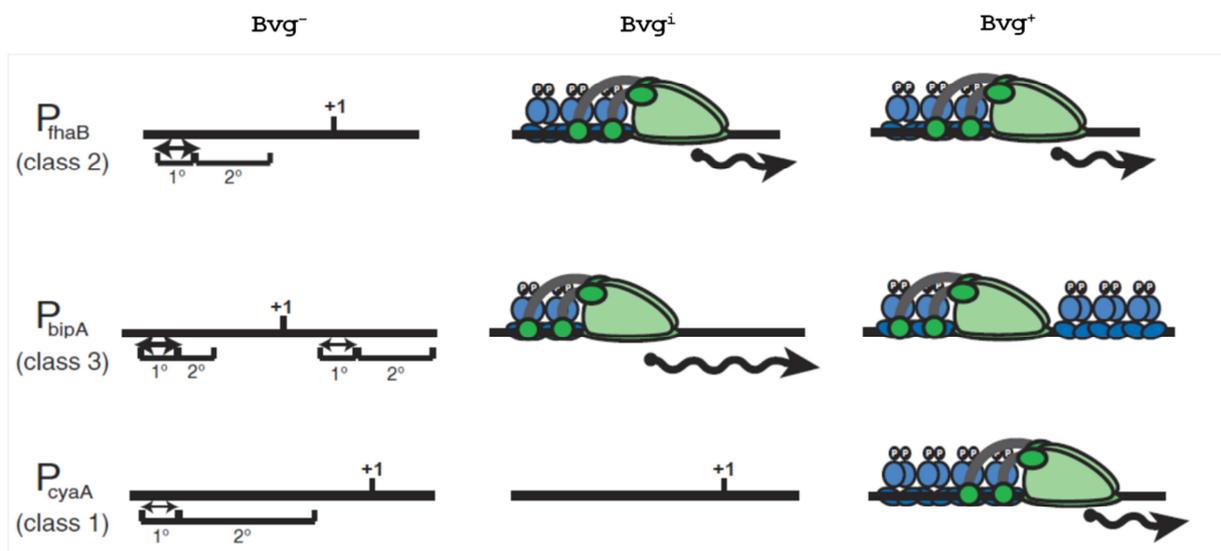


Figure 24 Représentation schématique des promoteurs de gènes Bvg régulés des classes 1 à 3. Le +1 représente le démarrage de la transcription. Les annotations 1° et 2° représentent des sites de fixation primaires et secondaires de BvgA phosphorylé. Une double flèche épaisse indique un site de haute affinité tandis qu'un site de basse affinité est représenté par une double flèche plus fine. Une flèche ondulée indique qu'il y a transcription. Tiré de Jones et al., 2005.

d. Classe 4

Cette classe représente les gènes *vrg*. Le rôle de BvgA dans le profil d'expression de ces gènes est incertain, mais le gène *vag bvgR*, activé par BvgA phosphorylé, serait essentiel dans la répression de leur transcription (Merkel and Stibitz, 1995). Le rôle de ces gènes est très peu connu chez *B. pertussis* et beaucoup d'entre eux sont devenus des pseudo-gènes, contrairement à *B. bronchiseptica* où ils auraient un rôle dans la survie dans le milieu extérieur.

4. Les différentes phases de virulence et leurs rôles

Nous avons défini au niveau génétique les différentes classes de gènes en fonction de leur profil d'expression dans les différentes phases phénotypiques de *B. pertussis*. Nous allons maintenant revenir sur la définition de ces phases particulièrement quant à leur rôle.

a. Phase Bvg⁻

C'est la **phase avirulente** de la bactérie. Elle se définit donc par l'absence de production des facteurs de virulence de la bactérie, les gènes *vag* ne sont pas exprimés. On observe cette phase *in vitro* en présence de « fortes » concentrations de modulateurs chimiques ou à basse température.

Chez *B. bronchiseptica*, cette phase permet la survie dans le milieu extérieur. Ainsi, différents gènes spécifiques sont exprimés lors de cette phase codant par exemple un système de motilité (flagelle) et la survie dans des conditions pauvres en nutriment (Cotter and Jones, 2003). Chez *B. pertussis*, le rôle de cette phase reste incompris. En effet, cette bactérie a perdu la capacité de survivre en dehors de son hôte comme indiqué par le fait que plusieurs gènes *vrg* sont devenus des pseudo-gènes (*B. pertussis* ne peut pas synthétiser de flagelle par exemple) de même que par la perte de gènes du métabolisme particulièrement, comme la voie de synthèse de la cystéine pour laquelle *B. pertussis* est auxotrophe (Parkhill et al., 2003).

Cependant, il semblerait que le système BvgAS subisse une pression de sélection pour être maintenu sensible à la modulation chez *B. pertussis* (Herrou et al., 2009). Ceci indiquerait que la bactérie conserve le besoin d'exprimer les différentes phases Bvg. Par ailleurs, il a été rapporté chez *B. bronchiseptica* que la phase Bvg⁻ aurait aussi un rôle dans la survie à long terme chez l'hôte (Jungnitz et al., 1998). Bien que cette bactérie soit plus connue pour générer des infections chroniques, alors que *B. pertussis* ferait plutôt une infection aiguë, on peut se demander si cette phase pourrait avoir un rôle dans le portage de la bactérie, et par conséquent dans la transmission de la maladie.

De façon intéressante, la relation entre BvgAS et la régulation de l'expression des gènes *vrg* est plutôt indirecte. Elle se fait au travers du répresseur BvgR nécessaire à l'arrêt de leur transcription (Merkel and Stibitz, 1995). Ainsi, lors du changement de phase, l'expression de BvgR est induite par le système BvgAS inhibant la synthèse des *vrg*, sans doute en se fixant au niveau d'un site répresseur en *cis* de ces gènes. Par contre, leur expression durant cette phase Bvg⁻ est dépendante d'un autre système à deux composants, RisAS, où RisA serait l'activateur transcriptionnel permettant la transcription des gènes *vrg* (Jungnitz et al., 1998; Stenson et al., 2005). Une interaction entre BvgR et ce système n'a pas été démontrée mais n'est pas exclue (Croinin et al., 2005).

b. Phase Bvgⁱ

La phase intermédiaire ou Bvgⁱ, est, comme son nom l'indique, la phase dans laquelle la bactérie se retrouve lorsqu'elle est cultivée à des températures intermédiaires ou en présence de concentrations de modulateurs intermédiaires à celles induisant les phases Bvg⁺ ou Bvg⁻. Son rôle dans la pathogénie est aussi très mal compris, mais il y a synthèse de

différentes adhésines (*vag* précoces) et de facteurs spécifiques de cette phase. Typiquement, la protéine BipA est spécifique de la phase Bvgⁱ. Il s'agit d'un homologue des intimines dont le rôle précis reste encore indéterminé (Deora, 2002; Vergara-Irigaray et al., 2005), mais représentant un probable facteur d'adhésion ou d'invasion. Ainsi, les caractéristiques des gènes induits lors de cette phase de même que l'absence de toxines qui provoquent une forte réaction inflammatoire ont amené à penser qu'elle favoriserait la transmission et la colonisation d'un nouvel hôte.

Même si le rôle de cette phase reste indéterminé et ne semble pas être importante dans les modèles d'infection de laboratoire, il semblerait que la bactérie puisse se trouver dans cette phase chez l'hôte même si cela ne se reflète pas au niveau immunitaire (Vergara-Irigaray et al., 2005). Les modèles animaux utilisés en laboratoire sont limités à l'infection et non pertinents pour la transmission (les modèles murins, les plus utilisés, ne peuvent pas tousser et ne sont pas des hôtes naturels, permettant surtout l'étude de la colonisation. De plus, les contraintes liées à un modèle de type primate qui serait plus relevant sont très importantes). Il est donc difficile d'évaluer ce rôle potentiel de transmission de la phase intermédiaire.

Par ailleurs, *B. pertussis* demande généralement une plus grande quantité de modulateurs que *B. bronchiseptica* pour se retrouver en phase Bvgⁱ. Ceci pourrait être lié à leur mode de vie, *B. pertussis* étant incapable de survivre dans l'environnement, et reflèterait une moindre importance des phases Bvgⁱ et Bvg⁻ pour *B. pertussis* (Vergara-Irigaray et al., 2005).

c. Phase Bvg⁺

La phase Bvg⁺ ou **phase virulente** est la mieux caractérisée dans le cycle de vie de *B. pertussis*. Comme nous l'avons vu elle est définie par la synthèse de tous les facteurs de virulence de la bactérie. Elle est nécessaire et suffisante à la pathogénie dans les modèles animaux (Coote, 1991; Martinez de Tejada et al., 1998). **Au laboratoire, c'est la phase dans laquelle se trouve la bactérie dans des conditions de culture normale à 37°C** dans un milieu comme le Stainer-Scholte (SS, Stainer and Scholte, 1970). Ce milieu a été défini en vue de la production de vaccins et a donc été optimisé pour la production des facteurs de virulence, mais hormis en présence des modulateurs négatifs décrits ou à basse température, c'est la phase qui est toujours observée dans les différents milieux de culture utilisés pour une bactérie sauvage. Cette observation est valable au moins pour les membres du complexe *bronchiseptica* où le régulon *bvg* est très semblable particulièrement au niveau de la phase Bvg⁺ (Herrou et al., 2009).

Il a été démontré *in vitro* que la phase de croissance et la disponibilité des nutriments avaient un impact important sur le niveau d'expression de nombreux gènes *vag* lors de culture en phase Bvg⁺. Par exemple le niveau de transcription d'environ 20% des gènes *vag* est diminué en phase stationnaire, indiquant un lien entre l'état métabolique de la bactérie et la virulence (Nakamura et al., 2006).

C. BvgS, un capteur kinase remarquable

Comme nous l'avons vu, le système à deux composants BvgAS permet la régulation de la virulence chez les bactéries du genre *Bordetella*. Le phénotype de ces bactéries peut se décomposer en 3 phases distinctes qui sont représentatives de l'état d'activité du système et de la quantité de BvgA phosphorylé. Cependant, **les systèmes à deux composants sont plus souvent décrits comme des systèmes d'interrupteurs** « tout ou rien » (ou ON/OFF switch), ce qui fait de BvgS un système remarquable. Ainsi **le fonctionnement de BvgS est décrit tel un rhéostat**. Il intégrerait différents signaux et ajusterait son activité kinase en fonction de leur intensité (Cotter and Dirita, 2000; Cotter and Jones, 2003).

1. Pourquoi un rhéostat ?

Le fonctionnement en tant que rhéostat plutôt que comme un système tout ou rien permet donc de moduler l'expression génétique plus finement. Dans le cas de BvgS, cela permet la distinction entre trois formes phénotypiques distinctes et ainsi sans doute une meilleure adaptation aux conditions rencontrées chez l'hôte, ou lors de la transmission vers un nouvel hôte. L'adaptation au milieu extérieur est aussi possible par ce biais comme nous l'avons vu pour *B. bronchiseptica*. BvgS est un **capteur-kinase hybride** possédant plusieurs domaines de transfert de phosphates, à l'instar d'ArcB d'*E. coli* par exemple. Il semblerait que cette cascade complexe de phosphorylation soit un élément important de ce fonctionnement en tant que rhéostat en permettant une courbe de réponse sigmoïdale plutôt qu'une courbe hyperbolique (fig. 25) comme c'est le cas dans les systèmes « classiques » (Kim and Cho, 2006). **Ceci aurait l'avantage de laisser au système une bonne sensibilité de réponse tout en lui donnant une robustesse supplémentaire au bruit**. Ainsi, ces systèmes vont être sensibles à l'intensité d'un stimulus mais aussi à sa durée. Par exemple, un stimulus d'intensité suffisante pour une activation mais de courte durée ne sera pas relayé par un rhéostat contrairement à un interrupteur.

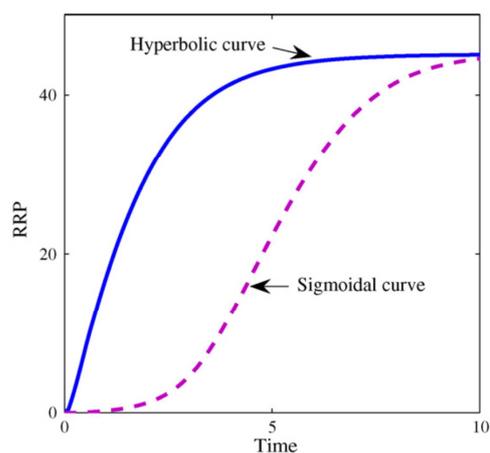


Figure 25 Comparaison des courbes de réponse d'un système « classique » (courbe hyperbolique en bleu) et d'un système hybride (courbe sigmoïdale en rose hachuré) en réponse à un stimulus d'intensité suffisante perdurant dans le temps. L'échelle de temps est relative. RRP représente la quantité de régulateur de réponse phosphorylé. Tiré de Kim and Cho, 2006.

2. Particularités de BvgS

Ce fonctionnement rhéostatique serait donc une caractéristique des systèmes à deux composants hybrides ayant un phosphorelais complexe. Cependant, en prenant l'exemple d'ArcB, nous verrons que son comportement est tout de même plus proche d'un interrupteur que d'un rhéostat. En effet, ce système s'active dans un environnement anaérobie en réponse à la réduction des quinones (cf. V.B.3.c. ArcB) et bien qu'une activité intermédiaire soit décrite elle ne semble pas importante *in vivo* (Malpica et al., 2004). On peut donc penser que

le comportement rhéostatique dans ce système soit plus utile à la robustesse du système plutôt qu'à une définition de phases phénotypiques particulières comme dans BvgS.

Une autre caractéristique particulière de BvgS est qu'il est actif à l'état basal, c'est-à-dire dans les conditions standards de culture et probablement aussi dans le cas d'une infection. De plus, aucun signal activateur du système n'a été décrit à ce jour (Jacob-Dubuisson et al., 2012) mais seulement des modulateurs négatifs. Ce fonctionnement semble atypique pour les systèmes à deux composants qui sont habituellement décrits comme s'activant en présence d'un signal particulier. Ceci s'applique aussi le plus souvent aux systèmes contrôlant la virulence (Beier and Gross, 2006), et donc le système BvgAS représenterait un système original ayant un fonctionnement atypique.

3. Architecture de BvgS

Nous avons donc vu que BvgS représente un capteur-kinase dont le fonctionnement semble atypique. Il semble actif à l'état basal et fonctionne comme un rhéostat permettant une variation phénotypique particulière. Mais d'où proviennent ces caractéristiques particulières ? Nous avons déjà vu le fonctionnement de la cascade de phosphorylation et les différents domaines impliqués dans ce processus en omettant les domaines senseurs de ce système. Cette omission volontaire reflète particulièrement l'incompréhension du fonctionnement de ces domaines. En effet, aucun ligand activateur du système n'est connu et le site de fixation des modulateurs négatifs reste aussi mystérieux même si l'hypothèse de leur activité au travers des domaines périplasmiques a été émise (Melton and Weiss, 1993).

Ces domaines senseurs putatifs situés dans l'espace périplasmique sont des domaines de type Venus Flytrap, et nous leur consacrerons la partie suivante (IV. Les Domaines Venus FlyTrap). Ces domaines sont suivis d'un segment transmembranaire vraisemblablement en hélice alpha qui se prolongerait dans le cytoplasme jusqu'à un autre domaine senseur putatif de type PAS et une partie ultérieure leur sera consacrée (V. Les domaines Per-Arnt-Sim). Ce domaine précède donc immédiatement le domaine kinase, suivi par les domaines de phosphotransfert receveur et HPt (fig. 26 et 27).

Très peu d'informations sont disponibles sur les différents domaines senseurs de BvgS, mais il a été montré que les domaines périplasmiques étaient nécessaires à l'activité du système, des insertions de plusieurs acides aminés dans ces domaines inactivant le système (Miller et al., 1992). Le domaine PAS serait sensible à l'état rédox de l'ubiquinone 8 (Q8), la quinone majeure dans les espèces du genre *Bordetella*. Ceci a été suggéré par la sensibilité de l'activité kinase de la portion cytoplasmique complète de BvgS à un analogue soluble de la Q8, Q0, qui inhibe l'activité kinase dans son état oxydé *in vitro* (Bock and Gross, 2002). Par ailleurs le domaine PAS a aussi son importance dans la sensibilité du système car de nombreuses mutations dans ce domaine ou dans ses régions flanquantes ont été décrites comme rendant le système non modulable (Goyard et al., 1994; Miller et al., 1992).

1 10 20 30
 MPAPHRLYPRSLICLAQALLAWALLAWAPAQA
33 40 50 60 70 80 90 100
 SQELTLVGKAAVPDVEVALDGLDWRWLARKRVDTLGVYAPDI PFFDVTYGERYEGLTADYMAI LAHMLGMQAKVI
110 120 130 140 150 160 170 180
 RYPTREQALSALSGQIDLIGTVNGTDGRQQSLRLSVFYAADHFVTVMEFGARHVPASNLAQQLAVDINYLPMK
190 200 210 220 230 240 250
 TLARAYPQNTLHYFPSSEQALAAVAYGQADVFIGDALTFSHLVSGSYFNDVRVVAPAHIAFGGESFGVRADNTRI
260 270 280 290 300 310 320 330
 LRVNAVLEAIPPSEHRSLIYRMLGLGSSISLDFAHPAYSAREQQWMADHPVVKVAVLNLFAFPTLFRITDEQFGGI
340 350 360 370 380 390 400
 SAAVLQLLQLRTGLDFEIIIGVDTVEELIAKLRSGEADMAGALFVNSARESFLSFSRYPYVRNGMVIIVTRQDPDAPV
410 420 430 440 450 460 470 480
 DADHLDRGTVALVRNSAAIPLLQRRYPQAKVVTADNPSEAMLMVANGQADAVVQTQISASYVNRYPAGKLRIAS
490 500 510 520 530 540
 ALDLPPAEIALATTRGQTELMSILNKALYSISNDELASII SRWRGSDGDPRTWYAYRNE
542 550 560
 IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL
564 570 580 590 600 610 620 630
 RRQIRQRKRAERALNDQLEFMRVLIDGTPNPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPEANVVGDPAI
640 650 660 670 680 690 700 710
 AREMHEFLLTRVAAEREPRFEDRDVTLHGRTRHVYQWTIPYGDLSLGLKGIIGGWIDITERAELLRLK LHDAKESA
720 730 740 750 760 770 780
 DAANRAKTTFLATMSHEIRTPMNAIIGMLELALLRPTDQEPDRQSIQVAYDSARSLELIGDILDIAKIEAGKFD
790 800 810 820 830 840 850 860
 LAPVRTALRVLPEGAIRVFDGLARQKGIELVLKTDIVGVDDVLI DPLRMKQVLSNLVGNAIKFTTEGQVVLAVTA
870 880 890 900 910 920 930
 RPDGDAAHVQFSVSDTGCIGISEADQQLFKPFSQVGGSAEAGPAPGTGLGLSISRRLVELMGGTLVMRSAPGVGT
940 950 960 970 980 990 1000 1010
 TVSVDLRLTMVEKSVQAAPPAATAATPSKPVSLRVLVVDDHKPNLMLLRQQLDYLQQRVIAADSGEAALALWR
1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 EHAFDVVITDCNMPGISGYELARRIRAAEAAPGYGRTRCILFGFTASAQMDEAQRCAAGMDDCLFKPIGVDALR
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160
 QRLNEAVARAALPTPPSPQAAAPATDDATPTAFSAESILALTQNDALIRQLLEEVIRTNRADVDQLQKLHQQAD
1170 1180 1200 1210 1220 1230 1240
 WPKVSDMAHRLAGGARVVDAKAMIDTVLALAEKKAQGGAGPSPEIDGLVVRTLAAQSAALETQLRAWLEQRPHQDQP

Figure 26 Séquence protéique de BvgS (Tohamal) en code à une lettre. Ecrit en orange le peptide signal (1-32) prédit par SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), en rouge la portion périplasmique (33-541), en vert le segment transmembranaire (542-563) et en noir la portion cytoplasmique (564-1248). Surligné en bleu le domaine VFT1 (54-280), en cyan le domaine VFT2 (308-526), en jaune le domaine PAS (592-697) en rouge l'histidine-kinase (723-946), en vert le domaine receveur (976-1092) et en rose le domaine HPT (1140-1241) comme défini par PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Le résidu K705 occasionnant un défaut de sensibilité est en rouge et les résidus phosphorylables (H729, R1023 H1173) sont soulignés.

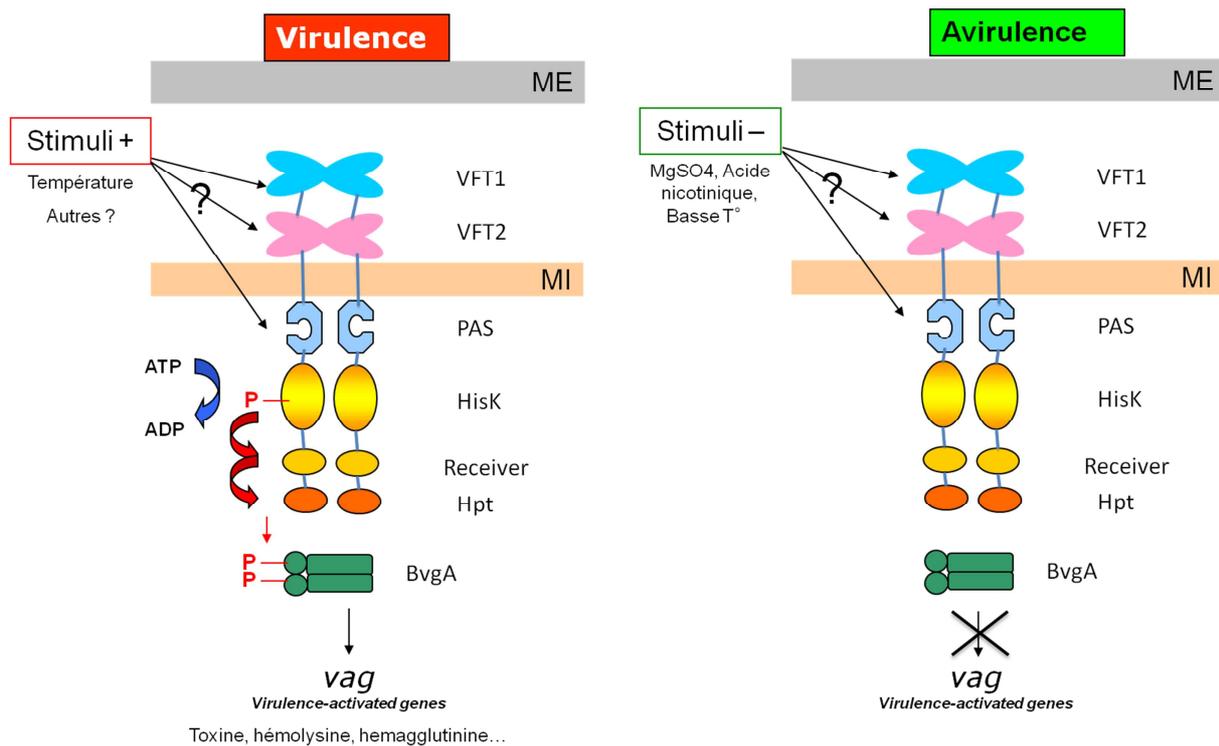


Figure 27 Représentation schématique du système BvgAS dans son état actif en phase Bvg⁺ virulente (à gauche) et inactif en phase Bvg⁻ avirulente (à droite). La phase Bvgⁱ est omise par simplification, seule une partie du pool de BvgA serait phosphorylée dans cette phase. La représentation dimérique de BvgS est ici uniquement liée à la nécessité de ce type d'architecture pour l'activité de l'histidine kinase. VFT : domaine Venus Flytrap, PAS : domaine Per-Arnt-Sim, HisK : domaine Histidine-Kinase, Receiver : domaine receveur et HPT : domaine Histidine Phoshotranfert.

Les informations disponibles sur les domaines de perception putatifs de BvgS étant très limitées, nous allons donc nous intéresser au rôle de ces domaines de type Venus Flytrap et Per-Arnt-Sim dans des systèmes hétérologues afin d'essayer d'identifier des mécanismes de perception et de transmission du signal qui pourraient survenir au sein de BvgS.

IV. Les domaines « Venus FlyTrap »

Les domaines « Venus Flytrap » (VFT) sont autrement connus sous le nom de protéines périplasmiques de liaison (de solutés), de l'anglais Periplasmic (solute-)Binding Protein (PBP), nomenclature que nous n'utilisons plus afin d'éviter les confusions avec les termes Penicillin-Binding Protein ou Pheromone-Binding Protein, mais toujours trouvée dans la littérature.

Il s'agit d'une très grande famille ayant une forte variabilité de séquences et représentée au travers des différents règnes du vivant (Felder et al., 1999). Les domaines VFT peuvent avoir un rôle dans la liaison et le transport de solutés, dans la transduction de signaux ou encore dans la régulation transcriptionnelle (Tam & Saier 1993). Ces différents rôles seront passés en revue.

Le terme VFT provient du mouvement relatif des 2 lobes lors de la capture d'un soluté, rappelant la capture d'une proie par la Dionée (Venus Flytrap en anglais, Vénus piège à mouches, Fig. 28), plante carnivore décrite par Carl von Linné, un botaniste suédois, en 1770.

Ces mouvements relatifs de deux lobes ne sont pas sans rappeler le célèbre héros rond et jaune de jeux d'arcades des années 1980, Pac-Man, et le terme « modèle Pac-Man » est aussi retrouvé dans la littérature, particulièrement durant cette période.



Figure 28 Piège de dionée en gros plan

A. Structure et classification

Ces domaines, malgré leur grande diversité, possèdent des caractéristiques structurales communes, en faisant une famille structurale. En effet, il s'agit toujours de protéines ayant un **repliement α/β , formées de deux domaines appelés lobes et séparés par une charnière**. Une cavité est ainsi délimitée, où pourra être fixé un ligand à l'interface des deux lobes (Dwyer and Hellings, 2004). Ce sont très souvent des protéines périplasmiques chez les bactéries à Gram négatif ou extracellulaires ayant un ancrage lipoprotéique chez les bactéries à Gram positif.

Sur la base de leur repliement, on peut subdiviser les différents membres de cette famille structurale en **3 superfamilles** selon la classification SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>).

1. Periplasmic binding protein-like I ou VFT de type 1

Cette première superfamille comprend dans chaque lobe un feuillet bêta parallèle composé de six brins dans l'ordre 213456. **La charnière se compose de trois linkers inter-domaines.**

Le lobe 1 contient la partie N-terminale et le lobe 2

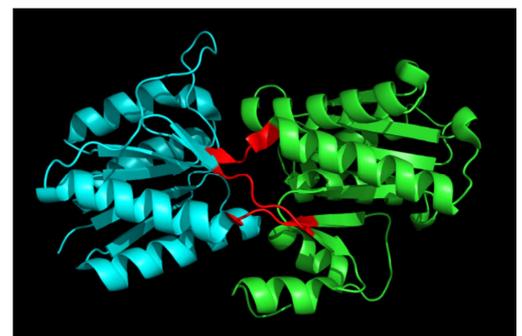


Figure 29 Représentation du domaine VFT de la protéine périplasmique de liaison de l'arabinose AraF d'*Escherichia coli*. En cyan le lobe 1, en vert le lobe 2 et en rouge la charnière.

contient la partie C-terminale de la protéine ; mais chaque lobe est formé par différentes portions de la protéine. Cette superfamille est illustrée par la protéine périplasmique de liaison du L-Arabinose de *E. coli*, AraF (code PDB : 5ABP, fig. 29).

2. Periplasmic binding protein-like II ou VFT de type 2

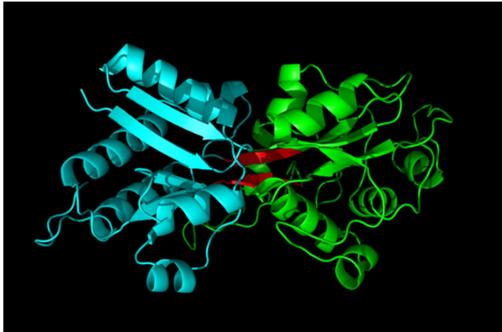


Figure 30 Représentation du domaine VFT de la protéine périplasmique de liaison du phosphate PstS d'*E. coli*. En cyan le lobe 1, en vert le lobe 2 et en rouge la charnière.

Cette seconde superfamille comprend dans chaque lobe un feuillet bêta mix composé de cinq brins dans l'ordre 21354, le brin 5 étant antiparallèle aux autres. **La charnière est formée de deux segments** qui peuvent être des brins bêta ou ne pas avoir de structures secondaires.

On peut distinguer deux familles différentes au sein de cette superfamille. La première contient un seul sous-domaine par lobe tandis que la seconde, plus grande en taille, compte 2 sous-domaines par lobe.

Dans cette superfamille le lobe 1 est composé des portions N et C-terminales de la protéine. Cette superfamille est illustrée par la protéine périplasmique de liaison du phosphate de *E. coli*, PstS ou PhoS (code PDB : 1IXH, Fig. 30). Les domaines VFT de BvgS appartiennent à la première famille de cette superfamille.

3. Chelatase-like - "Helical backbone" metal receptor ou VFT de type 3

Cette dernière superfamille comprend dans chaque lobe un feuillet bêta parallèle composé de quatre brins dans l'ordre 2134 et **une longue hélice alpha** (d'une vingtaine de résidus) **forme la charnière**. Dans cette superfamille, et contrairement aux deux autres, un lobe est formé par la portion du N-terminale et l'autre par la portion C-terminale de la protéine uniquement (Chu and Vogel, 2011). Cette superfamille est illustrée par la protéine périplasmique de liaison des hydroxamates ferriques (une famille de sidérophores), FhuD de *E. coli* (code PDB : 1K2V, Fig. 31).

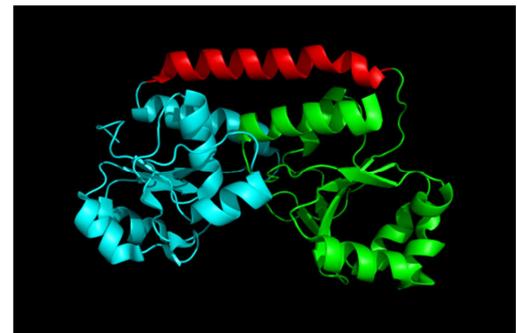


Figure 31 Représentation du domaine VFT de la protéine périplasmique de liaison FhuD d'*E. coli*. En cyan le lobe 1, en vert le lobe 2 et en rouge la charnière.

Les VFT de type 1 et de type 2 au moins auraient évolué à partir d'un ancêtre commun après la fusion d'une unité dimérique originelle de type CheY (Fukami-Kobayashi et al., 1999).

4. Classification « fonctionnelle »

Une classification des VFT suivant le type de soluté fixé a aussi été proposée. Cette classification repose sur le fait que l'homologie de séquence entre les différents VFT est la plus forte lorsqu'ils fixent un même ligand plutôt que lorsqu'ils proviennent d'un même organisme. Ceci indique que **les contraintes de séquences et de structures pour la liaison d'un soluté sont importantes**.

Cette classification se divise en 8 sous-groupes (Tam and Saier, 1993) :

- 1- Malto- Oligosaccharides et autres Oligosaccharides, Glycérol-3-phosphate et Fer
- 2- Hexoses et pentoses
- 3- Acides aminés polaires et Opines
- 4- Acides aminés aliphatiques et Amides
- 5- Peptides et Nickel
- 6- Polyanions inorganiques
- 7- Polyanions organiques
- 8- Complexe ferreux organiques et vitamine B12

Cependant, cette classification déjà assez ancienne, ne représente plus bien la diversité structurale et fonctionnelle des domaines VFT ni les différents types de charnières et de repliements, dans la mesure où il ne semble pas y avoir de corrélation stricte entre le ligand fixé et les familles structurales (Fukami-Kobayashi et al., 1999).

B. Une famille, des familles : les nombreux visages des domaines VFT

Les membres de la superfamille des domaines VFT ont su faire preuve d'une grande adaptabilité. Leur fonction primaire est la liaison d'un ligand mais en étant capables d'interagir avec d'autres protéines ou en se combinant avec de nombreux autres types de domaines protéiques au sein d'une même protéine ; ils sont partie intégrante et nécessaire de systèmes variés remplissant des fonctions aussi diverses que l'activité enzymatique et le contrôle de l'ouverture d'un canal ionique.

1. Attrape-moi si tu peux ! Liaison du ligand et mobilité.

Le rôle premier des domaines VFT est de lier un ligand. Cette **liaison du ligand** semble primordiale aux diverses fonctions des VFT, elle **permet de stabiliser la forme fermée** du domaine, les modifications structurales ainsi apportées vont permettre l'accomplissement des tâches ultérieures. Par exemple, elles permettent la reconnaissance du transporteur et déclenchent ainsi le transport du substrat (Locher, 2004), même si l'interaction entre le VFT et le transporteur membranaire est aussi possible pour la conformation non ligandée du VFT avec une affinité plus faible à identique, selon le système considéré (Ames et al., 1996). Cela peut aussi permettre la reconnaissance d'une autre protéine membranaire pour une signalisation, par exemple par phosphorylation (Antoine et al., 2003). Par effet allostérique, ces modifications peuvent être répercutées sur d'autres domaines de la protéine contenant le module VFT et permettre diverses fonctions telles la liaison de l'ADN (Swint-Kruse and Matthews, 2009), l'ouverture d'un canal ionique (Dingledine et al., 1999) ou encore la phosphorylation (Ahier et al., 2009; Uhl and Miller, 1996b).

De nombreuses structures de VFT, ligandés ou non, sont disponibles. Cela a permis de définir les bases de la liaison d'un ligand par ces domaines ainsi qu'une identification des modifications structurales liées à la captation du ligand et de nombreux exemples sont documentés. Dans tous les cas, chaque lobe se comporte plus ou moins comme un cœur

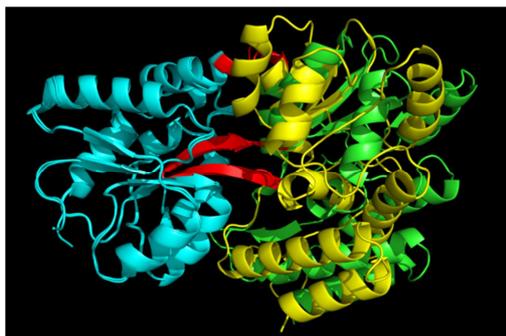


Figure 32 : Alignement entre les formes ouverte (lobe 2 en vert, code PDB 1OMP) et fermée (lobe 2 en jaune, code PDB 1ANF) de la protéine de liaison au maltose. Les lobes 1 (en cyan) s'alignent parfaitement. Les charnières sont en rouge.

rigide dont on peut négliger les déformations, **la fixation d'un ligand entraîne donc une différence dans la position relative des deux lobes sans les modifier eux-mêmes.** De ce fait l'alignement structural entre les formes ouverte et fermée d'un même VFT représenté ici se fait via leurs lobes 1, pour la lisibilité uniquement.

Par exemple la fixation du maltose à la protéine de liaison du maltose MalE (VFT de type 1) va entraîner une fermeture de 35° et un mouvement de torsion (« twisting motion ») de 8° entre les deux lobes (fig. 32). Ces mouvements, représentatifs des mouvements

inter-lobes possibles, s'articulent autour des charnières. Les différences structurales entre ces deux formes peuvent expliquer la différence de reconnaissance de ces deux formes pour les mécanismes de transport et de chimiotaxie auxquels MalE participe (Sharff et al., 1992).

Un autre exemple bien caractérisé est celui de la LAOBP (Lysine-Arginine-Ornithine Binding Protein), un VFT de type 2. Dans cet exemple, la fermeture entre les deux lobes atteint 52° (Oh et al., 1993). **Les mouvements majoritaires sont donc l'ouverture et la torsion entre les lobes et vont ensemble conditionner la dynamique de ces domaines.**

Ainsi nous avons vu le réarrangement structural généré par la liaison d'un ligand au domaine VFT, mouvements relatifs des deux lobes articulés autour de leur charnière, ouverture/fermeture et torsion. Cependant la reconnaissance du ligand implique les deux lobes, ce qui permet de stabiliser la forme fermée. Mais comment se fait l'interaction initiale du ligand avec une forme ouverte ?

Au vu des nombreuses structures de VFT complexés avec leurs ligands qui ont été obtenues, il a été possible d'analyser les contraintes de fixation de ces ligands. Il semblerait que l'interaction se fasse d'abord avec un des deux lobes sur lequel le nombre de résidus d'interactions est plus important. L'interaction primaire pourrait donc se faire avec le lobe 1 ou le lobe 2, selon les systèmes. En effet, dans le cas de la LAOBP ou de la LIVBP (Leucine-Isoleucine-Valine-Binding Protein), la majorité des interactions se font avec le lobe 1 (Oh et al., 1993; Trakhanov et al., 2005) et les mouvements libres du lobe 2 permettraient d'atteindre la conformation close et de la stabiliser grâce à la compatibilité entre les groupements chimiques du ligand et les résidus du lobe 2. Dans d'autres cas, comme celui de SiaP de *Haemophilus influenzae* (Müller et al., 2006), la majorité des interactions se fait via le lobe 2, indiquant que c'est certainement par celui-ci que se fait la reconnaissance initiale. **Le motif de reconnaissance est spécifique d'un ligand et se fait par l'intermédiaire de plusieurs résidus du domaine VFT** (Dwyer and Hellenga, 2004). Ces interactions entre les domaines VFT et leur ligand se font parfois par l'intermédiaire de molécules d'eau, mais le rôle de certains résidus spécifiques reste important dans la liaison du ligand (Oh et al., 1994).

Les formes ouverte et fermée des VFT coexisteraient en absence de ligands, et leur présence permettrait de déplacer l'équilibre vers la forme fermée ligandée (Trakhanov et al., 2005).

Des études plus récentes ont montré qu'il existerait une forme « demi-close », dont l'état énergétique est très proche de celui de la forme ouverte, permettant **une transition rapide entre ces deux états et facilitant ainsi une reconnaissance du ligand** (Bucher et al., 2011).

La compréhension de l'interaction entre les VFT et leurs ligands a permis de développer des senseurs spécifiques pour différentes molécules organiques ou inorganiques et même de modifier l'affinité d'un VFT donné pour un ligand, voire de lui faire reconnaître un ligand exotique (Dwyer and Hellinga, 2004).

Cependant, le domaine VFT2 de BvgS (Herrou et al. 2010, code PDB: 3MPK) ainsi que le domaine VFT venant du senseur de système à deux composants HK29 de *Geobacter sulfurreducens* (code PDB : 3H7M, Cheung et al. 2009) ont été cristallisés sous forme fermée et en absence de ligand. Il est donc envisageable que les domaines VFT de cette famille de senseur puissent avoir un fonctionnement différent des domaines VFT « classiques », en ayant une forme fermée non ligandée stable. Cette conformation est possiblement liée aux contraintes imposées par leur type de charnière, formée de deux longs brins bêta (Cheung et al., 2009).

2. Une fonction enzymatique

Un domaine VFT présentant une activité catalytique a été décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao et al., 1992). Il s'agit de la cyclohexanedienyl déshydratase, un enzyme de la synthèse de la phénylalanine. La structure de cet enzyme a depuis été obtenue (code PDB : 3KBR, fig. 33). Il s'agit d'un VFT de type 2 homologue aux VFTs de fixation des acides aminés polaires (Tam and Saier, 1993).

Ce domaine peut fixer soit le préphénate soit le L-arogénate pour les transformer en phénylpyruvate ou en L-phénylalanine, respectivement (Zhao et al., 1992). La fonction du VFT est directement liée à son rôle de fixation du substrat en permettant le bon positionnement des résidus catalytiques.

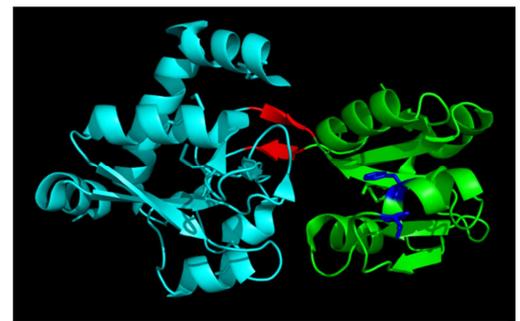


Figure 33 Représentation de la cyclohexanedienyl déshydratase de *P. aeruginosa*. En cyan le lobe 1, en vert le lobe 2, en rouge la charnière, en bleu le motif catalytique supposé.

3. Les VFT et la régulation transcriptionnelle

Il existe une sous-famille de régulateurs transcriptionnels, possédant un domaine hélice-coude-hélice (HTH pour Helix-Turn-Helix) de liaison à l'ADN et un domaine VFT (VFT de type 1 du sous-groupe 2, Tam & Saier 1993) retrouvée de façon ubiquitaire chez les procaryotes. Il s'agit de la famille LacI/GalR, régulateurs qui sont capables de se lier à l'ADN dans le petit sillon (Swint-Kruse and Matthews, 2009). Ces domaines ont la particularité d'être cytoplasmiques et de fonctionner en tant que dimères ou dimères de dimères (Swint-Kruse & Matthews 2009, fig. 34). La fixation d'un ligand au VFT va modifier l'affinité de liaison à l'ADN en l'augmentant (co-répression, exemple de PurR) ou la diminuant (activation, exemple de LacI). Les ligands naturels sont généralement de petites molécules reliées au métabolisme.

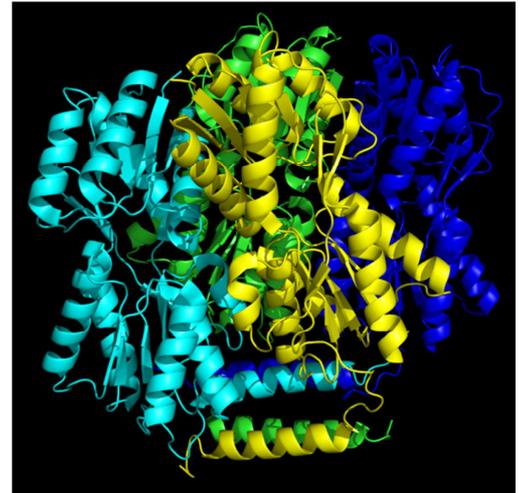


Figure 34 Tétramère du répresseur transcriptionnel LacI d'*E. coli*, chaque monomère est représenté dans une couleur distincte. Les domaines HTH sont placés dans le bas de la structure et les domaines VFT au-dessus. Code PDB : 3EDC

De façon intéressante ces régulateurs transcriptionnels semblent pouvoir moduler leur activité par des phénomènes d'allostérie permettant de réguler de manière plus ou moins fine le niveau d'expression des gènes cibles en présence de ligands activateurs ou répresseurs. Ces systèmes fonctionnent soit comme **des interrupteurs** permettant des inductions/répressions du gène cible de plus d'un facteur mille, soit, à l'instar de BvgS, comme **des rhéostats** permettant une modulation plus fine de l'ordre d'un facteur 10 à 100 (Swint-Kruse and Matthews, 2009).

4. Les VFT et le transport

Un des premiers rôles décrits des VFT est la captation de solutés pour les importer au travers d'une membrane via un système de transport spécifique. Il existe trois grands types de transporteurs bactériens utilisant les VFT. Dans ces systèmes de transport, le domaine VFT est régulièrement dénommé SBP (pour Substrate-Binding Protein, protéine de liaison du substrat) ou récepteur périplasmique.

a. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette, cassette de liaison de l'ATP) permettent l'import ou l'export de molécules au travers d'un canal en consommant de l'ATP grâce à leur module ABC. Ce type de transporteur est retrouvé dans tous les règnes du vivant (Davidson et al., 2008). L'export va servir à l'expulsion de composés toxiques (efflux de drogues, export de toxines), participant ainsi à la résistance multi-drogues chez les bactéries, tandis que l'import concerne des nutriments (Davidson et al., 2008).

Un exemple bien caractérisé d'import de soluté est celui de BtuCDF (Fig. 35) permettant le transport de la vitamine B12. Après capture de son ligand, le récepteur périplasmique BtuF va pouvoir interagir avec BtuC, le partenaire transmembranaire. **L'arrimage de BtuF va induire un changement conformationnel qui sera transmis aux domaines catalytiques BtuD, qui vont hydrolyser de l'ATP et ainsi fournir l'énergie nécessaire au système pour transporter la vitamine B12 au travers de la « porte »** (Locher, 2004). Cette voie de translocation semble commune aux importeurs ABC, en faisant intervenir des partenaires spécifiques du soluté.

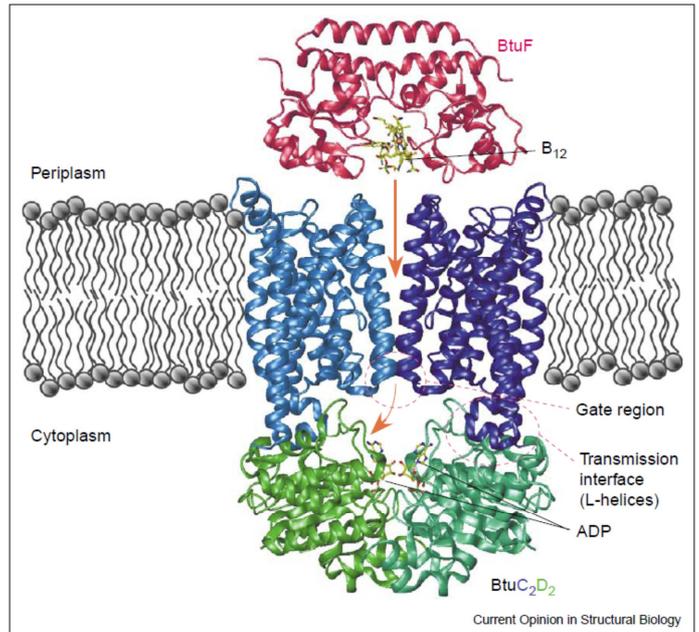


Figure 35 Représentation du système de transport BtuCDF
Tiré de Locher, 2004

b. Les transporteurs TRAP

Les transporteurs TRAP (pour Tripartite ATP-independant periplasmic) sont composés, comme leur nom l'indique, de trois partenaires, originalement décrits dans le système DctPQM de *Rhodobacter capsulatus*, une alpha-protéobactérie (Forward et al., 1997). Le premier partenaire est un VFT de transport « classique » et les deux autres sont membranaires avec un petit composant ayant 4 hélices transmembranaires et un grand en ayant 12. Ces deux derniers peuvent être fusionnés chez certaines espèces, particulièrement chez les *Archaea*, moyennant une hélice transmembranaire supplémentaire (Mulligan et al., 2011).

Le transport de la molécule d'intérêt n'est possible qu'en présence d'ions Na⁺ (Mulligan et al. 2011, Fig. 36). Le transport se fait au travers du grand partenaire membranaire, faisant partie de la superfamille des transporteurs d'ions. La fonction précise du petit domaine n'est pas connue mais il est indispensable au transport. L'étape de fixation du VFT au transporteur est elle aussi cruciale au fonctionnement du système et à ses cycles catalytiques (Mulligan et al., 2011). **La dynamique des domaines VFT semble donc importante au bon fonctionnement du système.**

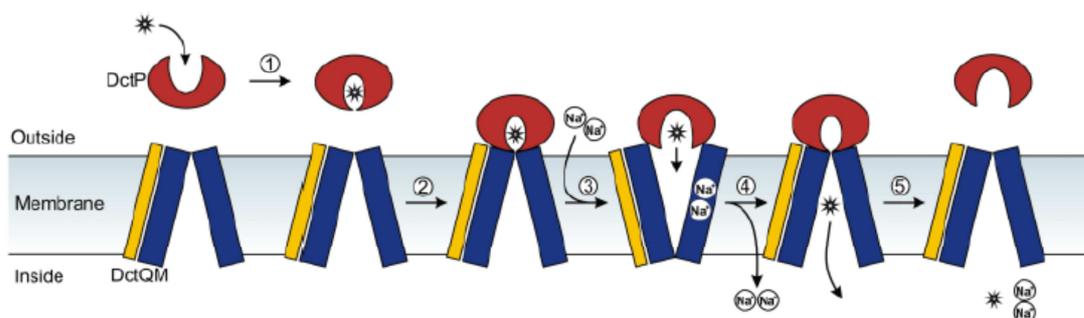


Figure 36 Représentation schématique du fonctionnement d'un transporteur TRAP (DctPQM), Tiré de Mulligan et al. 2011.

c. Les transporteurs TTT

Les transporteurs TTT (Tripartite Tricarboxylate Transporter, transporteur de tricarboxylate tripartite) fonctionnent eux aussi grâce au concours de trois partenaires. Ils ont été identifiés pour la première fois chez *Salmonella typhimurium* dans le système TctABC (Ashton et al., 1980). Ils ont une organisation identique à celle des transporteurs TRAP bien que les transporteurs ne montrent aucune similarité de séquence indiquant qu'ils auraient évolué à partir d'un système ancestral différent et justifiant la dénomination en deux familles distinctes (Winnen et al., 2003). Le mécanisme de ces systèmes est peu étudié mais semble se rapprocher de celui des transporteurs TRAP, avec une dépendance au sodium.

5. Les VFT dans la signalisation

a. Systèmes bactériens

1) Couplage à un système de transduction de signal.

Vu leur rôle de captation de solutés importants pour le métabolisme, il n'est pas étonnant de trouver un lien entre les domaines VFT et la transduction de signal. En effet **certains domaines VFT couplés à un transporteur**, en plus de leur rôle dans le transport, **sont capables d'interagir avec des protéines transmembranaires de signalisation** (Tam and Saier, 1993; Tetsch and Jung, 2009). Les exemples sont nombreux notamment dans l'interaction avec des systèmes à deux composants, leur revue ne sera donc pas exhaustive.

La **régulation de l'opéron phosphate** chez *E. coli* par l'entremise de PhoB/PhoR nécessite que le domaine VFT de type 2 PstS (ou PhoS, code PDB : 1PBP) soit fonctionnel. En effet le système PhoB/PhoR nécessite la présence du système de transport PstSCAB et particulièrement une interaction entre PstS et son transporteur pour être régulé (Hsieh and Wanner, 2010).

La **régulation de la virulence** chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* fait intervenir un domaine VFT de type 1 liant des sucres comme le galactose, ChvE (code PDB : 3UUG), qui va interagir avec VirA permettant une phosphorylation de VirG et ainsi activer le régulon *vir* nécessaire à l'établissement de l'infection (Hu et al., 2013; Lee et al., 1996).

On peut aussi donner l'exemple du système d'importation, de citrate BctCBA de *B. pertussis* où le domaine VFT, BctC, va pouvoir interagir avec BctE, et induire l'expression du système via BctD générant une boucle d'**autorégulation** (Fig. 37, Antoine et al. 2005).

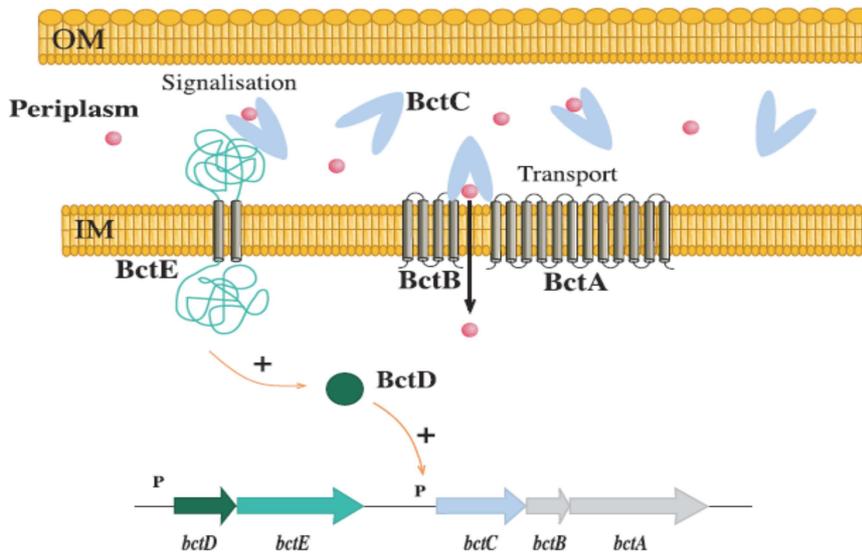


Figure 37 Illustration du double rôle de BctC.

Le transporteur de type TTT BctCBA, va permettre l'import du citrate. Pour cela le domaine VFT BctC doit interagir avec le transporteur BctBA. Lorsque BctC est chargé en citrate, il va aussi pouvoir interagir avec BctE, un capteur-kinase transmembranaire et permettre son autophosphorylation. Le phosphate sera alors transféré à BctD un régulateur transcriptionnel qui va transactiver l'opéron *bctCBA*.

Tiré de Antoine et al. 2005

La **chimiotaxie** fait elle aussi intervenir des domaines VFT. Chez *E. coli*, le VFT MalE, en présence de maltose donc sous sa forme fermée, est capable d'interagir avec le récepteur Tar permettant de moduler le comportement de « nage » (cf. II.B.2.b. Chimiotaxie, Tetsch & Jung 2009).

2) Intégration à un système de transduction de signal

A l'instar de BvgS, de nombreux **systèmes à deux composants** ont recruté des modules VFT pour leur fonctionnement. Cette grande famille illustre bien la modularité des systèmes à deux composants. En effet, les architectures retrouvées sont très variées, même si l'on ne retrouve des domaines VFT qu'au niveau périplasmique. De 1 à 4 modules VFT en tandem sont présents dans ces systèmes, qui sont majoritairement des VFT du type 2. Une classification en sous-familles serait donc possible selon le type de domaines VFT contenus dans ces capteurs, bien qu'au niveau du domaine le plus proximal de la membrane, les VFT de type 2 sont très largement surreprésentés (Antoine R., non publié).

Notons tout de même l'exemple d'un capteur-kinase possédant un seul domaine senseur périplasmique qui est un VFT de type 1. Il s'agit du système BT1754 de *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, une bactérie à Gram négatif anaérobie de la flore commensale digestive mais aussi pathogène opportuniste, qui permet la régulation de gènes d'utilisation des polysaccharides. Le domaine senseur périplasmique a été cristallisé (code PDB : 2X7X) et montre la liaison du fructose aux VFT ainsi qu'une interaction dimérique entre les domaines VFT au travers d'une hélice qui les relie au domaine transmembranaire (Sonnenburg et al., 2010).

Environ 30% des systèmes à deux composants contenant des domaines VFT de type 2 possèdent un seul domaine VFT, tandis que seulement 4% en ont trois ou plus. Au niveau cytoplasmique, outre les domaines kinases et de phospho-transfert, on peut retrouver divers domaines de perception tels des domaines PAS (Per-ARNT-Sim), des domaines GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA) ou un type de domaine récemment décrit, HKsen (Histidine-Kinase Sensor) (Fig. 38, Jacob-dubuisson et al. 2012). Il est aussi intéressant de noter que la conservation entre les domaines VFT des différents

systèmes est limitée et surtout que les zones de raccordement (linkers) entre les différents domaines protéiques sont très variables en composition et en taille.

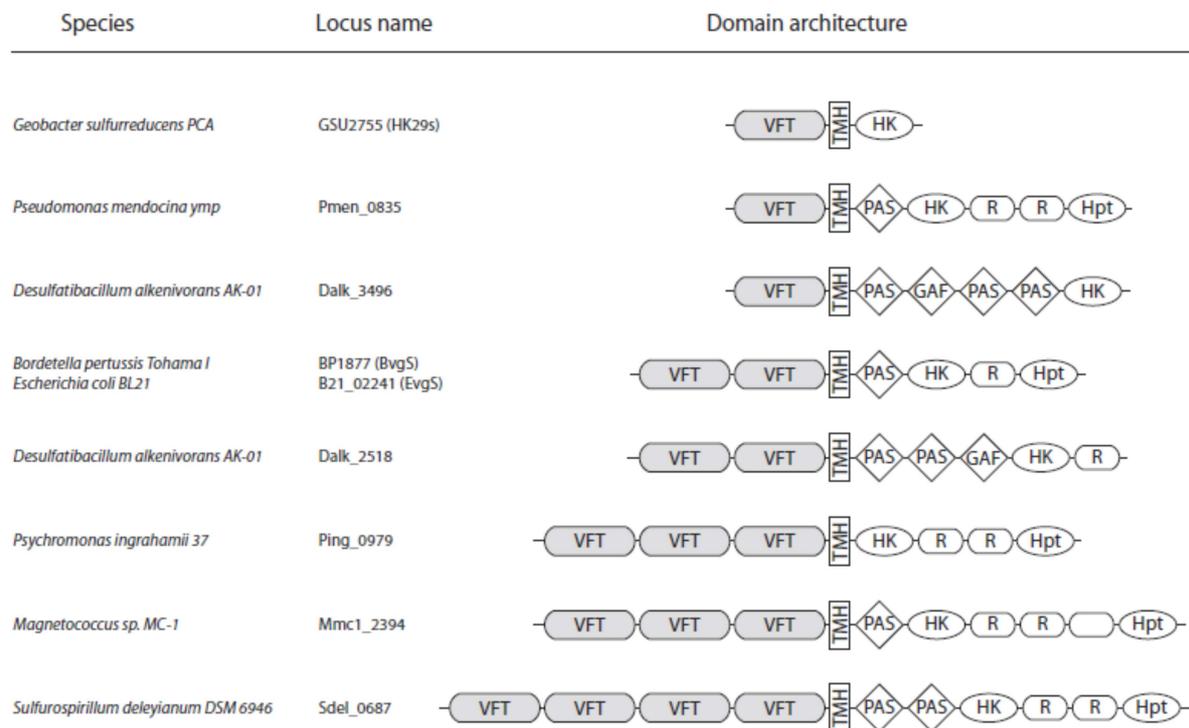


Figure 38 Représentation schématique de différentes organisations possibles des capteurs de systèmes à deux composants contenant des domaines VFT. Chaque domaine est représenté par une forme particulière annotée, on retrouve les domaines VFT, TMH pour les domaines d'hélices transmembranaires, PAS, GAF, HK pour les Histidine Kinases, R pour « receiver », Hpt pour les domaines Histidine PhosphoTransfert, et en blanc un domaine non caractérisé. Tiré de Jacob-Dubuisson et al., 2012

BvgS est l'archétype de cette famille et le membre le plus étudié. De nombreux homologues de BvgAS existent, avec une identité de séquence allant jusqu'à 44% pour des systèmes du genre *Pseudomonas*. Des informations sont disponibles sur quelques-uns d'entre eux et ils seront brièvement passés en revue.

- Le système EvgA/EvgS de *E. coli* a été identifié pour la première fois comme homologue de BvgAS en 1994 et est capable d'induire l'expression de *ompC* chez un délétant *envZ*, expression qui est modulable par la température et les mêmes modulateurs chimiques que BvgAS (Utsumi et al., 1994). L'activation constitutive de EvgS (par une mutation ponctuelle dans le domaine PAS) montre une augmentation de l'expression de 225 ORF et une diminution de la transcription de 144 ORF, fortement corrélées avec les gènes du régulon PhoP/PhoQ (cf. II.A.2.c.1 PhoPQ). Certains gènes nécessitent même l'activité des deux systèmes pour voir leur expression augmentée, indiquant un « cross-talk » (signalisation croisée) entre ces systèmes (Eguchi and Okada, 2004). Cette signalisation croisée se fait par l'intermédiaire d'une petite protéine membranaire, SafA (ou B1500) qui est directement induite par EvgAS, et semble importante pour l'induction d'une résistance à l'acide (Eguchi et al., 2007, 2012).

D'un autre côté l'étude transcriptomique d'un délétant *evgAS* contre une souche surexprimant EvgA sur plasmide démontre l'activation par EvgA d'au moins 37 gènes, dont des gènes de résistance aux pH acides et des pompes à efflux, et l'inhibition de 5 gènes (Masuda and Church, 2002). EvgA est donc capable d'induire une résistance à l'acidité du milieu, mais aussi une résistance multi-drogues, grâce à la pompe à efflux YhiUV dépendante de TolC (Masuda and Church, 2002).

Même si le régulon EvgA commence à être bien défini, les molécules perçues par EvgS pour son activation ne sont toujours pas connues à l'instar de celles perçues par BvgS, même si au contraire EvgS ne semble pas être actif par défaut (Itou et al., 2009).

- Chez *Klebsiella pneumoniae*, on trouve le système KvgAS, qui semble être impliqué dans la réponse à un stress oxydant ou à une limitation en fer (Lai et al., 2003). KvgAS interagit avec un autre système homologue, KvhAS et ils seraient tous deux impliqués dans le régulon RpoS en réponse à un stress (Lin and Peng, 2006). KvgAS semblerait aussi impliqué dans la virulence ; une souche mutante de KvgS est en effet moins virulente qu'une souche sauvage dans un modèle murin d'infection intra-nasale (Lawlor et al., 2005).

- Un autre exemple est celui de la protéine RocS1 (aussi nommée SadS) chez *P. aeruginosa* (Cotter and Stibitz, 2007). Elle permet l'activation des gènes fimbriae *cup*, importants dans la formation de biofilms par l'intermédiaire de la protéine RocA1 (ou SadA). RocS1 est aussi capable d'interagir avec une autre protéine RocR (ou SadR) qui possède un domaine EAL d'hydrolyse du c-di-GMP et va avoir un rôle antagoniste à l'activité de RocA1 (Kuchma et al., 2005; Kulasekara et al., 2005). Ce système à « trois composants » n'est pas sans rappeler BvgAS et BvgR qui possède aussi un domaine EAL.

RocS1 est aussi capable de phosphoryler un autre régulateur transcriptionnel, RocA2. Celui-ci va réprimer les gènes *mexAB-oprM* qui codent une pompe à efflux multi-drogues. RocA1 et A2 peuvent en fait tous deux être phosphorylés par RocS1 et par un autre senseur ayant la même topologie hormis l'absence de modules VFT périplasmiques, RocS2 (Sivaneson et al., 2011).

- Chez *Vibrio cholerae*, une recherche de gènes induits *in vivo*, puis d'activateur de l'opéron *ctxAB in vivo*, a permis d'identifier le système VieABS, où VieS est un capteur-kinase capable de phosphoryler VieA (Martinez-Wilson et al., 2008). Ce dernier possède, du N- vers le C-terminus, un domaine receveur contenant le résidu aspartate phosphorylable par VieS, un domaine EAL, un autre domaine receveur partiel et un domaine HTH de liaison à l'ADN (Cotter and Stibitz, 2007). VieS va ainsi réguler l'expression de VieA et son état de phosphorylation. L'activité de VieA d'hydrolyse du c-di-GMP via son domaine EAL réprime les gènes de formation du biofilm et induit la motilité en diminuant le pool de c-di-GMP intracellulaire (Martinez-Wilson et al., 2008). Le rôle de VieB ainsi que les signaux perçus par VieS restent encore indéterminés.

- Un système homologue de BvgAS fonctionnant aussi comme un rhéostat a été décrit chez *Legionella pneumophila*, et est aussi présent dans d'autres espèces du genre *Legionella*.

Il s'agit du système LetAS, impliqué lui aussi dans la régulation de la virulence, mais qui n'est pas le seul régulateur identifié dans cette bactérie. Il est impliqué dans un phénomène de « différenciation », particulièrement en induisant l'expression de deux petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ. Ils vont alors se lier au répresseur CsrA, levant sa répression, et permettre l'expression de gènes liés à la transmission et à la survie dans l'environnement comme la cytotoxicité, la motilité, la production de pigment ou encore l'évasion du lysosome (Edwards et al., 2010).

- *Photorhabdus luminescens* possède un système nommé AstRS facilitant l'adaptation à la phase stationnaire en régulant un très large set de gènes (Derzelle, 2004).

Ce système est le dernier exemple des systèmes contenant un capteur-kinase entièrement homologue à BvgS.

- Un système possédant un seul VFT a été décrit chez *Yersinia enterocolitica*, YsrRS, qui va permettre l'activation des gènes *ysa*, codants pour un système de sécrétion du type III, en induisant l'expression de YsaE, un activateur transcriptionnel. Cette induction de YsaE par YsrRS est dépendante du NaCl (Walker and Miller, 2004, 2009). YsrS possède un domaine Receiver mais ne comporte pas de domaine Hpt. En effet ce domaine a été identifié comme étant YsrT et se retrouve sous forme soluble et est essentiel au transfert de phosphate de YsrS vers YsrR (Walker et al., 2010).

- Le système CblRST de *Burkholderia cenocepacia*, contrôle l'expression de pili facilitant l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales respiratoires et aux mucines ainsi que des interactions entre cellules de *B. cenocepacia*. CblS et CblT sont tous deux des capteurs-kinases à VFT et CblR le régulateur de réponse qui leur est associé. Même si les signaux exacts perçus par les capteurs sont inconnus, l'expression de l'opéron *cbl* (responsable de la synthèse des pili) est modulé par des stimuli environnementaux tels la température, le pH et l'osmolarité (Tomich and Mohr, 2004).

- *Borrelia burgdorferi* n'a dans son génome que deux systèmes à deux composants. De façon intéressante l'un d'entre eux possède un capteur-kinase à VFT, HpK1, associé au régulateur de réponse Rrp1 qui possède un domaine GGDEF, permettant la synthèse de c-di-GMP (Rogers et al., 2010). Ce système régule un important set de gènes de *Borrelia*, du métabolisme central à la virulence et l'évasion immunitaire, permettant ainsi l'adaptation à l'environnement nutritionnel et la survie chez la tique (Rogers et al., 2010). HpK1 contiendrait deux VFT (Caimano et al., 2011). Une analyse de la séquence indiquerait la présence de 3 domaines VFT. Le système serait induit lors du repas de la tique et est nécessaire pour la survie de *Borrelia* dans la tique (Caimano et al., 2011).

Les signaux perçus restent inconnus dans tous ces systèmes et l'absence de structures cristallographiques des capteurs-kinases ou de leurs domaines senseurs rendent difficile la compréhension de la régulation de leur activité kinase. La présence de domaines GGDEF et EAL, impliqués dans la synthèse et l'hydrolyse du c-di-GMP respectivement, dans des partenaires ou dans les régulateurs de ces systèmes semble assez courante. La régulation du

pool de c-di-GMP cellulaire doit permettre l'intégration de ces systèmes dans une voie de signalisation plus globale. Par ailleurs, on retrouve aussi des domaines VFT directement associés à la régulation de domaines GGDEF.

BvgS a été régulièrement cité comme fonctionnant comme un rhéostat plutôt que comme un système de tout ou rien. Cette caractéristique pourrait-elle être commune à cette famille ou au moins aux homologues de BvgS ? Cela provient-il seulement du capteur-kinase ou plutôt de ses partenaires et de son régulon via d'autres voies de signalisation telles celle du c-di-GMP? Ces questions resteront sans réponses pour le moment, mais des études structurales approfondies des capteurs-kinases et l'étude de leurs régulons pourraient aider à répondre à ces questions fondamentales.

b. Systèmes eucaryotes

Les domaines VFT se retrouvant dans tous les règnes du vivant, il n'est pas étonnant que certains systèmes eucaryotes les aient recrutés pour leur fonctionnement dans la transduction de signaux. Ils ont été recrutés dans une grande variété de récepteurs et il est donc impossible de faire une revue extensive de tous les systèmes mais des exemples choisis de ces systèmes seront décrits.

1) Venus Kinase Receptor

Assez récemment, **une famille de récepteurs tyrosine-kinases transmembranaires** contenant un module VFT a été identifiée. Cette famille, présente chez certains insectes et d'autres invertébrés, a été nommée Venus Kinase Receptor (VKR, Ahier et al. 2009). Les domaines VFT de ces récepteurs sont du type 2. Ces récepteurs ont été étudiés plus en détail chez *Schistosoma mansoni*, où ils semblent jouer un rôle dans le développement des stades larvaires, ayant un fort taux de transcription dans les stades larvaires et au niveau des ovaires des stades adultes (Gougnard et al., 2011). Les VKR fonctionneraient sous forme dimérique et leurs domaines VFT semblent capables de fixer des acides aminés telle la L-arginine (Ahier et al., 2009).

2) Canaux ioniques

Chez les eucaryotes supérieurs vertébrés, on retrouve une famille de **récepteurs ionotropes du système nerveux central** nommée **iGluR** (ionotropic Glutamate Receptor). Ces canaux activés par le glutamate sont responsables de la majorité de la neurotransmission excitatoire dans le cerveau. Ils permettent un flux de cations, dont le Ca^{2+} connu pour son implication dans le développement et dans la plasticité neuronale nécessaire aux fonctions cognitives supérieures comme l'apprentissage et la mémoire (Dingledine et al., 1999). Les iGluR se divisent en trois sous-familles : les récepteurs à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-izozazolepropionique (AMPA), les récepteurs au kainate (KRs) et les récepteurs au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDARs). Chacune d'elle aurait un rôle particulier au sein du système nerveux, même si une certaine redondance n'est pas exclue par exemple entre KRs et AMPARs (Yan et al., 2013).

Vu leur implication dans certaines pathologies comme l'épilepsie ou des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ces récepteurs ont été extensivement étudiés. Ce sont des canaux ioniques tétramériques possédant en position N-terminale deux domaines VFT (respectivement dénommés **ATD**, pour Amino-Terminal Domain ou NTD pour N-Terminal Domain, VFT de type 1, et **LBD** pour Ligand-Binding Domain ou ABD pour Agonist-Binding domain, VFT de type 2) qui vont contrôler l'ouverture du canal (Sobolevsky et al. 2009, fig. 39). Les sous-unités d'un tétramère peuvent être hétérologues et au sein de chaque famille on dénombre plusieurs sous-unités pouvant s'associer entre elles (Dingledine et al., 1999).

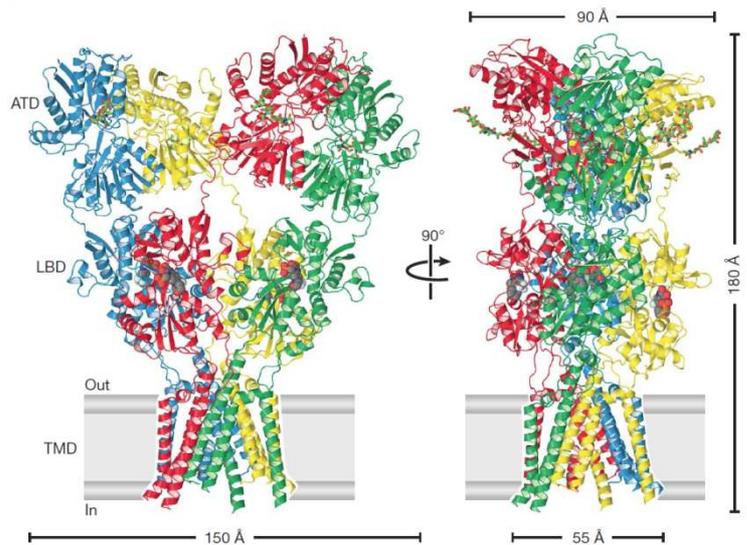


Figure 39 Représentation schématique d'un tétramère d'un récepteur AMPA (code PDB : 3KG2) dans la membrane. Tiré de Sobolevsky et al. 2009

La capacité de contrôle de l'activité du canal ionique provient de la faculté de liaison d'un ligand par les domaines ATD et LBD. Le domaine LBD va pouvoir fixer un ligand activateur et sa conformation fermée va permettre l'ouverture du canal. Le remplacement de ce domaine par un domaine équivalent d'une autre famille confère une activité dépendante du ligand du nouveau domaine introduit indiquant bien que la spécificité du LBD pour un ligand permet l'ouverture du canal en sa présence (Herin and Aizenman, 2004). **Les canaux NMDA** étant particulièrement documentés, ils **serviront d'exemple mécanistique**.

Au repos les domaines VFT sont donc ouverts sans ligands et le canal ionique fermé. En présence d'un ligand activateur comme la glycine ou le glutamate, qui peut être fixé par les domaines LBD des sous-unités NR1 et NR2A respectivement, le canal va s'ouvrir (fig. 40, Gielen et al. 2008). Ce mécanisme de base a été confirmé par l'introduction de résidus cystéine dans les domaines LBD des sous-unités NR1 et NR2 permettant la fermeture de ces domaines par formation d'un pont disulfure entre les deux lobes. Cette configuration entraîne l'activité constitutive du canal ionique (Blanke and Vandongen, 2008). Bien que les iGluR aient été caractérisés en tant que tétramères, l'unité fonctionnelle de référence est le dimère (hétérodimère NR1-NR2A dans le cas des NMDA), sans doute en raison des interfaces uniquement dimériques entre les domaines ATD et LBD (Furukawa et al., 2005). Ces interfaces sont importantes entre les domaines LBD pour l'ouverture du canal en permettant d'augmenter la distance relative entre les linkers reliant les domaines LBD au

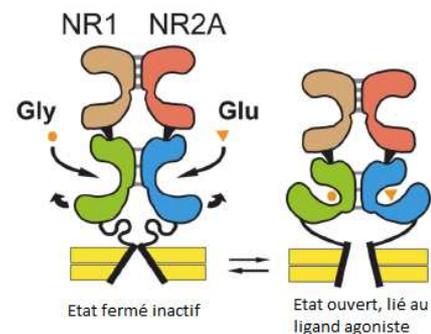


Figure 40 Schéma d'activation des récepteurs NMDA par les agonistes glycine et glutamate. Adapté de Gielen et al. 2008

domaine membranaire lors de la liaison du ligand agoniste, générant ainsi la tension nécessaire à cette ouverture (Kristensen et al., 2006).

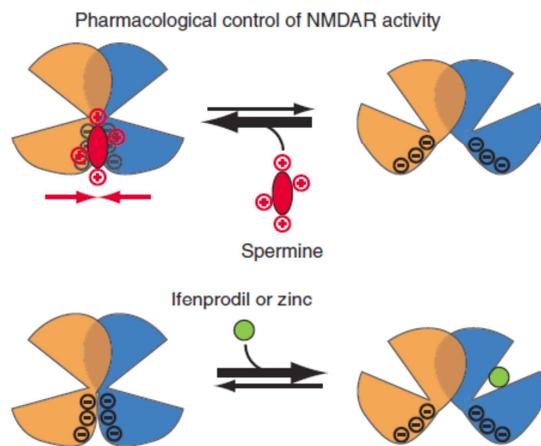


Figure 41 Illustration schématique de la modulation allostérique via les domaines ATD dans les récepteurs NMDA. En haut la modulation allostérique positive, en bas la négative. Tiré de Mony et al. 2011.

Les domaines ATD quant à eux **vont permettre de moduler cette ouverture** en permettant la fixation de ligands définis comme des modulateurs allostériques. Le zinc en est un bon exemple dans les NMDA mais loin d'être le seul. Cette capacité de modulation dépend du domaine ATD mais aussi de l'organisation hétérodimérique et est dépendante du pH, l'état d'ionisation de la protéine ayant un impact sur sa capacité de réponse (Herin and Aizenman, 2004). Ceci permettrait une réponse à de faibles variations du pH extracellulaire. De même la capacité de désensibilisation du canal (donc sa refermeture) est liée aux protons. Le mécanisme de cette dépendance aux protons n'est pas

encore bien défini. Cela pourrait provenir d'une fixation au niveau de l'interface entre les domaines ATD en facilitant sa rupture, mais semble aussi se faire dans un site associé aux domaines transmembranaires (Gielen et al., 2008). D'un autre côté, des polyamines comme la spermine pourraient avoir, au contraire, un effet potentiateur en agissant aussi sur les domaines ATD des sous-unités GluN1 et GluN2B en se fixant dans une zone d'interface entre ces domaines et en la stabilisant (Fig. 41, Mony et al. 2011). Cette interface est celle-là même qui, lorsqu'elle est rompue par la fixation d'un ligand (comme le zinc) dans la cavité du domaine ATD (de GluN2B particulièrement), permet une refermeture du canal. Elle est composée de résidus chargés négativement, et sa stabilisation par la spermine (chargée positivement) se fait grâce à une opposition de charge, permettant le maintien du domaine ATD en forme ouverte (Mony et al., 2011). Un modulateur allostérique, l'ifenprodil, qui est une phényléthanolamine, a été décrit comme interagissant avec les domaines ATD. Il a été démontré récemment que son action n'est pas une liaison directe dans la cavité d'un domaine ATD mais à l'interface entre les deux domaines ATD d'un hétérodimère GluN1/GluN2B, alors que les homodimères ne subissent pas de modulation allostérique par cette molécule (Karakas et al., 2011).

Les mécanismes de fixation de ligands agonistes ou antagonistes, ainsi que les jeux d'interfaces entre les sous-unités, vont permettre la régulation fine de l'activité du canal ionique. Ces phénomènes vont jouer sur la tension entre les linkers reliant les domaines ATD (NTD) et LBD (ABD) ainsi que les domaines LBD au domaine membranaire. En effet **la tension du linker entre les domaines LBD et membranaires va permettre l'ouverture du canal**. Au contraire, **la tension du linker entre les domaines NTD et LBD va induire une refermeture du canal en rompant une interface entre les domaines LBD**, relâchant ainsi la tension du linker entre ces domaines et les domaines membranaires qui gouverne l'ouverture du canal (Gielen et al., 2008).

Ces mécanismes de régulation de l'ouverture du canal par un jeu de tension des linkers entre domaines sont communs à la famille des iGluR, bien que des différences subtiles existent entre les différents sous-domaines et les différentes sous-familles. Ces différences ont été caractérisées récemment au niveau de leur dynamique et de leur mobilité (Dutta et al., 2012), générant des différences dans la possibilité de modulation de l'activité du canal ionique. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, les différences de cinétique et d'amplitude d'activité des canaux ioniques dans cette famille (Yan et al., 2013). Il existe aussi, bien entendu, des différences en terme de séquence et d'arrangement des sous-unités (Dingledine et al., 1999), mais aussi au sein d'une même sous-unité car un épissage alternatif des introns générant des variants de la sous-unité est possible et aurait une répercussion sur la sensibilité aux différents agonistes et antagonistes comme démontré dans le cas de la potentiation par la spermine (Mony et al., 2011).

3) Un véritable parallélisme entre canaux ioniques et capteurs-kinases ?

Les capteurs-kinases bactériens fonctionnent très certainement sous forme dimérique, comme cela a été décrit pour les histidine-kinases (cf. II.B. Les domaines Histidine-kinase), tout comme les sous-unités des canaux ioniques ont pour unité fonctionnelle le dimère (Furukawa et al., 2005). **Un agencement multimérique** (di- ou tétramérique) **semble adapté à la signalisation et sa régulation** par des phénomènes allostériques et des jeux d'interfaces protéiques.

Cependant, dans les systèmes bien documentés des iGluR, le rôle des linkers entre domaines semble important, car ils vont transmettre des informations de tension/relaxation, un système tendu résultant dans l'ouverture du canal. Au contraire, dans les systèmes bactériens ces régions sont très variables, et l'on peut donc d'ores et déjà se demander si ces linkers ont une réelle importance dans la transduction de signaux. En effet, il est difficile de conceptualiser un mécanisme commun à la famille des capteurs-kinases bactériens qui ferait intervenir ces linkers, au vu de leur diversité de taille particulièrement entre les VFT (Jacob-Dubuisson et al., 2012). Une transmission de tension via des linkers, lorsque ceux-ci sont fortement allongés, semble peu probable. Leur état non structuré donnerait une liberté de mouvement vraisemblablement incompatible avec une bonne transmission d'informations entre les domaines, et d'autant plus dans un système qui aurait quatre domaines VFT. Les mécanismes d'ouverture d'un canal d'une part et de régulation d'une activité kinase d'autre part ne nécessitent certainement pas le même type de contraintes de transmission. **Une tension symétrique suffit à ouvrir un canal, alors que la régulation d'une fonction kinase semble difficile via ce type de mouvements** « simples ». La comparaison entre les systèmes eucaryotes et procaryotes reste donc somme toute limitée, même si **les jeux d'interfaces entre les monomères des iGluR pour la modulation allostérique semblent une piste privilégiée pour comprendre les mécanismes de régulation de l'activité des domaines sous-jacents**. Ce rôle des interfaces entre domaines a aussi été mis en évidence dans les récepteurs à peptides natriurétiques dans lesquels l'activateur se fixe à l'interface entre les domaines VFT (cf. ci-dessous, 4) Récepteur aux peptides natriurétiques, He et al. 2005).

Il faut bien noter que les **domaines VFT1 entre ces systèmes sont de types différents** (en majorité, particulièrement pour le domaine membrane-proximal), et donc **leur topologie** (extrémités N et C dans le lobe 1 pour le type 2, et dans les lobes 1 et 2 respectivement pour le type 1), **impliquera des contraintes différentes dans les protéines multi-domaines** auxquelles ils vont appartenir. De même les contraintes de raccordement entre les VFT et le domaine transmembranaire sont différentes entre ces systèmes. Un segment déstructuré en sortie du VFT suivi d'une hélice α , qui se prolongerait dans la membrane, est prédit dans les systèmes bactériens alors que seul un linker déstructuré est présent pour raccorder les VFT aux portions membranaires des canaux ioniques, indiquant bien une différence majeure dans la transduction du signal au niveau membranaire. Comment cette transmission de signal se fait-elle au travers du domaine transmembranaire ? Ce point très critique du fonctionnement des capteurs-kinases reste à étudier dans les systèmes bactériens.

Les jonctions entre les domaines sous-membranaires des systèmes bactériens allant jusqu'à la kinase étant généralement considérées comme des enroulements d'hélices (coiled-coil), la problématique de la longueur semble moins drastique pour la transmission d'information. En effet, ajouter 7 résidus équivaudrait à ajouter 2 tours d'hélices, ce qui permettrait le maintien de la topologie. En revanche, une possible atténuation du signal par la longueur de ces domaines devrait être prise en compte (cf. V.C.3. Transduction du signal vers la kinase).

4) Récepteur aux peptides natriurétiques

Les récepteurs aux peptides natriurétiques (NPR, Natriuretic Peptide Receptor) sont une famille de récepteurs hormonaux impliqués par exemple dans la régulation de la pression sanguine. Ils sont composés d'un domaine VFT extracellulaire glycosylé relié par un segment transmembranaire à des domaines cytoplasmiques de signalisation dépendant de la classe du récepteur. Ils fonctionnent sous forme de dimères, et une de leur caractéristique est la fixation d'une seule molécule agoniste pour l'activation du récepteur dimérique.

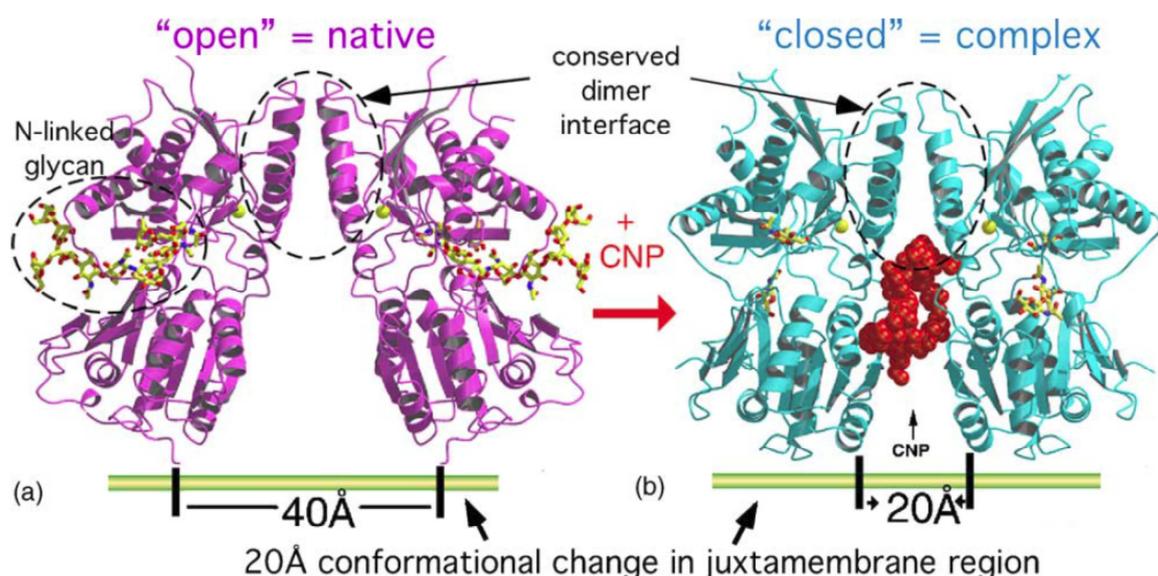


Figure 42 Structure du NPR-C lié (b, code PDB : 1YKO) ou non lié (a) au peptide natriurétique atrial (CNP). Tiré de He et al., 2005

En effet, les domaines VFT du NPR-C ont pu être cristallisés en présence du peptide natriurétique atrial (code PDB : 1YK0), montrant que **ce ligand se fixe dans l'interface entre les VFT** et générant ainsi un rapprochement structural proche de la membrane qui doit permettre l'activation du récepteur. (Fig. 42, He et al., 2005). Cet exemple montre bien l'adaptabilité des domaines VFT, ayant évolué ici pour permettre une fixation au niveau d'une interface dimérique plutôt que dans la cavité, mécanisme que l'on retrouve aussi chez les NMDA.

Les VFT de BvgS seraient-ils eux aussi capables de fixer un ligand dans une interface dimérique putative ?

5) Les récepteurs couplés aux protéines G

Afin de compléter cette vue générale mais non exhaustive sur le recrutement des domaines VFT au sein de récepteurs eucaryotes, l'exemple des récepteurs couplés aux protéines G sera brièvement discuté.

- Dans le système nerveux central, deux grandes classes de récepteurs couplés aux protéines G contenant des domaines VFT ont été identifiés. Ce sont les récepteurs métabotropiques au GABA (metabotropic GABA receptor, ou GABA_B receptor) et les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) eux-mêmes divisés en 3 groupes selon leur structure et leur activité (Rondard et al., 2011). Ils fonctionnent sous forme dimérique avec les lobes 1 des domaines VFT en interaction (Fig. 43), et cette forme est stabilisée par un pont disulfure entre monomères chez les mGluR.

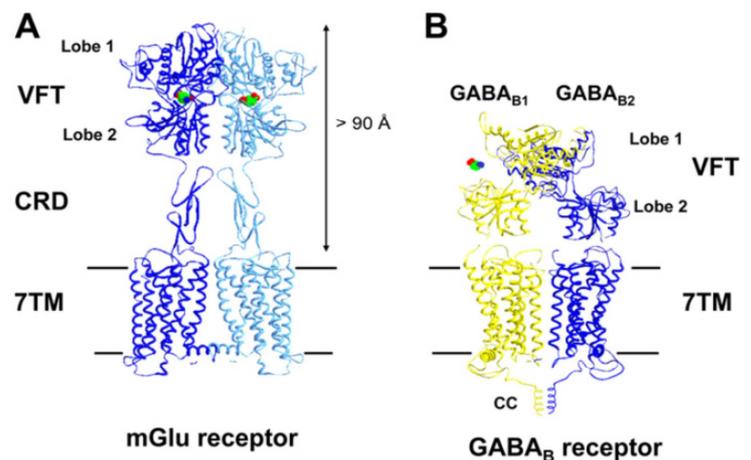


Figure 43 Modèles structuraux des mGluR (A) et des récepteurs GABA_B (B). Tiré de Rondard et al., 2011.

Ils sont activés en présence de leur ligand agoniste (glutamate ou GABA) au travers des mouvements des lobes des VFTs. Cependant, une modulation plus fine est possible au travers de diverses molécules, mais ne sera pas discutée ici.

Ces récepteurs sont phylogénétiquement liés entre eux, de même qu'avec les récepteurs au goût sucré (Rondard et al., 2011).

- Les récepteurs du goût sucré (« Sweet-taste receptor »), contiennent un domaine VFT de type 1 extracellulaire relié à un domaine de 7 hélices transmembranaires. Ils fonctionneraient sous forme d'hétérodimères. L'absence de structure cristallographique rend difficile la compréhension du fonctionnement de la signalisation par ces domaines. Seuls des modèles par homologie avec les récepteurs NMDA sont disponibles. La diversité de taille et de structure des molécules (petites molécules à protéines) reconnues pour le goût sucré

implique que leur reconnaissance devrait se faire dans des sites différents et les zones d'interaction restent hypothétiques (Zhang et al., 2010).

6. Conclusions sur l'utilisation des VFT

Nous avons donc vu que de très nombreux systèmes ayant des topologies et des fonctions très variées ont recruté des domaines VFT pour leur fonctionnement. La façon dont les domaines VFT vont pouvoir réguler l'activité de ces systèmes semble majoritairement reposer sur deux capacités fondamentales, la fixation de ligands et l'oligomérisation.

Leur capacité de fixation de ligands va permettre l'existence de **deux formes : ouverte et fermée**. Ces dernières **vont générer des contraintes structurales différentes permettant de modifier l'état de signalisation** du système considéré. La présence de plusieurs modules va permettre une régulation plus fine en permettant la liaison de ligands distincts qui auront alors des effets activateurs ou inhibiteurs selon leur zone de fixation.

De nombreux systèmes décrits ci-dessus **fonctionnent en tant qu'oligomères**, et cette capacité d'oligomérisation **semble importante dans la régulation de l'activité de ces systèmes** par effet allostérique. **Les interfaces** entre les différents modules **vont alors avoir un rôle clé** dans l'état de signalisation du système. Un niveau de complexité supérieur à celui d'une simple intégration des signaux « ouverts/fermés » des domaines VFT est ainsi apporté par ces interfaces entre domaines. En effet, elles peuvent elles-mêmes apporter une sensibilité à certaines molécules en étant stabilisées ou déstabilisées par leur présence. Elles peuvent être directement la cause de l'activation du système, comme dans le cas du récepteur au peptide natriurétique où la poche de liaison du ligand activateur est l'interface elle-même, ou encore la cible d'effecteurs allostériques permettant la modulation du système comme chez les iGluR.

Ces deux capacités ne s'excluent donc pas l'une l'autre pour définir l'état d'un système, bien au contraire. L'exemple des NMDA montre bien que ce sont les états ligandés ou non de chaque domaine VFT qui vont majoritairement influencer sur les interfaces entre domaines au sein du récepteur complet. On peut donc envisager que dans les protéines multimériques, c'est **un positionnement différent des interfaces inter-unités qui va permettre de définir l'état d'activation du système**, interfaces elles-mêmes déterminées par l'état de liaison des domaines VFT.

Dans le cas de BvgS, l'état dimérique n'avait jusqu'à récemment été confirmé qu'au niveau de la kinase. Nous avons donc émis l'hypothèse que cet état dimérique se retrouve dans l'ensemble de la protéine et est une caractéristique nécessaire au bon fonctionnement du système. Cependant la capacité des domaines VFT de BvgS à interagir entre eux, et dans quelle mesure, restait une énigme que nous étions bien décidés à élucider, étant convaincus que, comme dans nombreux systèmes, elle ouvrirait une voie vers la compréhension de la transduction de signal par ces domaines.

V. Les domaines « Per-Arnt-Sim »

A. Que sont les domaines Per-Arnt-Sim (PAS) ?

Les domaines PAS sont retrouvés dans tout le règne vivant. Ils ont été premièrement définis sur la base d'une homologie et de la présence de séquences répétées imparfaites d'une cinquantaine de résidus dans trois protéines eucaryotes, nommés alors motifs PAS. Il s'agit des protéines « Period clock » (« Per ») de la drosophile, « Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator » (« Arnt ») présentes chez les vertébrés, et d'une autre protéine de drosophile, « Single-minded protein » (« Sim », Taylor and Zhulin, 1999). D'autres résidus, situés du côté C-terminal de cette région, ont été reconnus comme formant un autre motif, dénommé PAC ou boîte S₂. Finalement, ces 2 motifs ne constituent qu'un seul et unique domaine protéique, le domaine PAS (Möglich et al., 2009a).

1. Caractéristiques structurales

Il existe une très grande variété de séquences au sein de ces domaines, et l'homologie entre domaines PAS est parfois presque nulle. **Ces domaines sont composés d'une centaine de résidus**, et parmi eux, seuls 9 sont relativement conservés. En fait, trois quarts des domaines PAS ne contiennent que 4 à 7 de ces 9 résidus conservés et une asparagine particulière (parfois remplacée par une sérine) est le résidu le plus conservé. Elle participe au « helical capping », ponts hydrogène nécessaires à la fonctionnalité et la stabilité du domaine PAS (Kumauchi et al., 2010). Il a donc été longtemps difficile de pouvoir prédire la présence d'un domaine PAS au sein d'une protéine sur la base de motifs conservés, mais un motif C-terminal de séquence DIT (le résidu D étant le plus conservé du motif) est assez commun dans ces domaines (Möglich et al., 2009b).

Leur structure tertiaire est quant à elle très conservée et permet une bonne reconnaissance du **repliement (fold) PAS**. C'est cette structure particulière qui définit aujourd'hui la superfamille des domaines PAS. Il s'agit d'un **enchaînement de structures secondaires A β , B β , Ca, Da, Ea, Fa, G β , H β et I β** (fig. 44), qui vont permettre un repliement spécifique avec un feuillet β antiparallèle incluant les cinq brins dans l'ordre B A I H G (soit 2-1-5-4-3) flanqué par les hélices α du domaine. Les hélices α varient parfois en nombre tandis que **le feuillet β est l'élément le plus conservé** (Möglich et al., 2009a). Une cavité est délimitée par ces éléments structuraux dans laquelle peut se retrouver un ligand ou un co-facteur.

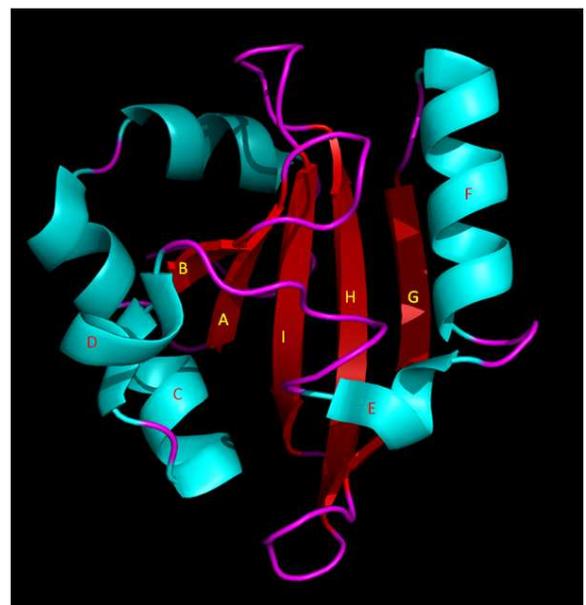


Figure 44 Représentation du domaine PAS de la protéine PYP (Photoactive Yellow Protein, code PDB : 2QJ7). Les structures secondaires caractéristiques du repliement PAS sont notées de A à I.

On retrouve souvent la dénomination « PAS-core » (noyau PAS) pour les éléments A β , B β ,

C α , D α et E α ; l'hélice F α est nommée connecteur hélical et les 3 derniers brins β forment le « β -scaffold » (échafaud béta).

De très nombreux domaines PAS ont été cristallisés, permettant de définir cette superfamille par une structure conservée malgré les disparités de séquences qui tendaient à les séparer. Ainsi des caractéristiques particulières ont défini divers membres de la superfamille des domaines PAS et sa nomenclature.

2. La superfamille des domaines PAS

Les domaines PAS sont capables de remplir diverses fonctions, particulièrement de ressentir un paramètre physico-chimique comme la lumière, l'oxygène ou le potentiel redox. Dans ces cas **ils possèdent un cofacteur particulier** qui sera par exemple un chromophore, de l'hème ou la FAD respectivement. **Ils peuvent aussi avoir comme ligand des molécules assez variées** comme le palmitate (King-Scott et al., 2011), des acides di-carboxyliques (C3 et C4, Zhou et al., 2008) ou encore un acide aminé (Glekas et al., 2009)... **Tous les domaines PAS ne semblent pas avoir de ligands ou de cofacteurs**, et il est donc vraisemblable qu'ils puissent servir de transducteurs ou d'amplificateurs de signal et non seulement percevoir un signal via une molécule.

Comme nous l'avons vu, cette superfamille se définit par sa structure. Cependant, **les caractéristiques particulières des membres de cette superfamille la subdivisent** en familles définies par leurs particularités, type de signal perçu ou localisation.

Par exemple les domaines PAS capable de percevoir la lumière sont regroupés dans la famille des **domaines LOV** (Light Oxygene or Voltage, Krauss et al., 2009). Bien que décrits comme étant des domaines cytoplasmiques, des domaines PAS extra-cytoplasmiques ont aussi été décrits (Chang et al., 2010). Il s'agit de domaines **CACHE** (CALcium channels and CHEmotaxis receptors) et des domaines **PDC** (PhoQ-DcuS-CitA) qui malgré quelques caractéristiques de séquences et de structures propres conservent le repliement PAS (Möglich et al., 2009a).

Les domaines PAS sont très proches structurellement des domaines GAF (phosphodiesterases spécifique du cGMP, Adénylate cyclase et FhlA, fig. 45) bien que très divergents en séquence. La différence notable est la présence de 6 brins β dans le repliement GAF au lieu de 5 dans le PAS. Il arrive que des domaines annotés PAS possèdent 6 brins béta alors que des domaines annotés GAF n'en possèdent que 5, ce qui génère une certaine confusion entre ces types de domaines. Il n'est toujours pas possible de déterminer si leurs mécanismes de signalisation sont réellement distincts et méritent la conservation d'une terminologie différente (Möglich et al., 2009a). Vu la grande variété de processus régulés par les domaines PAS et GAF et le recoupement que l'on peut faire parfois entre



Figure 45 Représentation d'un domaine GAF sensible à la lumière (PixJ, code PDB : 4GLQ). Les 6 brins bêtas du feuillet sont visibles en rouge.

eux, pouvant être présents dans une même protéine, nous ne traiterons pas plus avant des domaines GAF, non représentés chez BvgS bien que présents dans des senseurs contenant des domaines VFT d'architecture proche.

3. Autour des domaines PAS

Bien qu'il existe des domaines PAS isolés, **ils sont le plus souvent associés à d'autres types de domaines au sein d'une même protéine**, domaines auxquels ils sont souvent reliés par des connecteurs en hélice α . On retrouve par exemple des domaines HAMP (Histidine-kinases, Adénylate cyclases, protéine acceptant un Méthyl et Phosphatases), des domaines MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein), des domaines GGDEF et des domaines EAL respectivement impliqués dans la synthèse et l'hydrolyse du di-GMP cyclique, des canaux ioniques, des domaines sérine/thréonine-kinase ou encore des domaines histidine-kinase pour ne citer qu'eux (Möglich et al., 2009a).

Bien que certains domaines PAS aient cristallisé sous forme monomérique, ils possèdent une aptitude très prononcée à former des oligomères. En effet, les domaines PAS permettent la formation de dimères dans de nombreux cas bien décrits (notons particulièrement l'exemple des PAS associés aux histidine-kinases, Möglich et al., 2009). Non seulement ils forment des homodimères mais aussi des hétérodimères, particulièrement chez les eucaryotes dans des facteurs de transcription particuliers, et permettent ainsi une interconnexion entre différents régulateurs (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 2004; McIntosh et al., 2010). Cette dimérisation s'effectue généralement au niveau d'une petite région hydrophobe de la surface externe du feuillet bêta des monomères. Cette région est aussi impliquée dans les contacts avec des hélices flanquantes souvent retrouvées autour de ces domaines. Dans un tel cas, le dimère s'organise parallèlement de façon à ce que les extrémités N-terminales des deux monomères soient proches (Möglich et al., 2009a).

B. Une structure, de nombreux rôles

Malgré une structure fortement conservée, les domaines PAS sont capables de fixer divers cofacteurs ou molécules. Cette variété implique qu'ils peuvent permettre la transduction de différents signaux pour aboutir à une fonction biologique particulière. Cette diversité se retrouve dans le nombre d'organismes possédant des domaines PAS dans leurs protéines et, par ailleurs, elle s'exemplifie par la diversité des domaines couplés aux domaines PAS.

Nous nous servons donc de quelques exemples pour illustrer les divers rôles des domaines PAS dans des voies de transduction de signal originales en explorant des aptitudes de réponse à des signaux différents et des couplages moléculaires différents, bien que de manière non exhaustive vu leur grand nombre. Entre autres exemples omis ici, citons tout de même celui de la sporulation chez *Bacillus subtilis* qui fait intervenir un capteur kinase, KinA, contenant trois domaines PAS cytoplasmiques dont les rôles respectifs restent mal compris hormis leur capacité de dimérisation qui ressort comme étant une caractéristique majeure de ces domaines PAS (Eswaramoorthy and Fujita, 2010; Eswaramoorthy et al., 2009).

1. Ecartez-vous, on sort !

Comme décrit précédemment, **les domaines PAS ne sont pas exclusivement localisés au niveau cytoplasmique**. Cette différence de localisation reflète à nouveau une diversité de fonction de ces domaines. Cette localisation a été jusque récemment mal reconnue, et seules des prédictions structurales non basées sur l'homologie de séquence permettent une bonne identification. Ces domaines extracytoplasmiques **seraient en réalité les plus représentés des domaines extracytoplasmiques d'histidine-kinases bactériennes** et seraient des domaines PAS capables de fixer un ligand (Henry and Crosson, 2011). Ainsi, nous verrons, au travers de quelques exemples, différents rôles de ces domaines.

a. Les domaines PDC

Ces domaines ont été identifiés dans les protéines senseurs PhoQ, DcuS et CitA de **systèmes à deux composants**, dont ils tirent leur nom et que nous utiliserons comme exemples.

Le système PhoP/PhoQ est décrit précédemment (cf. II.A.2.c.1 PhoPQ). Le domaine PAS du capteur-kinase **PhoQ permet la perception de cations divalents** (Cheung et al., 2008).

DcuS a été décrit chez *Escherichia coli*. C'est une protéine transmembranaire contenant deux domaines PAS : un périplasmique et un cytoplasmique, suivis d'une histidine-kinase. Le domaine PAS périplasmique permet la **liaison d'acides di-carboxyliques (C4)**, alors que le domaine cytoplasmique servirait plutôt de relais dans le transfert du signal (Witan et al., 2012a). DcuS en présence de ces signaux va être phosphorylé et transférer son phosphate à DcuR qui va alors permettre l'activation de gènes impliqués dans le transport (notamment ceux des transporteurs DcuB et DctA) et le métabolisme de ces composés. DctA et DcuB servent de co-senseurs au système DcuS/DcuR, respectivement en conditions aérobie ou anaérobie. DctA serait capable d'interagir directement avec le PAS cytoplasmique de DcuS (Witan et al., 2012b).

CitA est un homologue de DcuS et interagit avec le régulateur de réponse CitB qui va permettre la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la fermentation du citrate. Son domaine PAS périplasmique **lie spécifiquement le citrate, l'isocitrate et l'acide tricarballoylique** (Fig. 46), tandis que la fonction du domaine cytoplasmique n'est pas clairement définie. Contrairement à Dcus, CitA ne dépend pas de la présence de transporteurs pour son activité kinase (Scheu et al., 2012).

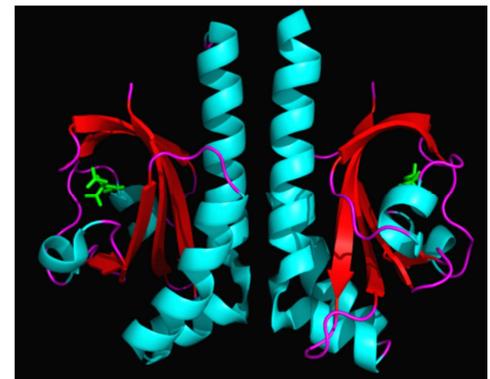


Figure 46 Représentation d'un dimère du domaine périplasmique de CitA (code PDB : 2J80), chaque domaine PAS a piégé un citrate (en vert).

b. Les domaines CACHE

Les domaines CACHE ont été définis sur la base d'homologie entre différents domaines PAS retrouvés au niveau extracytoplasmique de certaines protéines. Ils sont couplés à des canaux ioniques à Ca^{2+} voltage dépendant, des phosphodiesterases, des adénylate cyclases (Anantharaman and Aravind, 2000)... Nous verrons brièvement en exemples les deux

premiers membres identifiés de cette famille, **les canaux ioniques et les récepteurs de chimiotaxie**.

1) Récepteurs de chimiotaxie

Des domaines **PAS périplasmiques** ont été décrits chez *B. subtilis*. Il s'agit de domaines **impliqués dans la liaison de ligand** au sein des récepteurs de chimiotaxie McpA, McpB et McpC. Ces protéines contiennent **un domaine PAS extracellulaire suivi d'un domaine HAMP et d'un domaine de transduction accepteur de méthyl**. Le domaine PAS de McpB est capable de lier des acides aminés, notamment l'asparagine (Glekas et al., 2009). McpA serait responsable en partie de la chimiotaxie au glucose. McpC permet à la bactérie de réagir en présence de sucres, particulièrement ceux qui seront pris en charge par un système de transport particulier dépendant du phosphoénolpyruvate. McpC serait aussi impliqué dans la perception de certains acides aminés (Garrity et al., 1998). Ils vont ainsi permettre à la bactérie de percevoir la présence de signaux particuliers, représentant des sources de nutriments, pour qu'elle puisse s'y adapter en modulant son attitude de nage (cf. II.B.2.b. chimiotaxie).

2) Canaux ioniques HERG

Des **domaines PAS** sont retrouvés **associés à certains canaux ioniques au potassium dépendant du voltage**. Il s'agit de la famille des canaux ioniques ERG (Ether-a-go-go-Related Genes) retrouvés chez les mammifères au niveau du cœur et dans le système nerveux central. Ils sont impliqués dans des processus variés comme la repolarisation cardiaque, l'excitabilité neuronale, la différenciation cellulaire et la croissance tumorale (Adaixo et al., 2013; Shepard et al., 2007).

Bien qu'ayant servi à définir la famille de **domaines CACHE** qui sont **extracellulaires chez les bactéries, les domaines PAS/CACHE de ces canaux sont intracellulaires**, mais aussi en position N-terminale de la protéine complète, et permettraient des interactions avec des protéines de signalisation intervenant dans un niveau de régulation complémentaire. Il n'y a pas de ligand dans la cavité des domaines PAS cristallisés de ces canaux, mais celle-ci serait relativement flexible et permettrait tout de même la fixation de petites molécules. Ces domaines conservent les caractéristiques classiques de la famille, entre autres leur feuillet bêta est hydrophobe et permet des interactions protéine/protéine (Adaixo et al., 2013). Le rôle précis de ces domaines n'est pas encore élucidé et les hypothèses fonctionnelles ne seront pas discutées ici.

2. PAS, je vous « hème »

Les domaines PAS peuvent avoir comme cofacteur un hème. Ils se divisent en 2 catégories selon le type d'hème fixé : b ou c. Les PAS liant un hème de type c sont moins bien caractérisés, et peuvent se retrouver au niveau extracytoplasmique (Henry and Crosson, 2011). Nous verrons plus précisément les caractéristiques des domaines liant un hème de type b, dont le fonctionnement est bien caractérisé.

a) PAS à hème de type b

Ils ont été caractérisés à partir de la protéine **FixL**, un **capteur-kinase** présent chez différentes espèces d' α -protéobactéries, particulièrement *Rhizobium*. Le système à deux composants FixL/FixJ contrôle l'expression des gènes responsable de la fixation d'azote en fonction de la concentration d'oxygène. En effet la présence d'oxygène est délétère pour la nitrogénase et donc **la présence d'oxygène sera perçue par FixL** pour éteindre l'expression des gènes impliqués dans la fixation d'azote (Monson et al., 1995). Ce système a été très étudié chez *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium meliloti*.

Un autre membre de cette famille provient de la protéine **DOS** (Direct Oxygen Sensor) d'*E. coli*, **une phosphodiesterase régulée par l'oxygène**, qui va catalyser le clivage du di-GMP cyclique en pGpG (Tanaka et al., 2007). Dans les deux cas, la liaison de l'hème se fait sur un résidu histidine conservé situé dans l'hélice F α (Fig. 47), et d'autres résidus seront nécessaires à la perception du gaz lié à l'hème (El-Mashtoly et al., 2008).

On peut aussi citer la protéine **NPAS2**, qui contient deux domaines PAS (ayant chacun un hème) et un domaine de liaison à l'ADN. Il s'agit d'**un facteur de transcription** eucaryote fonctionnant en hétérodimère avec un autre facteur de transcription (ARNT-like1 ou BMAL1 contenant aussi 2 domaines PAS) impliqué dans le fonctionnement de l'horloge circadienne. Dans ce cas, c'est la présence de monoxyde de carbone qui va empêcher l'hétérodimérisation et donc la fonction (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 2004).



Figure 47 Représentation du domaine PAS à hème de FixL (code pdb : 1LSW). En jaune le résidu histidine nécessaire à la fixation de l'hème (en vert).

b) Perception de l'oxygène

De très nombreuses études ont été menées afin de définir les mécanismes de perception de l'oxygène et d'autres gaz par des PAS à hème. Nous nous intéresserons ici au domaine PAS de FixL qui régule son activité kinase.

Dans ces domaines PAS, **l'hème est inclus dans une poche** relativement **hydrophobe**, et son **fer est pentacoordiné** (Gong et al., 1998). Bien que le groupement hème présent dans ces domaines PAS puisse être sous forme ferrique (Fe^{3+}) ou sous forme ferreuse (Fe^{2+} , Möglich et al., 2010) il semblerait que l'état rédox du fer n'influe pas sur les mécanismes de signalisation (Gong et al., 1998) ; ainsi les différences entre l'une et l'autre de ces formes ne seront pas mises en exergue. Il est intéressant de noter qu'il existe un système qui percevrait justement cette différence d'état rédox du fer de l'hème chez les bactéries du genre *Brucella* et dont un homologue existe chez les *Bordetellae* (Carrica et al., 2012; Kaut et al., 2011).

Le ligand physiologique qui inactive le système est le dioxygène ou peut être le monoxyde d'azote. L' O_2 permet l'inactivation de la forme ferreuse qui représenterait l'état physiologique. L'affinité pour ces gaz est dans la gamme attendue pour un hème dans un

environnement hydrophobe, mais les constantes de vitesse d'association et de dissociation sont assez faibles, ce qui permettrait une meilleure régulation de l'activité kinase en empêchant un réarrangement structural trop rapide ou fréquent (Dunham et al., 2003; Gong et al., 1998).

La coordination axiale se fait par le groupement imidazole d'un résidu histidine de l'hélice F α (His194 pour RmFixL, His200 pour BjFixL, Miyatake et al., 2000). Sa substitution entraîne la perte de fixation de l'hème et génère un système actif par défaut qui n'est plus régulé par l'oxygène (Monson et al., 1995). Les autres résidus en interaction avec l'hème vont quant à eux permettre de définir la sensibilité aux différents gaz qui peuvent se lier à l'hème ainsi qu'influer sur leur cinétique de fixation et sont majoritairement situés au niveau de la boucle liant l'hélice F α au brin G β mais aussi dans le feuillet bêta (Gong et al., 1998; Miyatake et al., 2000).

L'association ou la dissociation de l'oxygène va entraîner un changement structural qui sera retransmis à la kinase pour réguler son activité. Il s'agit premièrement d'un réarrangement de la distribution des ponts hydrogène entre le domaine PAS et l'hème. Ce réarrangement aura une répercussion sur la structure et serait transmis au niveau de **la boucle FG du domaine PAS** (un déplacement de l'ordre de 2Å, Dunham et al., 2003). Cette boucle serait en contact électrostatique avec le domaine kinase et permettrait ainsi une transmission directe du signal (Miyatake et al., 2000). Ce type de réarrangement au niveau de la boucle FG serait un mécanisme commun aux domaines PAS à hème (Ito et al., 2009). Ceci peut être étendu aux domaines PAS liant un ligand dans la mesure où la liaison implique là aussi un réarrangement au niveau de cette boucle (Möglich and Moffat, 2007; Pandini and Bonati, 2005).

Un résidu critique pour cette signalisation est un **résidu arginine distal**, premier résidu **du brin G β** (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 2005). Il s'agit d'un résidu conservé dans les senseurs FixL de différentes espèces et DOS d'*E. coli*, indiquant son importance fonctionnelle (Dunham et al., 2003). Ce résidu va permettre une meilleure efficacité de répression par l'oxygène comparé aux autres gaz ayant cet effet. En effet, il sert à améliorer la coordination de l'oxygène en interagissant directement avec ce dernier (Gilles-Gonzalez et al., 2006). En son absence, l'affinité pour l'O₂ décroît mais surtout la cinétique de fixation est très fortement diminuée (Dunham et al., 2003). **La chaîne latérale de cette arginine se situerait dans la zone hydrophobe en présence d'oxygène et s'en écarterait en son absence**, générant des ponts hydrogène avec des partenaires différents (Fig. 48, Gilles-Gonzalez et al., 2006). Il en résulterait un changement conformationnel transmis à la boucle FG induisant son déplacement comme décrit ci-dessus.

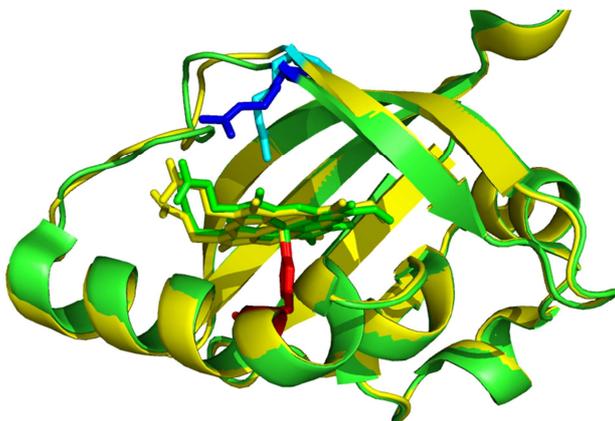


Figure 48 : Alignement structural des formes active (en vert, code PDB : 1XJ3) et inactive (en jaune, code PDB : 1LT0) de FixL de *Bradyrhizobium japonicum*. L'histidine 220 de l'hélice F α servant à la coordination axiale de l'hème est représentée en rouge. L'arginine distale 220 du brin G β est représentée en bleu pour l'état actif et en cyan pour l'état inactif (O₂). Le déplacement de la boucle FG (à gauche) est aussi visible.

Bien que les résidus décrits ici ne correspondent pas à la totalité des résidus impliqués dans la perception de l'oxygène et la signalisation en découlant (Gilles-Gonzalez et al., 2006), il s'agit des résidus les plus critiques et conservés, dont la substitution génère des systèmes très peu réactifs. L'implication d'autres résidus, situés dans la boucle FG et l'hélice F α particulièrement, dans la perception des différents gaz ne sera pas discutée plus en détail. Cette localisation se situe dans ce qui est sans doute **la zone critique de signalisation de la famille PAS, le « noyau EFG »** (Gong et al., 1998).

On ne peut pas exclure que ces réarrangements structuraux soient aussi transmis au travers de l'hélice qui fait la jonction entre le domaine PAS et le domaine kinase au vu de la construction d'un système hybride fonctionnel utilisant un domaine LOV pour réguler la kinase de FixL (cf. C. Transduction du signal, Möglich et al., 2009b).

3. Potentiel RedOx

Nous avons vu comment un domaine PAS pouvait permettre de percevoir directement l'oxygène grâce à l'association d'un cofacteur de type hème. **Il existe d'autres façons de percevoir l'oxygène**, en particulier *via* le potentiel rédox qui diffère considérablement entre des environnements oxygéné ou anaérobie.

La flavine adénine dinucléotide (FAD) est sensible au changement de potentiel rédox. Ainsi, elle est réduite lorsque la concentration en oxygène diminue, par diminution du potentiel oxydant. Ce mécanisme a été utilisé par les domaines PAS qui ont la FAD comme cofacteur, afin d'évaluer le potentiel redox de la cellule et ainsi inférer son état énergétique (Campbell et al., 2011).

a. Aer

Aer est une protéine d'*E. coli* **impliquée dans l'aérotaxie**, la motilité de la bactérie dans un gradient d'oxygène. Ce récepteur fonctionne en association avec les protéines de la chimiotaxie, bien que son **domaine PAS**, module de perception N-terminal, soit **cytoplasmique** contrairement aux domaines de perception périplasmiques des récepteurs de la chimiotaxie. Le reste de la protéine est homologue entre ces systèmes : deux segments transmembranaires séparent le domaine PAS d'un domaine HAMP suivi par un module de contrôle de la kinase CheA (fig. 49, Campbell et al., 2010). **Lorsque la FAD est sous forme réduite, le module est actif et augmente l'autophosphorylation de CheA, ce qui va permettre de moduler l'attitude de nage de la bactérie** (cf. II.B.2.b. Chimiotaxie).

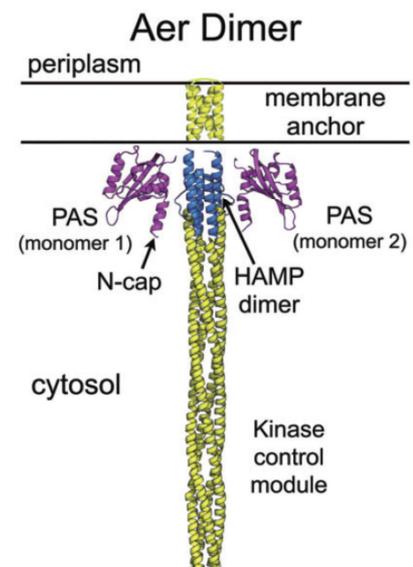


Figure 49 Représentation schématique de la structure d'un dimère de la protéine Aer. Tiré de Campbell et al., 2010.

Bien que la structure du domaine PAS de cette protéine ne soit pas connue, des études par mutagenèse dirigée se basant sur un modèle structural ont permis de montrer que **les résidus**

critiques pour la signalisation sont situés au niveau de la boucle EF (contrairement aux domaines PAS à hème où la boucle FG est importante) ainsi que dans le « PAS-core ». La fixation de la FAD implique plusieurs résidus, situés au niveau des hélices E et F, la boucle les reliant et le brin bêta G. **L'interaction possible entre le domaine PAS et le domaine HAMP** au niveau du feuillet bêta de cette protéine **semble aussi crucial dans l'état de signalisation de la protéine** (Campbell et al., 2010; Repik et al., 2000).

b. NifL

Une protéine impliquée dans la perception de l'état rédox cellulaire a aussi été décrite chez *Azotobacter vinelandii*. Il s'agit de la protéine **NifL qui va réguler l'expression du régulon *nif***, de fixation de l'azote, et ainsi la production d'une nitrogénase sensible à l'oxygène, **par l'intermédiaire de NifA, un facteur sigma**. NifL contient deux domaines PAS, le premier lie la FAD (fig. 50) et permet donc la perception du potentiel rédox, tandis que le second ne posséderait pas de ligand et permettrait la transmission du signal vers le domaine C-terminal d'interaction avec NifA. **En présence d'oxygène, NifA est séquestré par NifL** (Little et al., 2011; Slavny et al., 2010).

Le domaine PAS1 de NifL est le premier domaine PAS cristallisé liant la FAD et sensible au potentiel rédox (fig. 50). La résolution de cette structure a permis de faire un **rapprochement structural et fonctionnel entre ce domaine et les domaines LOV**, montrant un site de fixation du ligand semblable et des zones impliquées dans les réarrangements structuraux permettant une signalisation similaire, bien qu'il n'y ait pas de résidu cystéine impliqué ici (Key et al., 2007). Ces points seront discutés ci-après pour les domaines LOV et ne seront pas abordés ici. De même l'organisation dimérique se fait par l'intermédiaire du feuillet bêta par des zones hydrophobes, caractéristique classique des domaines PAS.

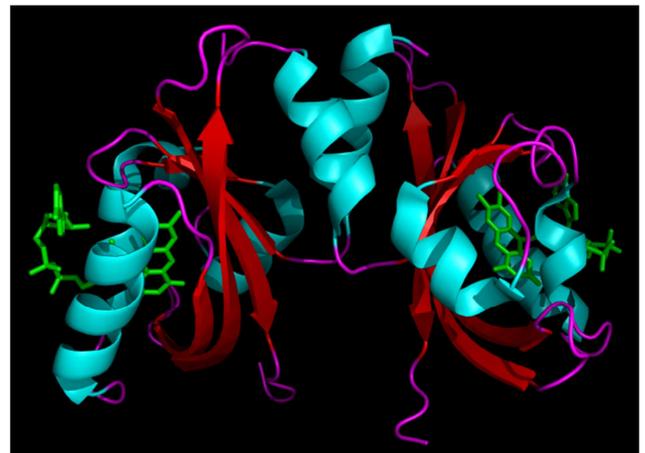


Figure 50 Représentation dimérique du domaine PAS 1 de NifL (code PDB : 2GJ3) lié à la FAD (en vert)

c. ArcB

Une autre façon de percevoir l'état rédox d'une cellule est par l'état rédox de ses quinones. C'est ainsi que fonctionne **le système à deux composants ArcAB** (« Anoxic redox control ») d'*E. coli* grâce à son capteur-kinase ArcB. Cette protéine liée à la membrane par 2 segments transmembranaires, contient un domaine PAS précédé d'un domaine « leucine zipper » et suivi d'un domaine histidine-kinase puis deux domaines de phosphotransfert : un domaine receveur et un domaine Hpt (Alvarez and Georgellis, 2010). En conditions anaérobies le système est actif, ArcA va alors être phosphorylé et permettre l'expression de certains gènes du métabolisme fermentaire et la répression de nombreux gènes du métabolisme respiratoire.

L'état rédox des quinones va être perçu par le domaine PAS d'ArcB. En effet, il possède **deux résidus cystéine sensibles à l'état d'oxydation des quinones**, elles seront réduites lorsque les quinones sont réduites, en conditions anaérobies, permettant l'activité du système. En revanche en présence d'oxygène, il y aura oxydation des quinones et ainsi de ces cystéines qui vont générer des ponts disulfure inter-monomères, inactivant le système (fig. 51, Malpica et al., 2004, 2006).

La formation de ponts disulfure va donc modifier considérablement l'agencement dimérique de la protéine, perturbant le fonctionnement de l'histidine-kinase qui doit avoir une conformation dimérique particulière pour son activité.

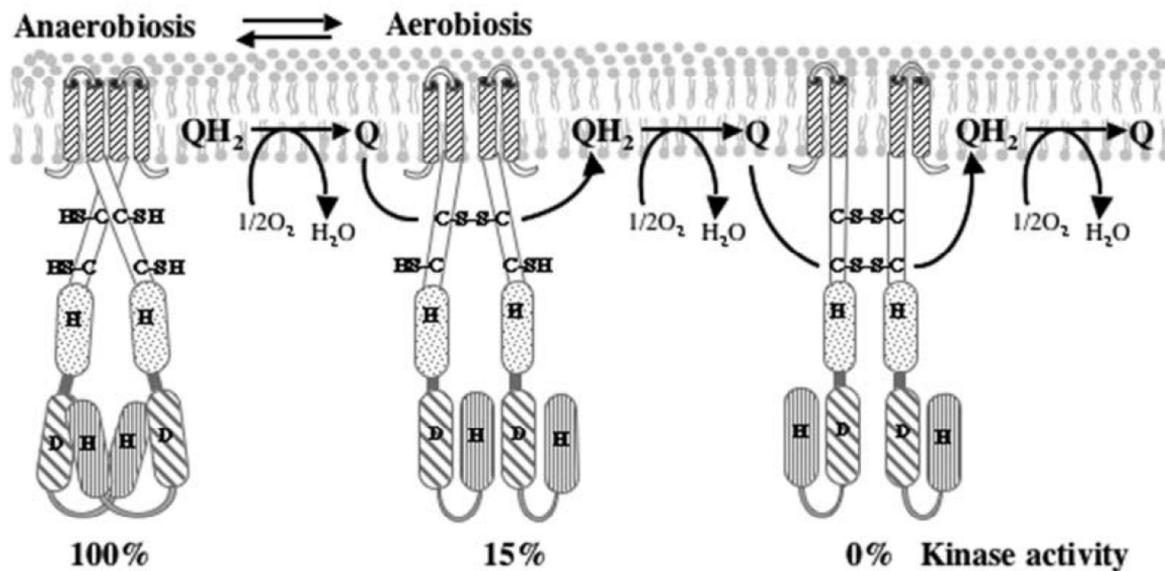


Figure 51 Représentation schématique du fonctionnement d'ArcB. Le domaine PAS n'est pas représenté entre les domaines membranaires et histidine-kinase, mais seulement ses résidus cystéines sensibles à l'état redox des quinones. H D H correspondent aux résidus phosphorylables histidine, aspartate et histidine des domaines kinase, receveur et Hpt respectivement. Tiré de Malpica et al., 2006.

4. Une idée lumineuse

De nombreux organismes sont capables de réguler certaines activités en fonction de la lumière. Les organismes photosynthétiques sont les premiers concernés car la lumière est le facteur environnemental qui a la plus grande influence chez ces organismes, comme *Arabidopsis thaliana* (Ogura, 2008), mais ils ne sont pas les seuls. Il existe différents domaines protéiques capables de percevoir la lumière, mais un chromophore est toujours impliqué. **Les domaines PAS font partie de ces photorécepteurs** et sont particulièrement **employés dans la perception de la lumière bleue** par l'intermédiaire **d'un chromophore de type flavine**, particulièrement la FMN (Flavine Mono Nucléotide) **et sont nommés couramment domaines LOV (Light Oxygen Voltage)**. L'excitation par la lumière bleue va former un adduit entre une cystéine conservée et la flavine (Zoltowski et al., 2009). Un autre type de chromophore est aussi trouvé dans ces domaines, **l'acide paracoumarique** (ou acide hydroxycinnamique). Ici le chromophore est lié de façon covalente au domaine PAS sur sa cystéine conservée (Cusanovich and Meyer, 2003).

On retrouve les domaines LOV dans les différents règnes du vivant (Krauss et al., 2009). Un exemple intéressant d'**une bactérie pathogène dont la virulence serait en partie régulée par un système à deux composants** contenant un domaine LOV a été rapporté. Il s'agit de bactéries du genre *Brucella*, des pathogènes animaux, et l'activation de ce système à deux composants par la **lumière visible augmenterait leur pouvoir infectieux**, permettant la colonisation efficace d'un nouvel hôte (Kennis and Crosson, 2007; Swartz et al., 2007).

a. PYP

La « Photoactive Yellow Protein » (protéine jaune photoactive, PYP) a été découverte chez *Halorhodospira halophila*, une bactérie extrêmophile halophile. **PYP est une petite protéine cytoplasmique constituée d'un domaine PAS** (le prototype structural de la famille, Pellequer et al., 1998) précédé par 2 hélices alpha, que nous nommerons portion N-terminale et qui interagissent avec le feuillet bêta (Kumauchi et al., 2010). Il existe de nombreux homologues de cette protéine dans diverses espèces (Meyer et al., 2012). **Le chromophore est l'acide paracoumarique** (ou acide hydroxycinnamique) qui est **lié de façon covalente à une cystéine située dans l'hélice E α** (résidu 69 de PYP de *H. halophila*, Cusanovich and Meyer, 2003).

L'état de repos, dit état pG, est la forme considérée **inactive dans l'obscurité**. **Le chromophore subit une isomérisation trans-cis après excitation par la lumière bleue** (λ_{\max} 446 nm), son maximum d'excitation va alors changer et être décalé vers le bleu aboutissant à un photoblanchiment. Cette **modification n'est pas permanente** et l'état initial est entièrement recouvert en environ une seconde à l'obscurité (Cusanovich and Meyer, 2003).

L'acide paracoumarique forme des ponts hydrogène avec 2 résidus critiques, une tyrosine (Tyr42) et un acide glutamique (Glu46). Après isomérisation en cis, l'acide glutamique va céder un proton à l'acide paracoumarique induisant un changement conformationnel du domaine PAS transmis à la portion N-terminale qui se dissocie du domaine PAS et se déplie (Kumauchi et al., 2010). Une arginine (Arg52) est particulièrement impliquée dans les modifications structurales apportées après excitation (fig. 52). En effet le déplacement de l'acide paracoumarique après l'excitation relâche les ponts hydrogène qu'il forme avec les résidus tyrosine et glutamate et c'est l'arginine qui sera pontée, les précédentes interactions étant alors assurées par une molécule d'eau (Schotte et al., 2012).

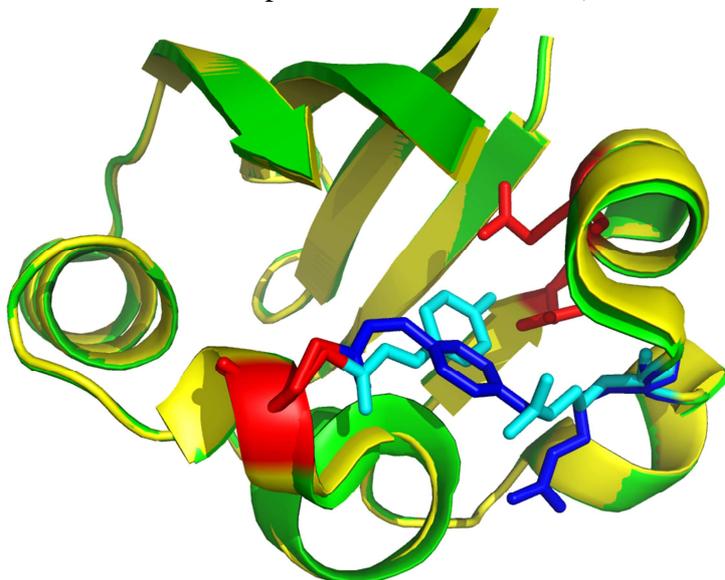


Figure 52 : Alignement structural des formes pB (état actif en présence de lumière en jaune, code PDB : 4BBV) et pG (état inactif, dans l'obscurité, en vert, code PDB : 2ZOH). Le résidu cystéine de liaison covalente de l'acide paracoumarique, ainsi que les résidus tyrosine et glutamine formant un pont hydrogène avec l'acide coumarique dans l'état pG sont représentés en rouge. La position de ces résidus n'est quasiment pas affectée par le changement d'état. L'acide coumarique et le résidu arginine qui sera ponté dans la forme pB sont tous deux représentés en bleu dans la forme pB et en cyan dans la forme pG. La portion N-terminale n'est pas représentée ainsi que la boucle FG par souci de lisibilité.

Cet état de la protéine avec **l'isomère cis du chromophore est l'état actif**, dit état **pB**, qui permet l'interaction du domaine PAS de PYP avec ses partenaires protéiques afin d'accomplir diverses fonctions selon la protéine et l'espèce concernée, par exemple la phototaxie chez *H. halophila* (Meyer et al., 2012).

b. Domaines LOV liant la FMN

Il existe une grande variété de domaines LOV liant la FMN, notamment celui de la protéine YtvA de *B. subtilis* qui régule l'expression du facteur sigma σ^B impliqué dans la réponse générale aux stress et qui est activé par la lumière bleue (Möglich and Moffat, 2007).

On peut aussi citer la protéine Vivid (VVD), qui contient un domaine LOV et régule la production de caroténoïdes ainsi qu'en partie l'horloge circadienne chez des champignons filamenteux (du règne des *Fungi*) du genre *Neurospora* (Zoltowski et al., 2009).

Parfois les domaines LOV se retrouvent en tandem comme chez *Arabidopsis thaliana*, où les phototropines 1 et 2 (Phot1, Phot2) sont des protéines membranaires contenant deux domaines PAS cytoplasmiques chacun capable de lier la FMN. Ceux-ci vont réguler l'activité d'une sérine/thréonine-kinase sous-jacente (Kaiserli et al., 2009).

Ces différentes protéines joueraient leur rôle de signalisation par l'intermédiaire d'interfaces dimériques comme dans le cas de YtvA (Möglich and Moffat, 2007).

1) Liaison de la FMN

La liaison de la FMN se fait par l'intermédiaire de plusieurs résidus (plus d'une dizaine) situés **dans le feuillet β et dans les hélices E α et F α** . Différentes structures de domaines LOV contenant la FMN ont été cristallisés et indiquent que **la nature de ces résidus** (aussi remarqué par alignements de séquences) **et leur géométrie sont très conservées**, et que les interactions sont majoritairement maintenues dans les deux états de la protéine (Möglich and Moffat, 2007). **Le résidu cystéine** permettant la réponse à la lumière bleue par formation d'un adduit covalent (liaison thioéther) entre son groupement sulfhydryle et le carbone 4a de la FMN, **est situé dans l'hélice E α** comme celui permettant la liaison de la FAD. Ceci est illustré par le domaine LOV de YtvA (fig. 53).

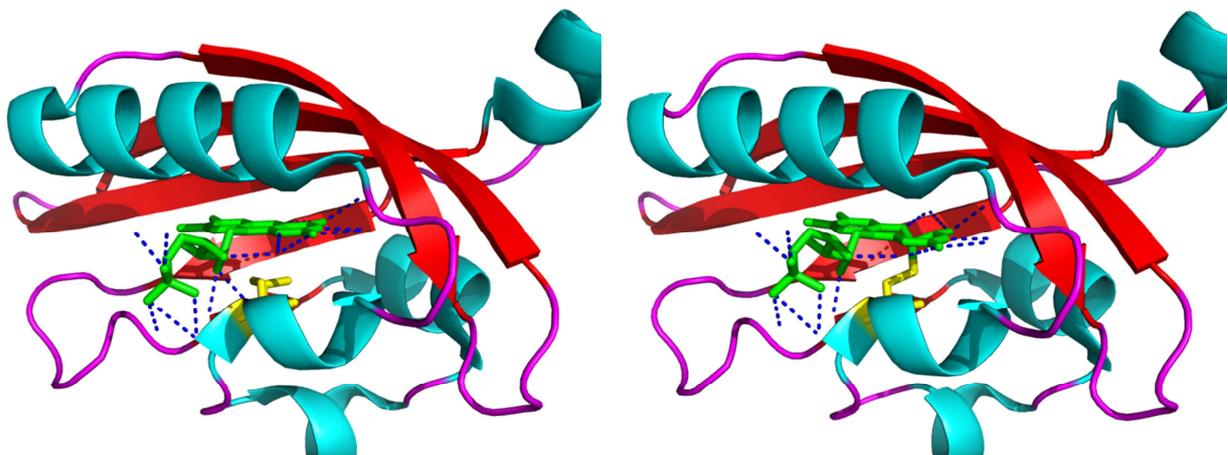


Figure 53 : Représentation des formes « obscurité » (à gauche, code PDB : 2PR5) et « lumière » (à droite, code PDB : 2PR6) du domaine PAS de YtvA. La cystéine formant l'adduit à la lumière est représentée en jaune. Une partie des interactions entre la FMN (en vert) et les résidus de la poche de fixation sont représentées en tirets bleus et sont majoritairement conservées entre les deux formes. Les chaînes latérales de ces résidus ne sont pas figurées par souci d'encombrement.

2) Réponse à la lumière

En réponse à la lumière, un adduit entre la FMN et une cystéine conservée se forme. Nous verrons donc au travers de l'exemple d'YtvA les modifications impliquées par la formation de cet adduit.

Elle induit un léger déplacement de la FMN, mais les résidus permettant sa fixation au sein du domaine LOV ne doivent que très peu se déplacer pour s'accommoder à ce changement de configuration, d'où la possibilité du maintien des interactions (à l'exception d'un résidu glutamine qui formerait une interaction avec un atome différent de la FMN entre les deux états). Ainsi le repliement du domaine LOV n'est pas perturbé.

Les différences structurales entre les deux états se situent majoritairement au niveau de l'interface dimérique. En effet, la région comprenant **les brins G β et H β , l'hélice E α et la boucle EF s'écarte de l'interface du dimère**, induisant aussi un repositionnement des résidus de la face externe du feuillet bêta.

Une hélice alpha (nommée J α) **se trouve en position C-terminale du domaine LOV.** Elle est en contact avec les brins H β et I β , et les modifications de l'interface dimérique apportées par **l'excitation par la lumière se répercutent dans cette hélice, l'écartant de l'interface dimérique. Ce mécanisme permet la transmission de l'information vers le domaine sous-jacent** comme nous le verrons ci-après. Dans le cas de YtvA il s'agit d'un domaine STAS (« Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist, Möglich and Moffat, 2007), mais ce mécanisme serait commun aux domaines LOV, voire à la famille PAS régulant un domaine C-terminal (Möglich et al., 2009b).

La formation de l'adduit entre la FMN et la cystéine conservée est réversible. Ainsi, les domaines liant la FMN sont séparés en deux grandes catégories selon la vitesse de dégradation de l'adduit formé après excitation par la lumière. La première classe correspond aux domaines dont l'adduit est peu stable (comme les domaines LOV1 des phototropines) alors que la seconde correspond à ceux dont l'adduit est stable (de l'ordre supérieur à la seconde, comme les domaines LOV2 des phototropines et ceux de YtvA ou Vivid par exemple). Les particularités induisant cette différence cinétique restent mal comprises, mais influent sur la fonctionnalité des protéines les contenant, reflétant une importance biologique (Zoltowski et al., 2009).

C. Transduction du signal

Il existe une grande variété de domaines associés aux domaines PAS, et l'on peut imaginer que les mécanismes de régulation dans des systèmes de transduction de signal sont comparables. **Nous nous intéresserons ici particulièrement aux domaines Histidine-kinase (HK) dont l'activité est régulée par un domaine PAS qui leur est immédiatement N-terminal**, comme dans BvgS.

Dans ces systèmes, les domaines PAS peuvent être dans une protéine soluble en position **N-terminale ou précédés par d'autres domaines de type PAS** ou GAF par exemple. Ils peuvent aussi faire partie d'une protéine transmembranaire. Dans ce cas **ils peuvent être précédés d'un segment transmembranaire**, vraisemblablement replié en hélice alpha qui se prolongerait dans le cytoplasme jusqu'au domaine PAS. Ils peuvent ici aussi être précédés d'autres domaines de type PAS ou GAF, mais des hélices alpha sont régulièrement prédites comme précédant le domaine PAS (Möglich et al., 2009a). **Ces hélices forment un enroulement d'hélices (coiled-coil) et précèdent le domaine PAS** comme dans le cas de ArcB, où on retrouve un domaine « leucine zipper » (glissière à leucine, Alvarez and Georgellis, 2010). Des domaines « coiled-coil » sont généralement prédits en amont des domaines PAS dans les systèmes membranaires avec plus ou moins de confiance et **permettraient l'intégration de signaux provenant de la partie N-terminale de la protéine**.

Les domaines PAS sont généralement suivis d'hélices alpha (souvent nommées **Ja**, Möglich et al., 2009b) qui, dans notre cas d'intérêt, **se prolongent dans le domaine DHp** (Dimérisation et Histidine phospho-transfert) du domaine Histidine-Kinase sous-jacent. Elles sont aussi prédites comme un **domaine « coiled-coil »** (enroulement d'hélices). Le terme de « Signaling Helix » (hélice de signalisation) a été proposé pour cette jonction entre les domaines PAS et les domaines HK. Elle ne serait pas limitée à la jonction entre ces domaines mais permettrait, entre autres, la liaison entre deux domaines PAS (via l'hélice **Ja**, bien que les périodicités soient parfois différentes, voir ci-dessous, Möglich et al., 2009a) ou avec d'autres types de domaines à activité enzymatique comme les domaines GGDEF. Ainsi les différents domaines de la protéine s'organiseraient le long d'une colonne centrale d'hélices alpha (Anantharaman et al., 2006; Möglich et al., 2009a, 2010).

1. Enroulements d'hélices

Nous allons donc voir tout d'abord comment se définissent les **domaines « coiled-coil »**. Ils **sont très répandus dans la nature et permettraient de nombreuses fonctions distinctes**. Une de ces fonctions serait donc la transmission de signaux perçus en amont vers un domaine histidine-kinase (Möglich et al., 2009b).

Ces domaines ont été définis sur la base des interactions entre 2 hélices alpha décrivant des domaines nommés « **leucine zipper** » et retrouvés dans de nombreuses protéines. Il s'agit de **motifs structuraux particuliers constitués de répétitions de 7 résidus** (environ 2 tours d'hélice) suivant un ordre particulier nommées heptades, couramment représentées par les lettres « abcdefg ». **Ils permettent une interaction dimérique entre les hélices** *via* les résidus « a » et « d » de l'heptade (fig. 54), généralement hydrophobes, sur le modèle « a-a' d-

d' » mais des interactions a-d' peuvent aussi influencer sur la stabilité du coiled-coil (Grigoryan and Keating, 2008). Des altérations de la périodicité de 7 résidus interviennent aussi dans cette stabilité, dénommées « stutters » et « stammers » et correspondent à des délétions de 3 résidus (abc) ou 4 résidus (defg) respectivement. Des répétitions de 11 ou 15 résidus ont aussi été décrites qui permettent une organisation en coiled-coil (Parry et al., 2008).

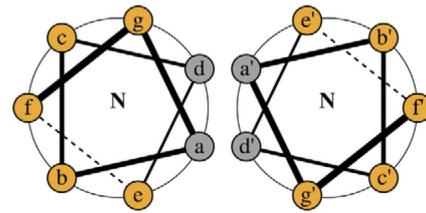


Figure 54 : Représentation schématique de l'interaction classique entre les résidus d'un coiled-coil dimérique. L'épaisseur du trait reliant les résidus diminue avec la profondeur. Tiré de Grigoryan and Keating, 2008.

Ces domaines coiled-coil permettraient une transmission mécanique en agissant comme des bâtonnets rigides (Möglich et al., 2009b). Nous nous intéressons au modèle dimérique au vu du fonctionnement dimérique des histidine-kinases mais il existe des organisations multimériques d'ordre supérieur, possiblement jusqu'à un hexamère. Des agencements entre différentes organisations peuvent être étendus de façon périphérique et des organisations contenant jusqu'à 12 hélices ont été recensées (Moutevelis and Woolfson, 2009).

Les domaines DHP des histidine-kinases fonctionneraient aussi sur ce modèle (Anantharaman et al., 2006). La liaison avec une hélice comme l'hélice J α d'un domaine PAS au travers de ce type d'enroulement d'hélices semble donc naturelle afin d'influer sur l'activité du domaine kinase en fonction des signaux présents.

2. Transduction entre deux domaines senseurs

Un domaine coiled-coil peut donc se situer entre 2 domaines senseurs, particulièrement entre deux domaines PAS. Les mécanismes d'intégration du signal provenant du domaine amont sont encore mal connus. Il semble évident qu'elle se fasse au travers des hélices J α en suivant les règles de périodicité des domaines coiled-coil possiblement en incluant des altérations comme les stutters et stammers (fig. 55, Möglich et al., 2010).

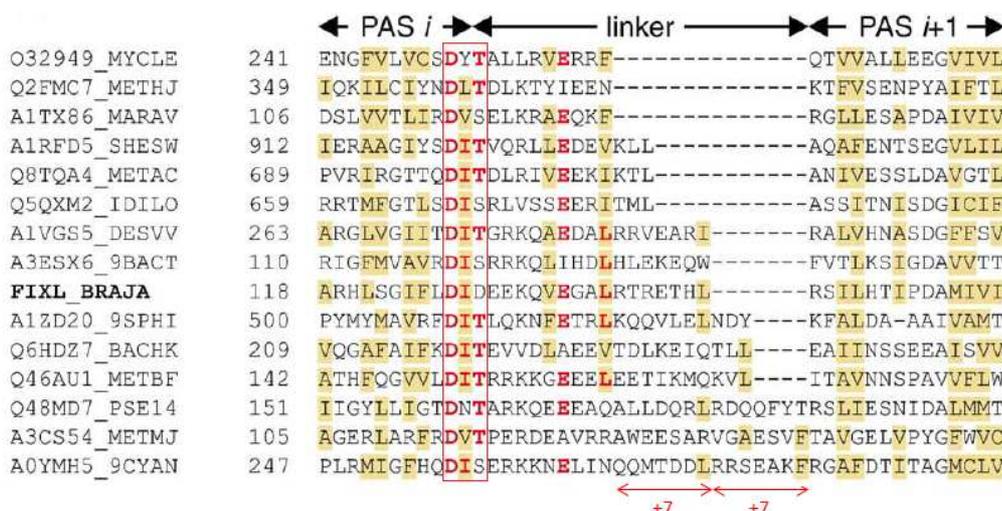


Figure 55 : Exemple d'un alignement de protéines contenant plusieurs domaines PAS. Le motif DIT de fin du premier domaine est encadré en rouge. Les différences de taille entre les linkers de la valeur d'une heptade sont représentées par les flèches rouges. Adapté de Möglich et al., 2010.

Il a été démontré que le coiled-coil formé par l'hélice $J\alpha$ (particulièrement ses résidus hydrophobes) a un rôle important dans l'état de signalisation du domaine PAS en aval et donc certainement dans l'intégration du signal provenant du domaine amont (Diensthuber et al., 2013). Différentes expériences d'échanges de domaines au sein d'une même protéine ont permis de montrer que leur positionnement influe sur leur capacité de signalisation (Kaiserli et al., 2009; Möglich et al., 2010).

3. Transduction du signal vers la kinase

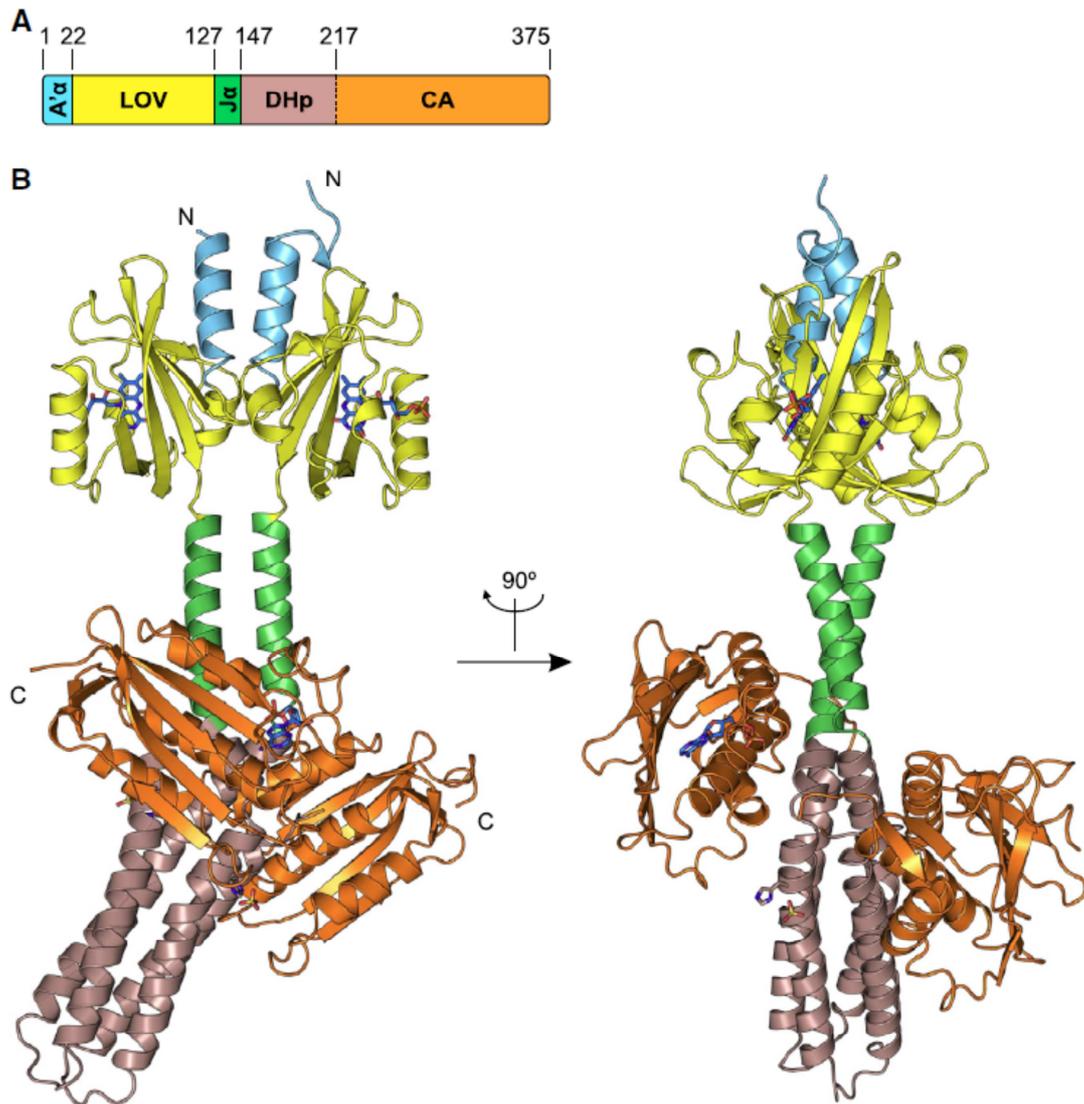
Nous avons donc vu **qu'en présence d'un signal spécifique, les domaines PAS subissent un réarrangement structural**. Dans un modèle dimérique où ils sont suivis d'hélices, dites $J\alpha$, ces dernières **sont déplacées** par les modifications structurales du domaine PAS (Diensthuber et al., 2013; Möglich and Moffat, 2007). **Ces mécanismes permettant la régulation de domaine sous-jacent** semblent commun à la famille des domaines PAS et **ont permis la création de systèmes hybrides, artificiels, régulés par un domaine PAS**.

Par exemple, un domaine LOV d'une protéine de plante a été couplé à un facteur de transcription d'*E. coli* et montre une liaison spécifique à l'ADN en présence de lumière (Strickland et al., 2008). Cet exemple frappant illustre bien la modularité et la conservation des domaines PAS entre les différents règnes du vivant et un modèle de régulation par allostérie commun à un grand nombre de protéines et de processus. D'autres exemples de régulation d'un domaine enzymatique par la lumière grâce à un domaine LOV sont disponibles, notamment celui d'une activité dihydrofolate réductase (DHFR, Lee et al., 2008).

Un de ces modèles hybrides va particulièrement nous intéresser, il s'agit **d'un couplage entre le domaine histidine kinase de la protéine FixL de *B. japonicum* et le domaine LOV de la protéine YtvA de *B. subtilis***. En effet, cette protéine a permis de prouver le fonctionnement de la transmission de signal entre un domaine PAS et une histidine-kinase au travers d'un domaine de type coiled-coil. La protéine de fusion résultante, nommée YF1, correspond à la fusion du domaine PAS de YtvA sur l'hélice $J\alpha$ précédant la kinase de FixL après le résidu T du motif DIT conservé, marquant la fin du domaine PAS. Cette protéine **possède les propriétés d'inactivation de la kinase de FixL mais en présence de lumière et non plus d'oxygène**. Par ailleurs l'ajout de 7 résidus (une heptade) dans l'hélice $J\alpha$ semble influencer sur l'activité nette de la kinase, reflétant peut-être un mécanisme d'atténuation lors de l'allongement du domaine coiled-coil de l'hélice $J\alpha$. Ceci peut aussi être lié au fait qu'une heptade ne correspond pas tout à fait à deux tours d'hélices (Möglich et al., 2009b).

La structure complète de cette protéine de fusion a été très récemment obtenue par cristallographie dans son état normalement actif, dans l'obscurité (fig. 56, Diensthuber et al., 2013). Sur cette base, les auteurs proposent un **mécanisme de transmission du signal entre le domaine PAS et le domaine histidine-kinase au travers de mouvements de torsion / rotation** (et donc compatible avec la régulation de l'activité kinase par des mouvements de rotations des hélices du domaine DHp décrit en II.B.1.b., fig. 14). Ces mouvements seraient enclenchés par la perception d'un signal par le domaine PAS, subissant alors **un réarrangement structural** qui serait **initié dans la zone critique de signalisation, le « noyau EFG »** (Gong et al., 1998) **et répercuté au niveau C-terminal** du domaine comme

une **modification de la position relative des hélices J α** (fig. 57). Ainsi, le **signal serait transmis au domaine DHp par les domaines coiled-coil joignant ces domaines**. En effet, aucun contact direct n'existe entre le domaine PAS et le domaine catalytique, excluant une régulation par des interfaces entre ces domaines. Ce serait donc le **mouvement du domaine DHp qui induirait un réarrangement structural, modulant son interaction avec le domaine catalytique et l'accessibilité de l'histidine phosphorylable** et donc l'activité kinase.



Ce réarrangement structural pourrait entraîner la **déstructuration partielle de la fin de l'hélice $\alpha 2$ du domaine DHp**, juste en amont du domaine catalytique (phénomène observé dans un des monomères d'YF1). Ici, la **mobilité du domaine catalytique serait accrue et permettrait l'interaction entre le site actif et l'histidine phosphorylable**, et ainsi la **réaction de phosphorylation**. Les mécanismes de modulation de l'interaction entre domaine catalytique et domaine DHp et le mécanisme de déstructuration influant sur la mobilité du

domaine catalytique ne sont pas exclusifs et la transduction du signal pourrait faire intervenir chacun d'eux (Diensthuber et al., 2013).

Le capteur-kinase VicK, impliqué dans la régulation de la virulence et dans la survie de *Streptococcus mutans*, une coccobactérie à Gram positif responsable de la carie dentaire, a aussi été cristallisé avec ses domaines PAS et HAMP (code PDB : 4I5S). L'agencement des domaines le long d'une colonne vertébrale en hélices alpha y est retrouvé et donc les mécanismes de régulation décrits ci-dessus peuvent être conservés (Wang et al., 2013).

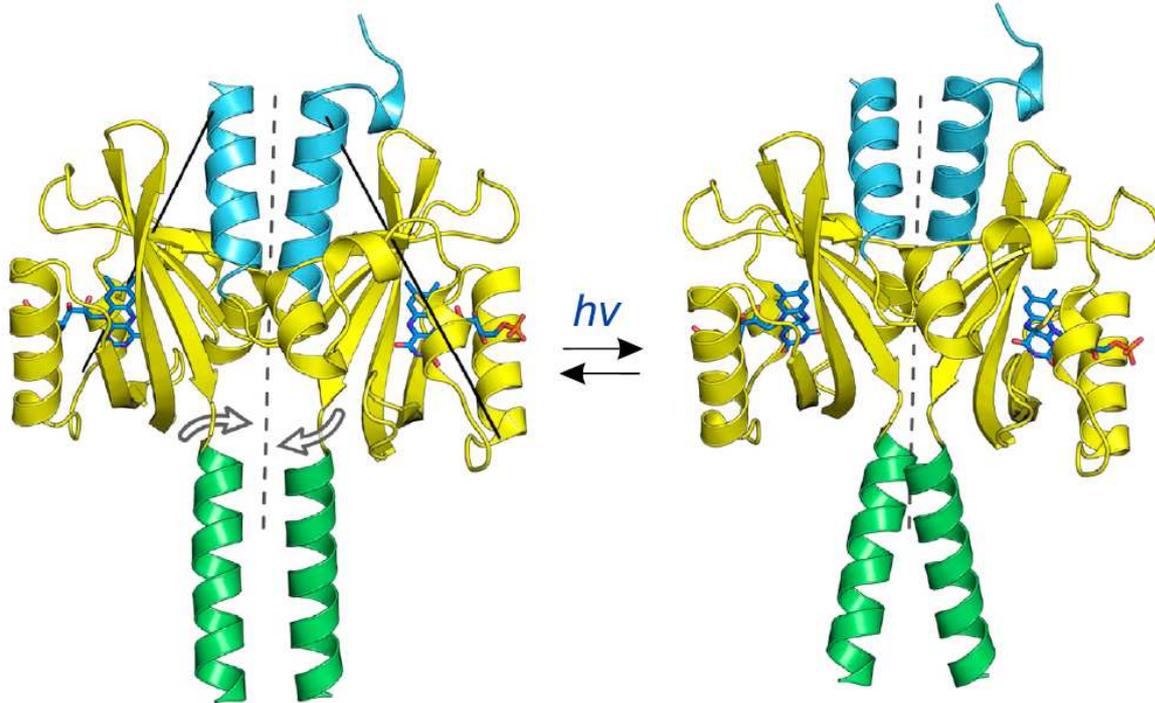


Figure 57 Représentation schématique du réarrangement structural des hélices J α entre les états à l'obscurité (à gauche, code PDB : 4GCZ) et à la lumière (à droite, modèle obtenu par homologie). Le code couleur est le même que celui de la figure 13 et les tirets représentent l'axe de symétrie du dimère. Tiré de Diensthuber et al., 2013

D'autres types de mouvements sont susceptibles de réguler une activité kinase, et ainsi des mouvements de piston et de cisaillement ont aussi été décrits. Le **mécanisme de piston** a été décrit dans la kinase de NarX par exemple et serait partagé avec Tar, un récepteur de la chimiotaxie, ou encore TorS, un autre capteur-kinase. Ce type de signal serait transmis au travers de la membrane et relayé par un domaine HAMP dans les cas décrits et aurait l'avantage d'être moins sujet à l'atténuation qu'un signal de type rotation (Falke and Erbse, 2009). Un **mécanisme de cisaillement** induit par la fixation de ligand au niveau de domaines périplasmiques a été décrit dans un capteur-kinase de *B. thetaiotaomicron*. Les domaines DHp seraient alors en tout ou partie séparés empêchant toute phosphorylation (Lowe et al., 2012). Bien que ces protéines ne comportent pas de domaine PAS, ces types de mouvements sont les seuls, hormis la rotation, décrits comme susceptibles de moduler une activité kinase.

VI. Objectifs de la thèse

BvgS est un capteur-kinase hybride, prototype d'une grande famille de système à deux composants possédant des domaines VFT périplasmiques. BvgS contient aussi un domaine PAS qui ne semble pas présent dans tous les membres de cette famille, créant possiblement une distinction entre des sous-familles de ce type de capteurs-kinases. Cependant, et bien que la présence de ces trois domaines senseurs putatifs soit reconnue depuis plusieurs années, très peu d'informations structurales et mécanistiques sont disponibles.

Notamment, le système BvgAS semble actif dans des conditions normales de culture, alors qu'aucun ligand activateur du système n'est connu. Il existe différentes molécules capables d'induire un état d'avirulence chez les *Bordetellae*, particulièrement du complexe *bronchiseptica*. A nouveau, aucune information n'est disponible sur le site d'action de ces molécules, ni sur les mécanismes permettant leur perception. La seule hypothèse formulée est celle d'une interaction des modulateurs de la famille du nicotinate avec les domaines périplasmiques.

Par ailleurs, la fonction du domaine histidine-kinase nécessite une interaction dimérique, des domaines DHp particulièrement, pour maintenir l'activité et aussi permettre sa régulation. Or, il n'existe pas de description de l'état oligomérique de BvgS au niveau de ses domaines senseurs. Cependant, les domaines VFT et PAS sont reconnus comme possédant une faculté de dimérisation dans divers systèmes indépendants.

Ainsi, nous proposons d'étudier les caractéristiques des différents domaines senseurs afin de déterminer les mécanismes de perception et de transduction des signaux qui pourraient être intégrés au niveau de ces domaines. Pour ce faire, nous allons étudier ces trois domaines senseurs dans l'ordre de l'organisation de BvgS de ses portions N- vers C-terminales afin de répondre à certaines questions.

Les domaines VFT sont connus pour leur capacité de fixation spécifique d'un ligand dans leur cavité induisant un mouvement de fermeture entre leurs deux lobes. **Quelles sont les molécules perçues par les domaines VFT de BvgS ? Comment se définit l'état actif de la protéine face aux conformations de ces domaines ?** Une famille de systèmes bien étudiés comportant deux domaines VFT en tandem, les iGluR, a démontré une organisation dimérique (et même tétramérique) de ces canaux ioniques. Cet agencement est permis, entre autres, par des interactions dimériques entre les domaines VFT1 et entre les domaines VFT2. Ces interfaces entre domaines sont très importantes dans la régulation du système. **Les VFT 1 et 2 sont-ils en interaction au sein d'un dimère supposé de BvgS ? Si tel est le cas, quelle est l'importance des interactions dimériques entre ces domaines VFT pour la perception et la transduction du signal ?**

Les domaines PAS cytoplasmiques sont très souvent capables de fixer une molécule ou un cofacteur pour la perception d'un signal particulier, bien qu'un ligand ne soit pas décrit pour tous les domaines PAS étudiés. Dans de très nombreux cas, particulièrement lors de l'association de ces domaines à un capteur-kinase, la capacité de dimérisation des domaines PAS est un point crucial dans la régulation du système associé. **Le domaine PAS de BvgS**

est-il capable de fixer un ligand ? De quelle nature ? Comment s'organise le domaine PAS de BvgS ? Ce domaine est par ailleurs le dernier domaine senseur avant le domaine histidine-kinase. Il doit donc être capable d'intégrer les signaux provenant des domaines en amont pour les transmettre à l'histidine-kinase. Il pourrait percevoir un signal propre qui permettrait de contrebalancer les signaux amont comme point de contrôle ultime de l'activité de la kinase sous-jacente. **Comment les signaux amont peuvent-ils être intégrés par le domaine PAS ? Comment sont-ils retransmis vers le domaine histidine-kinase ?**

Enfin, BvgS est sensible à la température. La zone de perception de ce facteur reste inconnue et ainsi nous nous sommes intéressés à la perception de ce facteur et sa capacité de modulation de la virulence de la bactérie.

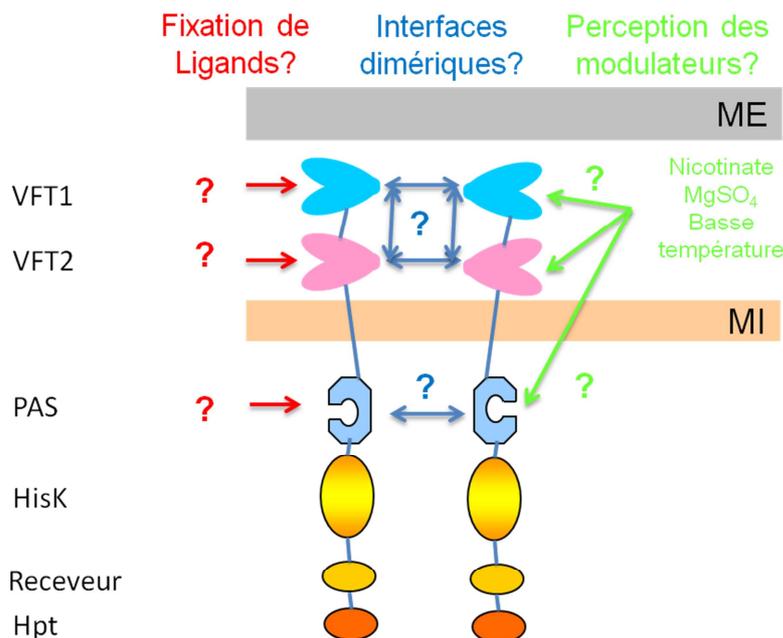


Figure 58 Représentation schématique de BvgS et sa composition en domaine. Le nom de chaque domaine est noté en noir sur la gauche, HisK représente le domaine histidine-kinase. La membrane externe (ME) est figurée ainsi que la membrane interne (MI). Les points d'interrogation rouges représentent des ligands putatifs. Les points d'interrogation et doubles flèches bleues indiquent des interactions possibles. En vert, les zones possibles de perception des modulateurs.

Pour répondre à ces diverses questions, nous avons mené des études *in vitro* sur les domaines de perception de BvgS isolés sous forme de protéines recombinantes. La résolution de la structure de ces différents domaines permettrait d'identifier des caractéristiques particulières qui pourraient être nécessaires à la fonction du système. Ces protéines recombinantes ont aussi été utilisées dans diverses techniques, particulièrement des expériences de Thermal Shift Assay, afin d'identifier un ligand putatif.

Nous nous sommes aussi basés sur des connaissances acquises sur d'autres systèmes, et par homologie nous avons cherché à vérifier si ces mécanismes peuvent s'appliquer à BvgS. Nous avons donc aussi entrepris des travaux *in bacterio*, en substituant des résidus possiblement impliqués dans les mécanismes de perception et/ou de transduction dans la protéine BvgS complète afin de vérifier le phénotype de mutants de ces résidus. Ceci est possible par suivi d'une activité enzymatique reflétant l'activité d'un promoteur d'un gène de la virulence, particulièrement d'un gène *vag* tardif, la toxine pertussique ou d'un gène *vag* précoce, la FHA.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

VII. Études des domaines VFT de BvgS

Lors de mon arrivée au laboratoire, une étude de la portion périplasmique de BvgS avait été entamée. En effet, bien que la présence de domaines VFT au sein de BvgS soit reconnue depuis plusieurs années, les informations disponibles sur ces domaines senseurs sont très limitées voire inexistantes, comme nous avons pu le voir précédemment. De nombreux domaines VFT, particulièrement de transport, ont pu être cristallisés et leur structure déterminée, ce qui n'était pas le cas de ceux de BvgS. Par ailleurs, la cavité de la majorité des différents domaines VFT connus présentent des caractéristiques nécessaires à la liaison de leur ligand, et ainsi les domaines VFT 1 et 2 de BvgS devraient aussi pouvoir fixer un ligand au vu de la très forte conservation de leurs cavités au sein du complexe génétique « *bronchiseptica* » (Herrou et al., 2009). Nous avons donc cherché à caractériser les domaines VFT de BvgS, quant à leur potentielle liaison d'un ligand et leur structure. J'ai ainsi pu participer aux travaux de caractérisation de ces domaines.

A. Etudes des cavités et des résidus conservés

Malgré l'absence de ligands activateurs connus mais seulement de modulateurs négatifs, l'homologie des domaines VFT de BvgS avec des VFT classiques de transport nous a laissé supposer qu'ils seraient capables de fixer un ligand particulier qui modulerait l'activité de BvgS. En effet, qu'il s'agisse d'un ligand activateur ou inhibiteur, il est possible que son action se fasse au travers de sa fixation dans la cavité des domaines VFT, comme dans le cas des iGluR, où des ligands activateurs et inhibiteurs se fixent dans l'un ou l'autre des domaines VFT pour jouer leur rôle. De plus, la cavité des domaines VFT de BvgS est très conservée au sein du complexe *bronchiseptica*, laissant supposer qu'elles ont une réelle importance fonctionnelle et doivent être maintenues pour l'activité du système (Herrou et al., 2009). Nous nous sommes donc intéressés premièrement à la caractérisation de ces domaines quant à leurs cavités et la potentielle fixation de ligands, ainsi qu'à la détermination de leur structure particulièrement celle de VFT2. En effet, la protéine recombinante VFT1 s'est avérée beaucoup moins stable et donc plus difficile à travailler.

1. VFT2, un domaine atypique

Ces travaux ont été valorisés par la publication d'un article dans le journal PNAS présenté ci-après (Herrou et al., 2010) dans lequel je suis second auteur co-équivalent avec les Drs. Coralie Bompard et René Wintjens.

- a. Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism.

b. Résumé

NB : les figures et tableaux mentionnés correspondent à celles de l'article ci-dessus.

Dans ce travail, des protéines recombinantes correspondant à chacun des domaines VFT1 et VFT2 ont été produites afin de déterminer leur capacité de fixation de ligands en utilisant la technique du Thermal Shift Assay (TSA) et j'ai pu participer au criblage des molécules par cette technique. Selon ce test, qui consiste à mesurer la température de dénaturation thermique d'une protéine seule ou en présence d'un ligand potentiel, la protéine recombinante VFT2 semble beaucoup plus stable que celle de VFT1 qui a été plus difficile à travailler. Cette technique n'a pas permis la mise en évidence d'un ligand potentiel pour VFT1. Au contraire, VFT2 s'est avéré être stabilisé par des molécules comme le nicotinate et des analogues de cette molécule, possédant un cycle aromatique et un groupement carboxylate, à des concentrations millimolaires relativement élevées de ces composés (Table 1). Ces composés ont tous été décrits comme modulateurs de la virulence chez *B. pertussis*. Ainsi, **il semblerait que le VFT2 soit le site de fixation des modulateurs négatifs de la virulence** de ce type. En revanche, le sulfate de magnésium n'a pas eu d'effet stabilisateur sur VFT2. Ceci n'exclut cependant pas qu'il puisse se fixer à VFT2 sans le stabiliser de façon détectable dans les conditions testées. Ceci serait d'ailleurs suggéré par la réponse de BvgS_{F317A} aux deux types de modulateurs (voir ci-dessous).

La protéine recombinante VFT2 a pu être cristallisée et sa structure a été résolue. Ceci a révélé un repliement classique de VFT de type 2, avec 2 lobes séparés par une charnière de deux brins bêta délimitant une cavité. Au sein de cette cavité, deux molécules d'acétate et une molécule de glycérol, venant certainement du milieu de cristallisation, sont piégées. Cependant, ces molécules interagissent avec un seul lobe à la fois et majoritairement par l'intermédiaire de molécules d'eau. Ainsi, il semblerait que ces ligands soient fortuits et non spécifiques. Ainsi, de façon intéressante, **le domaine VFT2 a cristallisé sous forme fermée en absence d'un ligand** véritable qui stabiliserait cette forme par des interactions avec les deux lobes (Fig. 1). **Ceci s'écarte du paradigme de fonctionnement de ces domaines** avec une forme ouverte non ligandée et une forme fermée ligandée.

Grâce à la résolution de cette structure, nous avons pu nous intéresser à la cavité de ce domaine. Cette cavité possède un potentiel électrostatique fortement positif (Fig. S3), ce qui est assez inhabituel dans la famille des VFT. Une substitution simultanée de deux résidus de cette cavité en résidus glutamate (chargés négativement) dans BvgS a donc été entreprise afin de dissiper ce potentiel électrostatique (F₃₇₅E + Q₄₆₁E). Le mutant de BvgS ainsi obtenu chez *B. pertussis* était incapable de répondre à la modulation négative (Fig. 2). Ces substitutions ont alors été introduites dans la protéine recombinante. J'ai donc pu participer à sa production puis aux expériences menées avec cette protéine. La capacité de fixation des modulateurs négatifs a été testée par TSA et a montré l'incapacité de cette protéine recombinante à être stabilisée par ces modulateurs. En revanche, cette protéine est plus stable que la protéine sauvage dans la condition de référence, sans doute grâce à des ponts hydrogène supplémentaires créés entre les deux lobes. **Le potentiel de la cavité est donc important pour la perception de ces modulateurs.** En effet, il y a une certaine complémentarité entre le

potentiel électrostatique positif de cette cavité et le groupement carboxylate des modulateurs, qui doit être chargé négativement en conditions normales. Le domaine VFT2 recombinant ainsi substitué a aussi pu être cristallisé. La résolution de sa structure a à nouveau montré un domaine fermé sans ligand spécifique dans sa cavité, mais seulement des petites molécules provenant de la liqueur de cristallisation (Fig. S4).

L'importance d'un autre résidu de la cavité a aussi pu être démontrée. En effet, la substitution du résidu F₃₁₇ en une alanine génère un mutant de BvgS hypersensible à la modulation et dont l'activité basale, en absence de modulateur, est d'environ 50% celle du sauvage. Cette substitution a aussi été réintroduite dans la protéine recombinante et ainsi j'ai participé aux différentes expériences menées avec cette construction. Les expériences de TSA ont suggéré une diminution de la stabilité de cette protéine par rapport au VFT2 sauvage dans les conditions normales. Cependant, la stabilisation par les modulateurs négatifs (nicotinate et apparentés) s'est avérée bien plus efficace sur cette protéine. Un mutant généré par substitution par une alanine d'un résidu très proche, F₃₂₀, s'est avéré avirulent, et la protéine recombinante associée est fortement déstabilisée et partiellement restabilisée par ajout des modulateurs en TSA. **Ceci indique une grande importance de cette région de la protéine, caractérisée par un « β turn », dans la fixation des modulateurs et l'activité de BvgS.**

Nous avons alors tenté de cristalliser la protéine VFT2_{F317A} en présence de modulateurs négatifs stabilisant fortement la protéine. Malheureusement, aucune des conditions de cristallisation testées n'a permis d'obtenir des cristaux, ne nous permettant pas de définir le site de fixation de ces modulateurs.

2. Résultats complémentaires

Bien que nous ayons pu obtenir la structure du domaine VFT2 et démontrer sa capacité d'interaction avec les modulateurs négatifs de la virulence de type nicotinate, le rôle et la structure du VFT1 restaient mystérieux. Ainsi, différentes expériences de perturbation de la cavité de ce domaine ont été conduites par Julien Herrou afin de comprendre son importance. Les substitutions de certains résidus de cavité de ce domaine ont généré des mutants de BvgS ayant des phénotypes distincts de la protéine sauvage, comme une incapacité de réponse aux modulateurs ou une perte totale d'activité, indiquant une certaine importance de la cavité du VFT1 bien que difficilement explicable (données non publiées, thèse de doctorat de J. Herrou).

Ces données ne seront pas reprises en détail ici, mais certaines substitutions de la cavité du domaine VFT1 seront réutilisées dans des expériences ultérieures et les phénotypes induits par les mutations seront alors rappelés. Les expériences menées dans l'article ci-dessus l'ont été sur la souche de *B. pertussis* TohamaI, dont la sensibilité aux modulateurs est moindre comparée à la majorité des souches du complexe *bronchiseptica*. Les expériences suivantes ont été faites dans la même souche à l'exception d'une substitution dans BvgS, au niveau du résidu 705, où la lysine est remplacée par un acide glutamique, conférant une sensibilité accrue aux modulateurs comme décrit précédemment (cf. III.A.2.).

a. Conservation de résidus dans la famille de VFT.

L'importance de la cavité des domaines VFT de BvgS a pu être démontrée sans toutefois permettre une association claire entre les différents phénotypes observés et la fixation d'un ligand, particulièrement au niveau du VFT1. La cavité du VFT2 semble importante pour la fixation de modulateurs négatifs de type nicotinate, mais les modalités de fixation et le site de liaison n'ont pas pu être définis. Les concentrations millimolaires de ces modulateurs nécessaires au passage en phase Bvg⁻, en contraste avec les affinités des domaines VFT de transport pour leurs ligands respectifs rapportées dans la littérature, indiquent que les modulateurs utilisés en laboratoire ne seraient probablement pas les ligands naturellement perçus.

Nous nous sommes alors intéressés à la conservation de résidus au sein de la famille des domaines VFT de type 2 de diverses origines, impliqués dans le transport et particulièrement dans la signalisation. Les résidus les plus conservés sont une glycine et une proline (fig. 59) qui dans le cas de VFT2 de BvgS est en conformation cis au niveau du bêta hairpin présent dans le premier lobe des domaines VFT. Cependant, ces résidus particulièrement conservés doivent avoir une grande

importance structurale pour la protéine. Par exemple, dans la famille des thiorédoxines, un résidu cis-proline a été démontré essentiel pour le repliement correct de la protéine et sa fonction (Charbonnier et al., 1999). Ainsi, ces résidus n'ont pas été ciblés par mutagenèse, le résultat attendu étant une perte totale de fonction de BvgS par mauvais repliement.

VFT2 BP1877	VLN- LFAP- F	TLFRTDEQFG	GI SAAVLQLL
VFT2 PP2100	ADD- AAAP- L	SYFDDSGHFR	GITADLLELI
VFT1 BP1877	VYAPDI PP- F	DVTYG- ERYE	GLTADYMAII
VFT1 PP2100	T SAPDYPP- F	DITGGGNDYQ	GLTAEYANLI
VFT2 AP_002970	ENP- YSPP- Y	SMTDENGSVR	GVMGDI LNII
VFT1 AP_002970	VHKSQTAT- L	LHTDSQQRVR	GINADYLNLL
VFT1 TM1040_1030	VPWTEAPP- M	MMSDAEGQPS	GFTVELAQML
VFT2 VDA_001728	AFSYTLPGNL	VPFSALNTNK	GFTHDLLSLI

Figure 59 Alignement entre les VFT 1 et 2 de BvgS de *B. pertussis* Tohamal (BP1877), les VFT 1 et 2 d'EvgS d'*E. coli* K12 (AP_002970), les VFT 1 et 2 d'un capteur-kinase de *Pseudomonas putida* KT2440 (PP2100), et d'un VFT de capteurs-kinases de *Ruegeria sp.* TM1040 (TM1040_1030) et de capteur-kinases de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CIP 102761 (VDA_001728). Les résidus proline (P₇₆ et P₃₁₉ des VFT 1 et 2 de BvgS) et glycine (G₈₇ et G₃₃₁ des VFT 1 et 2 de BvgS) conservés sont indiqués par des flèches rouges.

Ce sont des résidus tryptophane qui ont retenu notre attention. En effet, on retrouve très fréquemment ce type de résidus au niveau des hélices N- et C-terminales des domaines VFT. Bien qu'ils ne soient pas conservés à 100%, les autres résidus retrouvés en leur lieu et place sont aussi assez souvent des acides aminés aromatiques (fig. 60). Ainsi, six résidus tryptophane ont été identifiés dans ces zones dans BvgS. Les résidus W₅₆ et W₅₈ ont été substitués ensemble en alanine et les résidus W₂₈₀, W₃₀₂, W₅₂₅ et W₅₃₅ ont été substitués séparément en alanine. Les résidus W₅₈, W₂₈₀, W₃₀₂ et W₅₂₅ semblent être les plus conservés.

VFT2 BP1877	PAYSAREQQW	---	LASII SRWRG	SDGDPRTWYA
VFT2 PP2100	LQLSAAEQQW	---	LGVINNRWRG	FGRHEDDNSK
VFT1 BP1877	VALDGDDWRW	---	HRSLI YRWG-	---
VFT1 PP2100	PVLTPEQRQW	---	RSSIFKRWS-	---
VFT2 AP_002970	LELTEHEKQW	---	VLRLTEKWK	MPNVTIDTWD
VFT1 AP_002970	LRLSNKELRW	---	RYEVSQNWL-	---
VFT1 TM1040_1030	---	---	LQALREKYL	A---
VFT2 VDA_001728	IKAENKLTKV	---	ISQLRKKYQP	SIILKGFDES

Figure 60 Alignement entre des VFT de capteurs-kinases de différentes espèces (identiques à celle de la figure précédente). Les résidus tryptophane les plus conservés (W₅₈ et W₂₈₀ du VFT1 de BvgS et W₃₀₂ et W₅₂₅ du VFT2 de BvgS) sont indiqués par des flèches rouges. Les résidus W₅₈ (VFT1) et W₅₂₅ (VFT2) sont indiqués par des flèches bleues. La colonne bleue « --- » indique une portion de séquence non représentée dans chaque protéine.

b. Matériel et méthodes

La démarche expérimentale est celle décrite dans Herrou et al., 2009. Etant utilisée pour les constructions des différentes souches substituées dans BvgS, le principe de cette technique est repris ici. Les substitutions sont générées par PCR chevauchantes en utilisant des couples d'amorces spécifiques contenant la substitution (Tableau 1). Typiquement les amorces UP et LO contenant la mutation sont utilisées en PCR, respectivement avec les amorces LO et UP du fragment du domaine senseur ciblé. Ces deux amplicons sont alors utilisés ensemble comme matrice pour réassembler la totalité du fragment portant la mutation, en utilisant les amorces UP et LO dudit fragment (SpeI UP-BamHI LO pour VFT1, BamHI UP-BglII LO pour VFT2, BglII UP-XbaI LO pour le domaine PAS, Tableau 1). Lorsque la substitution se situe dans une zone très proche ou à l'intérieur d'une de ces amorces d'amplification des domaines, elle est simplement remplacée par l'amorce contenant la mutation.

Tableau 1 Liste des amorces de PCR utilisées dans cette étude

Amorces	Séquence	Notes
BvgSpeI UP	5'-ATACTAGTGGAAGCTGATAGACCTCGCCAA-3'	Amplification du domaine VFT1
BvgBamHI LO	5'-TAGGATCCCAGTCCCCAGCGGTAGATCA-3'	
BvgBamHI UP	5'-TAGGATCCAGCATTTCGCTCGATTTTCG-3'	Amplification du domaine VFT2
BvgBglII LO	5'-GGTAGATCTCGTTGCGGTAGG-3'	
BvgBglII UP	5'-ACCGCAACGAGATCTACGTG-3'	Amplification du domaine PAS
BvgXbaI LO	5'-TATCTAGAATGTCGCCTATCAGC-3'	
W56W58 UP	5'-TCGACGGCGACGATGGACGTGCACTGGCCCGCAAG-3'	Utilisées avec le couple SpeI-BamHI
W56W58 LO	5'-CTTGCGGGCCAGTGCACGTGCATCGTCGCCGTCGA-3'	
W280 LO	5'-TAGGATCCCAGTCCCAGCGCGGTAGATCAG-3'	Utilisée en remplacement de BamHI UP
W302 UP	5'-GCGAGCAGCAAGCGATGGCAGACCA-3'	Utilisées avec le couple BamHI-BglII
W302 LO	5'-TGGTCTGCCATCGCTTGCTGCTCGC-3'	
W525 UP	5'-ATCATCAGCCGTGCTCGAGGCAGCGAC-3'	Utilisées avec le couple BamHI-BglII
W525 LO	5'-GTCGCTGCCTCGAGCACGGCTGATGAT-3'	
W535 LO	5'-GGTAGATCTCGTTGCGGTAGGCATATGCGGTGCGCGGA-3'	Utilisée en remplacement de BamHI UP

Après vérification par séquençage, la portion du gène *bvgS* contenant la substitution est ensuite réintroduite dans un plasmide (pUC19-BvgSmos) contenant la majeure partie du locus *bvgAS* (de BvgA au domaine kinase de BvgS) découpé en cassettes de restriction permettant des échanges de fragments codant, grossièrement, pour les différents domaines senseurs (fig. 61). Les portions de BvgA (cassette EcoRI-SpeI) et du domaine kinase (cassette XbaI-HindIII) permettent l'échange allélique chez *B. pertussis* par recombinaison homologue après réinsertion dans le plasmide mobilisable pSORT-BvgSmos (fig. 62).

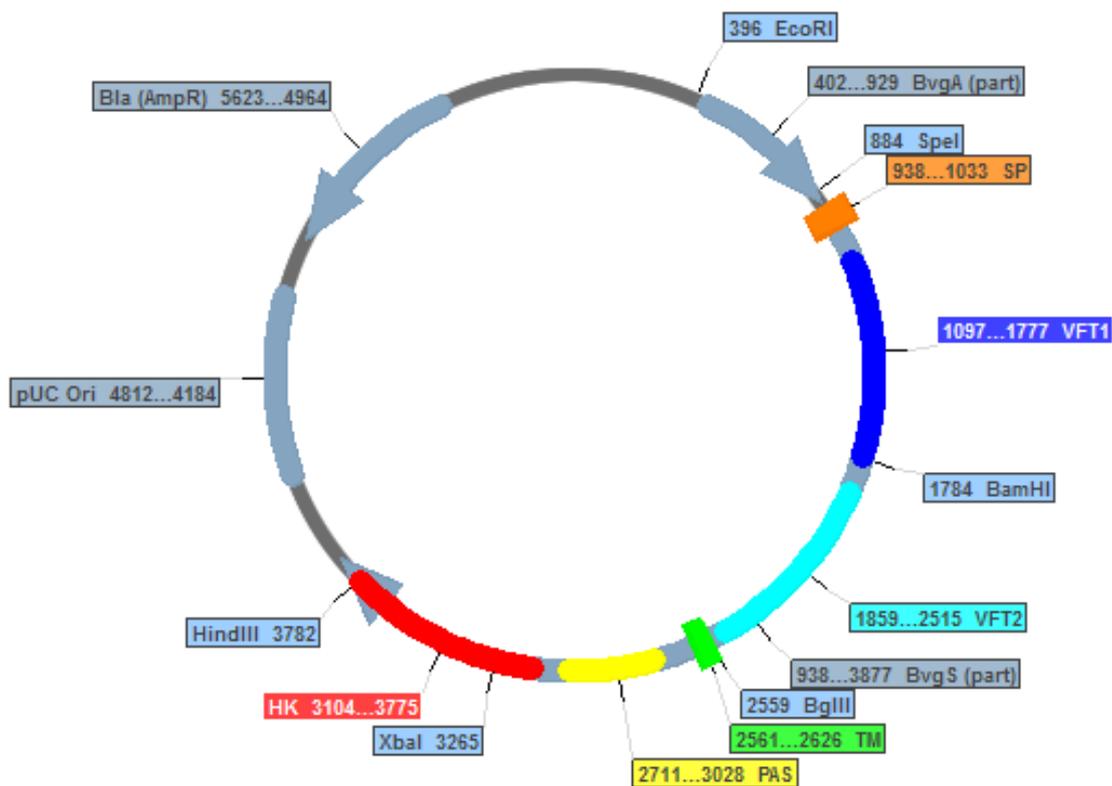


Figure 62 Représentation du plasmide pUC19-Bvg permettant l'échange entre les cassettes des domaines senseurs. L'origine de répliation (pUC Ori) et le gène *bla* (Bla (AmpR)) de résistance à l'ampicilline sont représentés. La portion de *bvgS* (BvgS (part)) est représentée avec les différents domaines protéiques contenus : le peptide signal (SP), les domaines VFT1 et VFT2, le segment transmembranaire (TM), le domaine PAS et le domaine histidine-kinase complet (HK). Représentation créée à partir du logiciel Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)

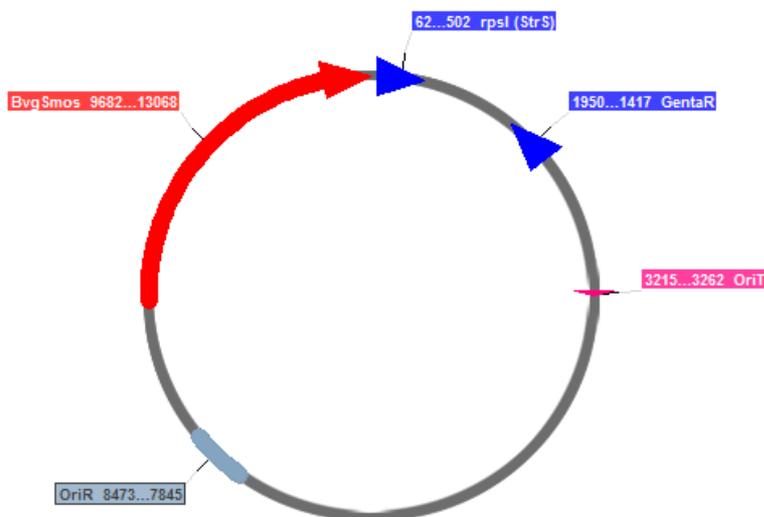


Figure 61 Représentation du plasmide pSORT-BvgSmos. La portion EcoRI-HindIII provenant du plasmide pUC19-BvgSmos est représentée en rouge. L'origine de répliation (OriR) et l'origine de transfert (OriT) sont annotées. Les gènes de résistance à la gentamycine (GentaR) et l'allèle sauvage de la sous unité ribosomique *rpsL* de *B. pertussis* (*rpsL* (StrS)) sensible à la streptomycine sont représentés en bleu. Les autres gènes codés par le plasmide ne sont pas représentés ici.

Le plasmide pSORT-BvgSmos est alors transféré par conjugaison bactérienne d'une souche *E. coli* SM10 donneuse vers une souche de *B. pertussis* TohamaI contenant une large délétion dans BvgS et résistante à la streptomycine (décrite dans Herrou et al., 2009). Les transconjugants sont sélectionnés pour leur résistance à la gentamycine et leur sensibilité augmentée à la streptomycine indiquant l'insertion du plasmide. L'évènement d'excision du plasmide est sélectionné par récupération de la résistance à la streptomycine et perte de la résistance à la gentamycine. Cet évènement peut être une bonne intégration du fragment *bvgAS* muté ou un retour à la souche délétante originale, ainsi des PCR de vérification de l'insertion sont effectuées et le fragment contenant la mutation est aussi amplifié et reséquéncé.

Lorsque la virulence de la souche TohamaI délétante est restaurée par réintroduction du locus *bvgAS*, la sélection est possible par réapparition de l'hémolyse en milieu gélosé (milieu Bordet-Gengou agar complété par 10% de sang de mouton frais). Si la substitution empêche l'activité du système, il n'y a pas d'hémolyse sur boîte et la production de BvgS est vérifiée par Western blot.

Une fois la souche recombinante obtenue, un nouveau plasmide est intégré à son génome, contenant le gène codant la β -galactosidase en fusion transcriptionnelle avec un gène *vag*, le plus fréquemment avec le gène codant la sous-unité S1 de la toxine pertussique ou celui de la FHA. Ces plasmides et leur utilisation sont décrits dans Antoine et al., 2000.

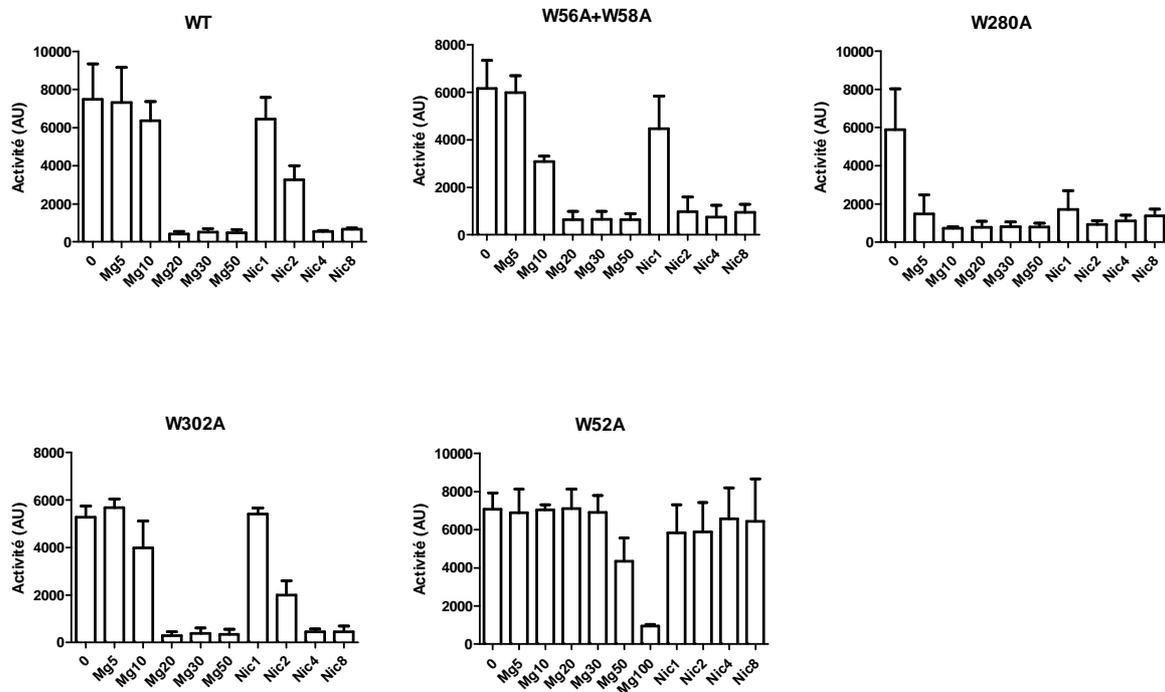
Les souches de *B. pertussis* substituées sont cultivées en milieu Stainer-Scholte supplémenté ou non avec différentes concentrations de modulateurs négatifs pendant 16 heures environ pour obtenir une densité optique à 600 nm de 1,6 à 2. Elles sont ensuite récoltées et lysées afin de suivre l'activité enzymatique β -galactosidase comme décrit dans Antoine et al., 2000. Les expériences sont réalisées en triplicata à partir de trois clones distincts.

c. Résultats et discussion

Les résultats d'activité β -galactosidase d'une fusion transcriptionnelle avec la sous-unité S1 de la toxine pertussique des différentes souches substituées pour les résidus tryptophane ciblés sont représentés en figure 63. Ils indiquent l'activité du promoteur de la toxine pertussique (PTX).

Les résidus W₅₆, W₅₈ et W₃₀₂ ne semblent pas avoir un rôle important dans le fonctionnement du système BvgAS. En effet, l'activité de base en conditions non modulée ainsi que la réponse aux modulateurs sont assez semblables à celles de BvgS sauvage. En revanche les substitutions des autres résidus engendrent des phénotypes distincts.

Figure 63 Activité β -galactosidase représentant l'activité du promoteur de la toxine pertussique des différentes souches substituées dans les codons tryptophane indiqués, en comparaison avec BvgS sauvage (WT). 0 est la condition en absence de modulateurs, MgX représente une condition en présence de X mM de $MgSO_4$ et NicX représente une condition en présence de X mM d'acide nicotinique. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre trois expériences distinctes. Illustration réalisée à partir du logiciel GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).



La substitution du résidu W_{280} génère un mutant capable de répondre à des concentrations relativement faibles de modulateur, que nous qualifierons d'hypersensible. Bien qu'il permette une activité basale normale, l'hypersensibilité d'un tel mutant tendrait à montrer que ce résidu W_{280} permet une certaine robustesse de la conformation active face aux modulateurs négatifs de la virulence. Ainsi, on peut supposer que ce résidu est impliqué dans le maintien de la conformation active de BvgS. De façon étonnante, ce résidu du VFT1 génère une hypersensibilité au nicotinate, perçu par VFT2. On peut alors supposer que VFT1 va influencer la sensibilité du domaine VFT2 et aurait alors aussi un rôle dans la modulation.

La substitution du résidu W_{535} génère une souche totalement avirulente, bien que BvgS soit détectable dans les fractions membranaires. L'activité du promoteur PTX est en-deçà du seuil de détection (non représentée), indiquant son rôle critique pour le maintien de la conformation active de BvgS.

Le résidu W_{525} quant à lui, serait impliqué dans la transmission du message négatif. En effet, le mutant maintient son activité basale à un niveau normal mais il devient incapable de relayer l'information négative fournie par l'acide nicotinique même à une concentration de 20 mM (non montrée) définissant un mutant non modulable. Bien qu'il soit encore capable de répondre au $MgSO_4$, il faut des quantités largement supérieures à celles nécessaires à la modulation de la bactérie sauvage. Le nicotinate étant perçu par VFT2, ce résidu permettrait donc de relayer le message négatif perçu à ce niveau. En revanche, le mode d'action des ions

sulfates pourrait être différent, et par exemple perçu par plus d'une région de BvgS, permettant à un tel mutant de pouvoir encore percevoir ces signaux bien qu'avec une efficacité moindre.

Ces résidus tryptophane sont donc conservés pour le maintien de l'activité ainsi que de la capacité de modulation. Etant localisés au niveau d'hélices N- ou C- terminales, ils ne seraient pas impliqués dans la perception directe des modulateurs mais plutôt dans la transmission des signaux entre les VFT et les domaines cytoplasmiques. L'inactivité du mutant W₅₃₅A, résidu situé dans la dernière hélice périplasmique et faisant jonction avec le segment transmembranaire, indiquerait qu'un « message » positif provient de la portion périplasmique de BvgS pour maintenir son activité. La nature de ce message serait conformationnelle. Le résidu W₅₃₅ permettrait la transmission de ce message au-delà du périplasma et ainsi en son absence ce message serait « perdu », rendant BvgS inactif.

3. Combinaison de substitutions

a. Contexte

Les résultats précédents ont donc permis de définir des résidus importants pour l'activité de BvgS au niveau des cavités et dans des zones de jonction entre domaines. Les mécanismes permettant l'explication des phénotypes obtenus restent obscurs. Il semblerait que certains résidus de cavité soient nécessaires à la perception de signaux, en particulier des signaux chimiques ayant un effet négatif, tandis que les résidus conservés des jonctions seraient impliqués dans la transmission de ces signaux. Afin de mieux comprendre ces mécanismes ainsi que l'importance relative de VFT1 et VFT2 dans la perception et la transduction du signal, des expériences de combinaison de substitutions ont été entreprises. En effet, l'apparition de phénotypes hypersensibles ou non modulables dans les différents mutants nous a amené à penser que la combinaison de substitutions engendrant ces phénotypes opposés permettrait de définir un phénotype dominant et ainsi indiquer des priorités dans la signalisation. On pourrait supposer que le message suive l'ordre des domaines du N- vers le C-terminus et que chacun soit un « point de contrôle » indépendant dans la transmission de signal, comme dans le cas des iGluR où grossièrement le VFT2 en présence d'un ligand activateur ouvre le canal alors que le VFT1 va pouvoir interrompre ce signal activateur en fixant un antagoniste.

Ainsi la substitution W₂₈₀A du VFT1 (hypersensible) a été combinée avec des substitutions de cavité soit dans VFT1 (« D1on » : D₁₇₅A + Y₁₇₈A) soit dans VFT2 (« D2on » : F₃₇₅E + Q₄₆₁E) générant un BvgS mutant incapable de répondre aux modulateurs chimiques. De même, la substitution W₅₂₅A du VFT2 (insensible) a été combinée à une substitution de cavité générant un mutant hypersensible dans VFT2 (F₃₁₇A). Enfin, les substitutions dans la cavité du domaine VFT1 rendant la bactérie non modulable (D1on) et dans la cavité du domaine VFT2 rendant la bactérie hypersensible à la modulation (F₃₁₇A) ont été combinées pour définir l'importance relative des cavités dans l'intégration du signal (négatif particulièrement). Notons qu'en plus de son hypersensibilité, la substitution du résidu F₃₁₇ engendre aussi une diminution de l'activité basale de plus de 50% (Herrou et al., 2010).

b. Résultats et discussion

Les phénotypes des mutants quant à l'activité du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique dans les différentes conditions sont représentés en figure 64.

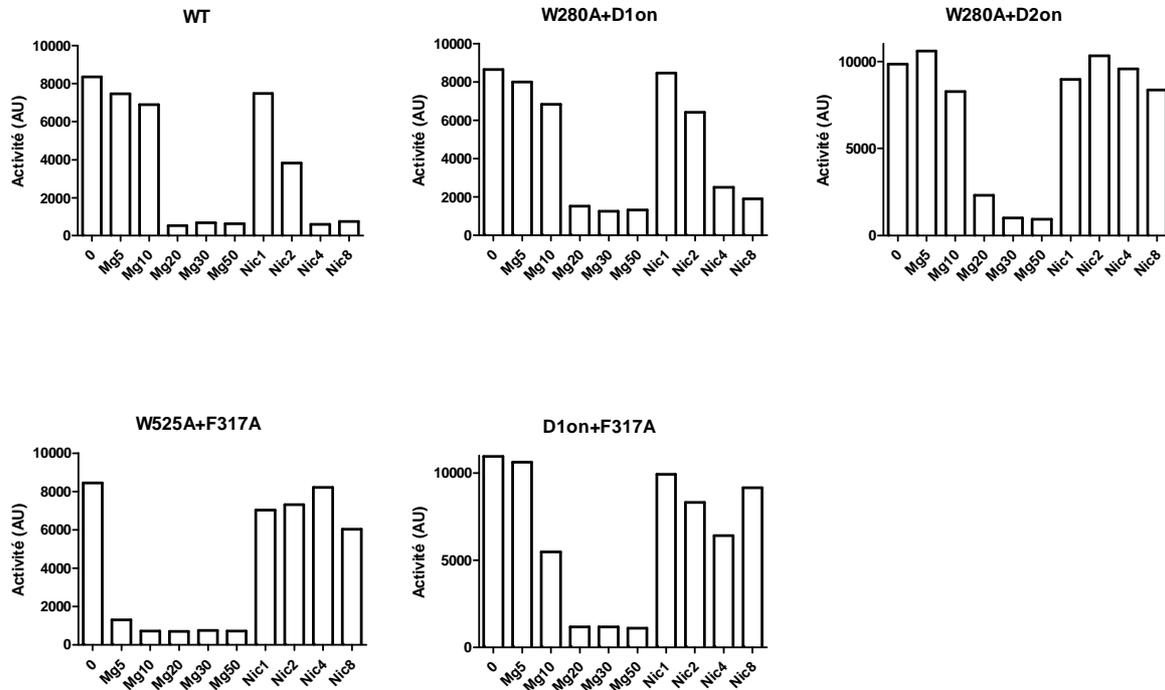


Figure 64 Activité β -galactosidase des différentes souches issues de combinaisons de substitutions dans une expérience représentative.

De façon intéressante et inattendue, la réponse des différents mutants aux deux modulateurs utilisés est souvent dissociée. Ceci semble à nouveau indiquer des mécanismes de perception distincts de ces deux types de modulateurs.

La combinaison « W₂₈₀A + D2on », génère un mutant incapable d'être modulé par l'acide nicotinique mais modulable par le sulfate de magnésium. L'incapacité de perception du nicotinate du mutant D2on ne peut donc pas être contrebalancée par l'hypersensibilité conférée par la substitution W₂₈₀A du VFT1. Ceci confirme que le domaine VFT2 dans ce mutant est modifié de telle sorte à être incapable de fixer l'acide nicotinique, vraisemblablement à cause de la perturbation du potentiel électrostatique de sa cavité comme discuté dans l'article. Cette mutation semble avoir un effet plus modéré pour la perception du MgSO₄, on peut donc imaginer que celle-ci se fasse non seulement dans la cavité du VFT2 mais aussi à un (des) autre(s) niveau(x) de la protéine, d'où une capacité de perception restaurée par rapport à l'hypersensibilité à ce modulateur d'un mutant W₂₈₀A isolé. On pourrait alors supposer que le mutant « D2on » seul soit en réalité toujours capable de répondre au MgSO₄ bien que dans une moindre mesure que BvgS sauvage. La sensibilité résiduelle de ce mutant BvgS n'apparaîtrait qu'à plus haute concentration de ce modulateur. Pour vérifier cette hypothèse il aurait fallu placer les substitutions de BvgS-D2on (F₃₇₅E et Q₄₆₁E) dans le contexte de BvgS sensible (K₇₀₅E) comme dans le cas de la combinaison

W₂₈₀A+D1on. Malheureusement, cette expérience n'a pas été menée pour tester ces suppositions.

En combinant W₂₈₀A avec D1on, on retrouve un phénotype très proche du phénotype sauvage. Il semblerait donc que les substitutions W₂₈₀A et D1on n'affectent pas directement la perception des modulateurs, mais plutôt dans la capacité de transmission des stimuli négatifs. Ainsi les phénotypes de chaque substitution séparée se compensent et on retrouve un phénotype sauvage. La mutation D1on empêcherait une bonne propagation du signal négatif probablement en rendant la conformation inactive plus difficile à atteindre. Le résidu W₂₈₀ conférerait une certaine robustesse à la conformation active, permettant de la maintenir face à de faibles concentrations de modulateurs, et son absence favoriserait l'adoption de la conformation modulée inactive.

La combinaison entre D1on et F₃₁₇A pourrait confirmer l'implication des substitutions de D1on pour entraver la transmission du signal négatif fourni par le nicotinate. En effet, la substitution F₃₁₇A favoriserait la fixation du nicotinate dans VFT2. Or, ce double mutant est incapable de répondre à la présence de ce modulateur. On peut donc proposer que d'une certaine façon le domaine VFT1 influence la transmission du signal négatif perçu par VFT2 malgré sa position distale dans l'ordre supposé de transmission du N vers le C-terminus de BvgS. Ce mécanisme pourrait rappeler le contrôle exercé par le VFT1 sur l'activité du VFT2 dans les iGluR. En effet, dans ce cas, le VFT1 lié à son antagoniste va empêcher la signalisation positive du VFT2 lié à l'agoniste. Cependant, les rôles des VFT 1 et 2 seraient ici inversés, VFT2 permettrait l'intégration d'un signal antagoniste qui va inactiver le système tandis que VFT1 maintiendrait l'activité du système permettant une certaine robustesse de la conformation active.

La capacité de ce mutant à répondre au MgSO₄ supporte à nouveau l'existence de plusieurs sites de perception de ce modulateur et il est difficile de pouvoir tirer une conclusion à ce stade. On peut imaginer que la conformation induite par la substitution F₃₁₇A soit plus proche de la forme inactive et que cette conformation soit atteinte en présence de faibles concentrations de modulateurs dans ce cas, alors que les substitutions de D1on, au contraire, forcent l'activité du système. La combinaison des substitutions ramènerait l'équilibre du système plus proche de l'état sauvage.

La combinaison entre W₅₂₅A et F₃₁₇A génère à nouveau un mutant incapable de répondre à l'acide nicotinique. On peut donc confirmer l'importance du résidu W₅₂₅ dans la transmission du signal négatif « nicotinate » perçu par VFT2. En effet F₃₁₇ permettrait plus facilement l'accès à la conformation inactive en améliorant la perception du nicotinate, mais cette information ne serait plus relayée en absence du résidu W₅₂₅. Ce mutant est hypersensible au MgSO₄, la perception de ces ions reste une énigme mais il devient évident qu'elle ne se ferait pas par le VFT2 ou du moins que l'importance de leur perception à ce niveau est mineure. Dans un tel cas de figure, le rôle du résidu W₅₂₅ serait de transmettre l'information négative (fixation du nicotinate) perçue par le VFT2, mais ce résidu ne serait pas impliqué dans le relais de l'information « MgSO₄ », perçue à un autre niveau de BvgS. Alternativement, la conformation négative induite par ce modulateur diffère de celle induite par le nicotinate et ne

nécessite alors pas le résidu W₅₂₅ pour être relayée, bien que perçue par le domaine VFT2. Des mécanismes divergents dans la transduction de signaux négatifs semblent tout de même plus difficilement vraisemblables car ils impliqueraient des changements de conformation différents aboutissant à un même résultat. Par ailleurs, les modulateurs de type acide nicotinique et MgSO₄ sont capables d'avoir une action synergique. En effet, l'ajout de concentration sub-modulatrice de chacun de ces composés (par exemple 1 mM d'acide nicotinique combiné à 10 mM de sulfate de magnésium) permet le passage en phase Bvg- (non montré) ce qui plaiderait en faveur de zones de perception distinctes pour ces modulateurs.

4. Premiers éléments de réponses et nouvelles questions

Les différentes expériences menées jusqu'ici ont permis de définir les prémices des mécanismes de signalisation par les domaines périplasmiques de BvgS. Première découverte importante, **la perception du nicotinate se fait au niveau du VFT2**. Bien que le site précis ne soit pas défini, les substitutions D20n et F₃₁₇A semblent indiquer que **la cavité est impliquée**. Le sulfate de magnésium serait perçue dans un autre site, voire plusieurs, et les mécanismes de sa perception restent à définir.

Le résidu W₅₂₅ va permettre la transduction du signal négatif « nicotinate » et permettre le passage en phase Bvg-. **Le domaine VFT1 va aussi jouer un rôle dans la transduction de ce signal « nicotinate »**, la composition de sa cavité semble importante pour une bonne transmission du signal négatif et le résidu W₂₈₀ permet un maintien de la conformation active de BvgS en lui conférant une robustesse face aux signaux négatifs perçus par VFT2.

Enfin, le résidu W₅₃₅ est essentiel au maintien de l'activité du système. Il se situe dans la dernière hélice périplasmique qui doit se prolonger dans le segment transmembranaire et possiblement dans le cytoplasme jusqu'au domaine PAS. Cette longue hélice α permettrait la transmission des signaux depuis le périplasme vers les domaines sous-jacents. On peut donc supposer qu'**un message positif provient du périplasme pour maintenir le système actif**. Le résidu W₅₃₅ serait impliqué dans le couplage de l'hélice avec les domaines périplasmiques pour la transduction des signaux perçus dans cet espace. Ainsi, en son absence **cette hélice se retrouverait dans une conformation rendant BvgS inactif car elle est libérée des contraintes activatrices fournies par les domaines VFT et relayées par W₅₃₅**.

On pourrait alors imaginer VFT1 comme un « accélérateur » et VFT2 comme un « frein » du système. En absence de nicotinate, VFT1 fournit un message positif (sous la forme d'une conformation active) et VFT2 laisse passer ce message positif. Lorsque le nicotinate est présent, VFT2 va alors percevoir ce message négatif qui contrebalance le message positif du VFT1, et c'est l'intégration de ces deux effets qui détermine l'activité (fig. 65).

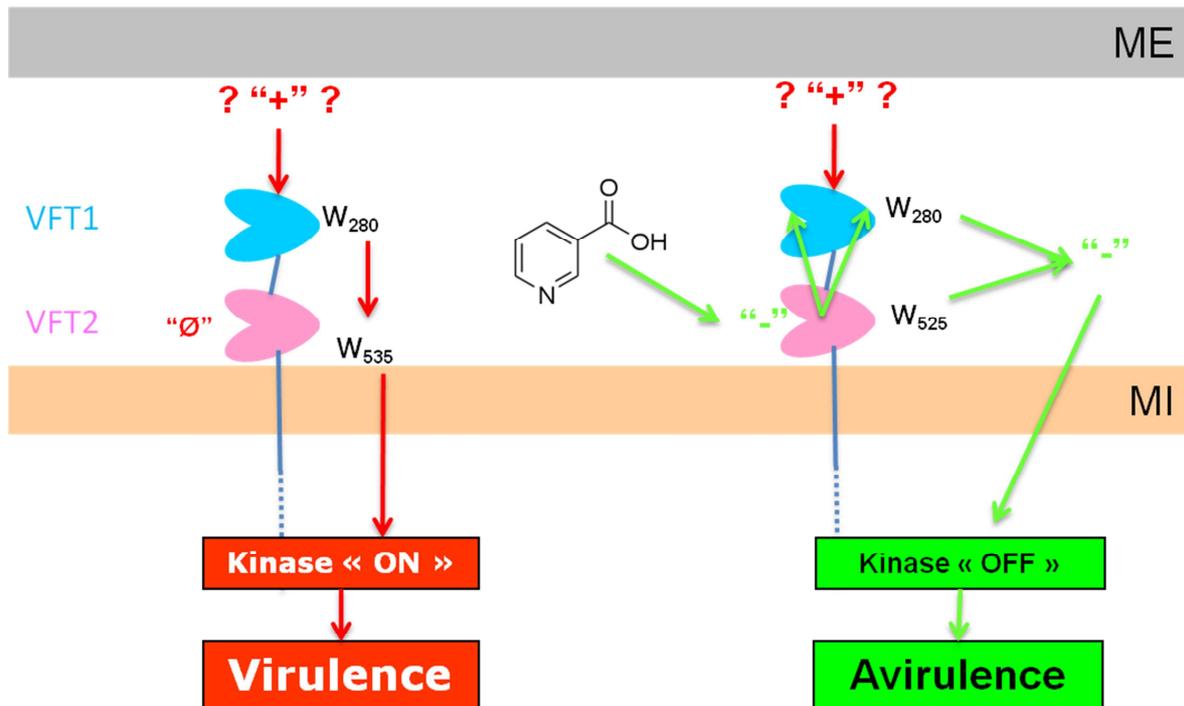


Figure 65 Représentation schématique des domaines périplasmiques de BvgS dans la réponse à l'acide nicotinique. Les résidus W280, W525 et W535, importants dans la transmission des signaux, sont indiqués. Les flèches rouges indiquent un stimulus positif et les flèches vertes indiquent un stimulus négatif. Le symbole ? "+" ? indique un stimulus positif de nature inconnue représentant l'implication du VFT1 dans le maintien de l'activité. Le symbole "∅" représente l'absence de modulateurs. L'acide nicotinique est représenté par sa formule moléculaire. Les tirets bleus montrent la continuité de la protéine vers les domaines non représentés, Kinase « ON » ou « OFF » représente l'activité du domaine kinase ou son inactivité (ou activité phosphatase). La membrane interne (MI) et la membrane externe (ME) sont représentées.

Nous avons donc pu démontrer que les domaines VFT 1 et 2 de BvgS étaient tous deux impliqués dans l'intégration d'un message négatif et sa transmission après sa perception par le domaine VFT2. Cependant, la capacité d'interaction entre ces domaines n'a jamais été démontrée, bien que nous ayons pu voir que certains résidus semblaient nécessaires à la transmission des signaux et donc sans doute d'une certaine façon à la communication inter-domaines. **Comment les répercussions de la captation du nicotinate vont-elles se propager du domaine VFT2 vers le domaine VFT1, et vice versa, pour inactiver le système ?** Dans le cas des iGLuR, le domaine VFT1 est capable de réguler l'activité du domaine VFT2, mais il n'y a pas de données indiquant une régulation du domaine VFT1 par le domaine VFT2. Ainsi BvgS représenterait un mécanisme distinct dans lequel les domaines VFT sont capables de s'influencer l'un l'autre dans les deux sens. **Quelles particularités structurales permettraient cette interconnexion ?** Ces questions fondamentales trouveront quelques éléments de réponse dans la partie suivante.

B. Etudes de la portion périplasmique complète

Nous avons ainsi déterminé la structure du domaine VFT2 et identifier ce domaine comme site de perception des modulateurs négatifs de la famille du nicotinate. Différents résidus impliqués dans la transduction du signal par les domaines VFT ont aussi pu être identifiés. Cependant, la structure du domaine VFT1 ou de la portion périplasmique complète reste inconnue et pourrait aider à l'identification des mécanismes de perception et transduction du signal par ces domaines.

1. Une organisation dimérique originale

La structure du domaine VFT1 isolé n'a jamais été obtenue. Cependant la portion périplasmique complète a pu être cristallisée par Julien Herrou avant qu'il ne quitte le laboratoire, et sa structure a finalement pu être résolue assez tardivement grâce à une collaboration internationale. Ainsi, nous nous sommes basés sur cette structure afin d'étudier la relation entre cette structure et la fonction de ces domaines.

- a. Extracellular domain of BvgS sensor-kinase: a new paradigm for signaling in Venus flytrap receptors (article en préparation)

Extracellular domain of BvgS sensor-kinase: a new paradigm for signaling in Venus flytrap receptors

Elian Dupré^{#1,2,3,4}, Julien Herrou^{#1,2,3,4,5}, René Wintjens⁶, Marc F. Lensink⁷, Alexei Vagin⁸, Andrei Lebedev⁸, Vincent Villeret⁷, Camille Locht^{1,2,3,4}, Rudy Antoine^{*1,2,3,4}, Françoise Jacob-Dubuisson^{*1,2,3,4}

¹ Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity, Lille, France

² CNRS UMR8204, Lille, France;

³ INSERM U1019, Lille, France;

⁴ Univ. Lille Nord de France, 59019 Lille, France;

⁵, current address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, IL, USA.

⁶, Université Libre de Bruxelles, Laboratory of Biopolymers and Supramolecular Nanomaterials/Structural Biology Unit, CP 206/04, 50 avenue Roosevelt, 1050 Brussels, Belgium

⁷, Institut de Recherche Interdisciplinaire, USR 3078, Univ Lille Nord de France, 59658, Villeneuve d'Ascq, France

⁸, CCP4, STFC Rutherford Appleton Laboratory, Harwell Oxford

contributed equally

* for correspondence: rudy.antoine@pasteur-lille.fr; francoise.jacob@ibl.fr

Abstract

Two-component systems are major signal-transduction pathways for bacterial adaptation to environmental stimuli. The perception of a chemical or physical signal by the sensor-kinase triggers its autophosphorylation. The phosphoryl group is then transferred to the cognate response regulator to mediate the appropriate adaptive response. The two-component system BvgAS controls the virulence of the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. BvgS is the prototype for a family of sensor-kinases that harbour periplasmic bi-lobed Venus flytrap (VFT) perception domains in tandem. BvgS is active in its basal state, and its activity is down-modulated by specific molecules binding to the membrane-proximal VFT2 domain. We describe here a new, homodimeric architecture for the periplasmic moiety of BvgS, with highly intertwined polypeptide chains. We also deciphered the basic principles of signal transduction by this protein. Mechanical tensions generated by the periplasmic domain provide conformational signals that are transmitted to the kinase domain. Generation of an activating signal by the native, unliganded conformation of the periplasmic domain involves specific interactions between the two polypeptide chains of the dimer. Generation of an inactivating signal induced by chemical modulation involves a larger set of interactions both intra- and inter-chains, indicating increased conformational tension. Tight interactions between the VFT domains of the BvgS dimer thus determine an original signaling mechanism.

Introduction

Two-component sensory transduction systems regulate a variety of physiological processes in response to environmental changes^{1,2}. They are abundant throughout the phylogenetic tree except for mammals and represent major signal transduction systems in bacteria^{3,4}. Two-component systems are typically composed of two proteins, a trans-membrane sensor-kinase activated by environmental stimuli and a response regulator mediating phosphorylation-dependent effects^{5,6}. Auto-phosphorylation of a conserved cytoplasmic His residue of the sensor-kinase is followed by transfer of the phosphoryl group to a conserved Asp residue of the response regulator. The phosphorylated response regulator mediates a specific, frequently transcriptional, cellular response⁷. There is considerable diversity among two-component systems regarding domain composition and organization^{5,6}. A subset of eubacterial two-component systems harbor tandem extracytoplasmic Venus flytrap (VFT) sensor domains, similar to ionotropic Glu receptors (iGluR) in higher eukaryotes⁸⁻¹².

Bordetella pertussis, the whooping cough agent, colonizes the upper respiratory tract of humans¹³. Transcription of its virulence regulon is positively regulated by the two-component system BvgAS, resulting in the infection-proficient Bvg⁺ phase^{14,15}. Atypically, the Bvg system appears to be active in its basal state without specific stimuli, while negative modulators of its activity have been identified in laboratory conditions, such as nicotinate or SO₄ ions at millimolar concentrations¹⁶.

BvgS is the prototype of a large family of bacterial VFT domain-containing sensor-kinases whose molecular mechanisms of signal perception and transduction remain largely unexplored¹². VFT domains have a bi-lobed structure with two mobile jaws delimitating a cavity¹⁷⁻¹⁹. They exist in open and closed conformations that interconvert by clamshell motions. Typically, binding of a ligand in the cavity stabilises the closed conformation, which triggers downstream events such as transport or signaling²⁰. The periplasmic moiety of BvgS is composed of two VFT domains, VFT1 and VFT2, joined by a single transmembrane segment to the His-kinase-containing cytoplasmic moiety. We have established that the active VFT2 conformation is closed without a *bona fide* ligand, and that nicotinate binding to VFT2 negatively regulates the system²¹. This contrasts with eukaryotic iGluR, which are activated by agonists binding to the second VFT domain¹¹.

In this work, we describe the structure of the entire periplasmic domain of BvgS, revealing a new homo-dimeric architecture formed of two highly intricate protomers wound around each other. The inter-monomer interfaces are larger than those within each monomer, and the largest inter-domain interface is that between VFT1 of each monomer and VFT2 of the other. The VFT2 cavity is closed, as in the structure of the isolated domain, while VFT1 is wide open. Site-directed mutagenesis demonstrated the critical roles of open and closed conformations of each VFT and of inter-monomer interfaces for signal transduction. BvgS represents a new paradigm for VFT-containing receptors.

Results

Structure of the periplasmic domain of BvgS

The periplasmic domain of BvgS (residues Ala29-Leu544) was produced in *Escherichia coli* and crystallized as a recombinant protein with GB1 and 6-His tags at the N and C termini, respectively (Fig. 1). The structure was solved to a resolution of 3.1 Å (Table 1). The N-terminus (residues 29-35), and the C-terminal region (residues 542-545) could not be resolved.

Two BvgS homo-dimers are found in the asymmetric unit. BvgS forms intricate butterfly-shaped dimers in which the A and B polypeptide chains are twisted around each other. The B factors are on average larger for the B chain, and the two chains overlap with an RMSD of 0.822 Å. A two-fold symmetry axis runs parallel to the long axis of the dimer. The N termini of the two monomers are located on the outer surface of the dimer, and their C termini form α -helices at the membrane-proximal end of the structure. The B factors of the top region of the VFT1 domains are considerably larger than those of the VFT2 domains in the membrane-proximal part of the dimer (Fig. S1).

VFT1 and VFT2 adopt typical Venus flytrap architectures consisting of two α/β domains called lobes 1 and 2 (L1 and L2) separated by a cleft. They have similar topologies with two crossings between the lobes. In both chains, VFT1 is open and VFT2 is closed. The hinge is formed of anti-parallel β -strands in VFT2 and extended loops in VFT1 (Fig. 2). In each chain, VFT1 and VFT2 are joined by a surface-exposed linker (Asp₂₈₉-Ser₂₉₆,) with a high B factor (Fig. S1). The structure of VFT2 in the BvgS dimer is highly similar to that of the isolated, monomeric domain (pdb code 3MPK; rmsd of 1.043 Å with chain A, 1.143 Å with chain B), except that the opening angle between the two lobes is slightly lower in the dimer than in VFT2 alone ($31.9^\circ \pm 0.2$ versus 38.8°) and the hairpin Leu₃₂₂-Gly₃₃₁ is more structured²¹. Non-protein electronic density in the VFT2 cavity could not be attributed at the current resolution. In the monomeric VFT2 structure, acetate and glycerol molecules from the crystallization medium were fortuitously trapped in the cavity²¹.

In contrast to VFT2, VFT1 is open, with angles between lobes of 55.8° and 49.4° for the A and B chains, respectively. The VFT1 cavity is oriented toward the hinge of the VFT2 domain of the other chain, with a conserved β -hairpin (Phe₇₇-Leu₈₈) extending from the edge of the first lobe of VFT1 (VFT1-L1) towards VFT2 (Fig. 3A). The cavities of the VFT2s are oriented toward the last α -helix, H19, of the opposite chain.

H19 is joined to VFT2 by a loop hereafter called the Ct loop (Arg₅₂₇-Pro₅₃₂) that strongly interacts with the VFT2 domain of the opposite chain (Fig. 3B). A Trp residue, conserved in the BvgS family, Trp₅₃₅, anchors the N terminus of H19 to helix H16 in VFT2-L2 of the opposite chain by forming pi-stacking interactions with Phe and Tyr residues (Fig. 3B). The rest of H19 might not be in a native orientation, because the transmembrane and cytoplasmic domains of BvgS are absent from the recombinant protein.

Interfaces in BvgS

Extensive surfaces are buried within the dimer, and inter-chain interfaces are considerably larger than intra-chain interfaces. For the description below, VFT1, VFT2 and the Ct domain (Ct loop + H19) encompass residues 33-292, 293-527, and 528-546, respectively. Interfaces between analogous domains are found only once in the dimer; the others are present twice (AB and BA). Most interfaces contain networks of H bonds involving main-chain and/or side-chain atoms.

The largest interfaces are those between VFT1 of one chain and VFT2 of the other (VFT1^A-VFT2^B and VFT1^B-VFT2^A), burying $2 \times 1029 \text{ \AA}^2$. Major zones of contact involve the two lobes of VFT1 interacting with the hinge region of VFT2 (Fig. 3A). Other large interfaces are those between both lobes of VFT2 of one chain and the Ct domain of the other, burying $2 \times 688 \text{ \AA}^2$ in total (Fig. 3B). In addition, there is a direct inter-chain H-bond interaction between VFT1-L2 and the Ct loop.

The interfaces within each chain are less extensive. Between VFT1 and VFT2, 664 \AA^2 are buried per monomer, with both lobes of VFT1 contacting VFT2-L1 (Fig. 4). The intra-protomer interface between VFT2 and the Ct domain is limited to 228 \AA^2 per monomer. Similarly, rather small surfaces are buried between corresponding domains in the dimer. The VFT1 domains interact with each other by α -helices H8 (Fig. 3C), burying 399 \AA^2 . Interfaces between the VFT2 domains (220 \AA^2) and between the C loops (153 \AA^2) are stabilized by Van der Waals interactions only.

Role of inter-lobe mobility

To investigate the importance of clamshell motions for BvgS activity, VFT1 and VFT2 were locked in closed conformations by generating disulfide bonds between their lobes, as previously described for iGluRs^{22,23}. The corresponding point mutations were inserted into the chromosomal *bvg* locus by allelic exchange, and the effects of the substitutions on BvgS activity were measured by using a *lacZ* reporter gene under the control of the Bvg-regulated *ptx* promoter as in²⁴.

The VFT1 domain was modeled in closed conformation to identify positions for disulfide bond formation. The resulting variant BvgS_{E113C-N177C} had a barely detectable activity, but this phenotype was reverted after addition of a reducing agent, TCEP, *in vivo*, as well as the response to negative modulation (Table 2; Fig. S3). Disulfide bond formation in the Bvg variant was verified by immunoblot analyses of *B. pertussis* membrane fractions (Fig. S3).

Two distinct pairs of Cys were also introduced in VFT2 (Fig. S4). Both BvgS_{T355C+D442C} and BvgS_{L316C+S445C} were active, but their modulation phenotypes were quite distinct. The former was unresponsive to nicotinate, while BvgS_{L316C+S445C} was more sensitive than wt BvgS (Table 2; Fig. S2). Both variants reverted to wt phenotypes when the growth medium was supplemented with TCEP, a strong reducing agent (Fig. S2), and the formation of a disulfide bond was confirmed by an altered electrophoretic migration of such BvgS variants (Fig. S3).

Altogether therefore, the crystal structure with open VFT1s and closed VFT2s most likely represents the active form of BvgS. In this conformation, the periplasmic domain transmits a ‘positive’ (activating) message to the cytoplasmic kinase domain via the transmembrane helices. The periplasmic domain of BvgS appears to adopt this ‘positive-signaling’ conformation without an agonist ligand.

Roles of inter-chain interfaces for positive signal transmission

To test the hypothesis that the native conformation of the periplasmic domain provides a positive signal to the kinase, transmission between periplasm and cytoplasm was disrupted by replacing Trp₅₃₅ which is critically positioned to connect the C-terminal pre-membrane helix to the periplasmic moiety, with an Ala residue (Fig. 3B). This substitution abrogated BvgS activity (Table 2), supporting the model of a ‘positive-signaling’ conformation of the periplasmic domain in its basal state.

To probe the role of the distinct intra-dimer interactions to maintain this conformation, selected interface residues were altered by site-directed mutagenesis. We thus identified two distinct zones of dimeric interactions in the largest interface between VFT1 of one chain and VFT2 of the other that are essential for BvgS activity (Table 2; Fig. S2). Thus, substitutions in the β -hairpin of VFT1-L1 that interact with the first strand of VFT2’s hinge (S19) abolished activity (BvgS_{Y81A+E86A}). Disruption of interactions between H5 in VFT1-L2 and the second hinge strand of VFT2 (S25) had a similar effect (BvgS_{E200A}). In contrast, perturbation of other inter-chain interactions between VFT1 and VFT2-L2 (BvgS_{Q463A}) or between VFT2-L1 and the Ct loop (BvgS_{T324G+T325G+D326G+E327G}), did not affect activity (Table 2).

Specific inter-chain interactions between VFT2 and the Ct domain are also critical for positive signaling. Thus, disruption of interactions between H16 of VFT2-L2 and the Ct loop of the opposite monomer (BvgS_{R472A+Y473A}) virtually abrogated activity, corroborating the result obtained with BvgS_{W535A}. Interestingly, the corresponding single-substitutions variants BvgS_{R472A} and BvgS_{Y473A} were moderately active, indicating that this critical VFT2-Ct domain interface is stabilized by multiple, partly redundant interactions (Table 2).

A number of other interactions were altered, but none of them appeared important for Bvg basal activity. This includes disruption of the VFT1-VFT1 inter-monomer interface mediated by helices H8 (BvgS_{S271A+E272A+R274A+S275A}) or its stabilization by a disulfide bond (BvgS_{S271C}), and alterations to the intra-monomer VFT1-VFT2 (BvgS_{R234A} and BvgS_{F230A+S287A}), VFT1-Ct domain (BvgS_{N231A}), or VFT2-Ct domain (BvgS_{R526A}) interfaces (Table 2; Fig. S3).

Collectively, our results thus identified specific interactions within the large inter-protomer interfaces of BvgS’s periplasmic domain involved in positive signaling. This conformational state of BvgS requires interactions between the two lobes of VFT1 and VFT2’s hinge, and between H16 of VFT2-L2 and the Ct domain.

Negative signaling induced by nicotine

Nicotine exerts its negative effect on BvgS activity by binding to VFT2²⁴. We hypothesized that upon nicotine perception, the periplasmic domain of BvgS adopts a distinct conformation serving as a negative signal for the cytoplasmic kinase. To identify interfaces involved in negative signaling, the capability of all active BvgS variants to respond to nicotine was assessed. A number of substitutions abrogated the negative effect of nicotine (Table 2; Fig. S2). Thus, the disruption of intra-monomer interactions, including the VFT1-VFT1 interface (BvgS_{S271A+E272A+R274A+S275A}), and those between VFT2-L1 and VFT1-L1 (BvgS_{R234A}), between both lobes of VFT1 and H18 of VFT2 (BvgS_{F230A+S287A}), and between VFT2 and the Ct domain (BvgS_{R526A}), affected the response to nicotine modulation (Table 2; Fig. S2). We also identified specific inter-chain interactions required for negative modulation, including those between VFT1-L2 and H18 in VFT2-L1 (BvgS_{N231A}), and between VFT1-L2 and VFT2-L2 (BvgS_{Q463A}; Table 2). Altogether, thus, a large set of inter- and intra-protomer interactions are involved in negative signaling, and in particular interactions close to the core of the dimer. In contrast, disruption of those interactions did not markedly affect positive signaling.

Discussion

BvgS is the prototype of a large family of two-component sensor-kinases containing between one and four periplasmic VFT domains in tandem¹² (Fig. S5). The periplasmic domain of BvgS adopts an original, highly compact dimeric architecture. The extensive inter-protomer interfaces strongly argue that the X-ray structure represents the native fold of the periplasmic domain in full-length BvgS. A dimeric periplasmic moiety is in agreement with previous reports showing that the cytoplasmic moiety of BvgS also dimerizes^{25,26}, and with our identification of specific inter-domain interactions critical for BvgS function. This novel structure lays the first bases to decipher the molecular mode of action of those bacterial VFT-containing sensor-kinases. In this work, we identified the interfaces involved in signal transmission, leading to an original mechanism of action for VFT receptors.

The dynamics of signaling proteins is essential to their function²⁷. The analyses of BvgS reported here show that both the conformation and dynamics of the periplasmic domain determine the activity of the system. Thus, disrupting some interactions at specific interfaces affect BvgS activity or response to negative modulation, indicating that the two signaling states correspond to specific conformations that must be maintained by those interactions. In addition, constraining the VFT domains by the generation of disulfide bonds between their lobes affect signaling, arguing that the dynamics of the periplasmic domain also contributes to its function. Thus, the positive- and negative-signaling states correspond to distinct conformational and dynamic states. This is compatible with the occurrence of intermediate levels of activity of the BvgAS system¹⁵. Indeed, some of the BvgS variants reported here have intermediate activities, which we speculate may represent intermediate conformational and/or dynamic states of the protein.

Positive signaling requires a limited set of inter-protomer interactions, while negative signaling induced by nicotinate requires a larger number of interactions, both intra- and inter-protomer. Because most of the introduced substitutions are expected to loosen specific interfaces, the absence of response of several BvgS variants to nicotinate is likely to be caused by conformations of the periplasmic domain insufficiently tense for negative signal transmission. A possible exception is BvgS_{T355C+D442C}, which might fail to bind nicotinate at all. Both positive and negative conformational signals necessarily transit through the C-terminal periplasmic loop and helix, a critical region maintained by a number of interactions.

Interestingly, the major interactions involved in positive signaling appear not to cross the symmetry axis of BvgS even though they occur between the two monomers. In contrast, negative signaling requires both interactions that cross and interactions that do not cross the symmetry axis (Fig. 5). It is thus conceivable that symmetric and asymmetric conformations represent distinct signaling states of the protein, as proposed for other systems ²⁸.

Altogether, thus, negative signaling appears to require more interactions than positive signaling. In addition, it is possible that some of the interactions required for positive signaling are also involved in negative signaling, which could not be tested. Our results thus support the model that the positive-signaling conformation of the periplasmic domain is moderately tense and imposes moderate tension to the transmembrane helices. The loss of activity incurred upon disrupting the proper connection between the periplasmic domain and pre-membrane helix supports this idea. Modulation increases the conformational tension of the periplasmic domain, which is maintained by a larger set of interactions (Fig. 5). Disruptions in this network prevent BvgS from adopting a high-tension, modulated conformation normally induced by nicotinate. In the BvgS family, the segments through and below the membrane are predicted to form α -helices that most likely prolong the last periplasmic helix. The switch from the positive- to the negative-signaling conformation must imply relative rotation, translation or shearing movements of these helices, similar to what has been proposed for other types of two-component systems ^{27,29,30}. The basic mechanism that we propose could apply to systems homologous to BvgS. It is compatible with the reverse scenario of an inactive sensor-kinase in the basal state – which is thought to be the case for many two-component systems –, and an increased tension induced by a positive stimulus.

Interestingly, although nicotinate binds to VFT2, two-way cross-talk between VFT1 and VFT2 is involved in negative signaling. Because VFT2 is highly constrained in the dimeric structure, nicotinate binding might generate limited conformational changes to VFT2 rather than cavity opening. This is supported by the phenotypes of the variants harbouring intra-VFT2 disulfide bonds, which are not expected to undergo large clamshell motions. Thus, nicotinate binding distorts the VFT2 conformation and/or dynamics in such a manner as to eventually impact on the transmembrane helix, and the propagation of these changes implies VFT2-VFT1 interfaces. A function of VFT1 might thus be to amplify these changes in conformation and dynamics to allow for transmission. It is conceivable that in addition to participating to signal transduction, VFT1 binds its own ligands *in vivo*. This would be consistent with the conservation of the VFT1 cavity residues in BvgS in *Bordetella* ²⁴. Our data would then argue in favour of negative stimuli, because VFT1 cavity closing inactivates BvgS.

Other VFT-containing receptor proteins have been described, both bacterial³¹ and eukaryotic (e.g. iGluR,¹¹). Remarkably, BvgS represents a very different structural paradigm (Fig. S6). In the AMPA receptor structure, however, interfaces between the distinct VFT1 and VFT2 ‘layers’ are limited. VFT2 is the major ligand-binding site of iGluRs and undergoes clamshell-like opening and closing motions. VFT1 serves for allosteric regulation, with the dimeric interfaces between VFT2s and the linkers between VFT1 and VFT2 and between VFT2 and the transmembrane domains all playing important roles for the channel-gating process^{11,22}. In the case of BvgS, those linkers do not appear to be involved in the signaling mechanisms, and the interfaces between VFT2s are extremely limited. Moreover, iGluRs and BvgS differ by the nature of their VFT1 domains. Thus, in contrast with BvgS, those of AMPA receptors are class 1 VFTs, with hinges formed by 3 crossings between the lobes, placing the N- and C-termini in lobes 1 and 2, respectively. These structural constraints must also entail distinct signaling mechanisms. That the structure-function model for BvgS is so different from that of iGluRs emphasizes the versatility of the VFT module for building signaling proteins.

On-line Methods

Production of BvgS

The sequence coding for the periplasmic portion of BvgS (*BP_1877*) was amplified by PCR from genomic DNA of *B. pertussis Tohamal* using the following oligonucleotides as primers: BvgS^P_{GB1-UP} 5’-TAGGATCCGCGCAGGCAAGCCAG-3’ and BvgS^P_{GB1-LO} 5’-TACTCGAGGTAGATCTCGTTGCGGTAGGC-3’. The amplicon was inserted into PCR@II-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. *bvgS* was then cut as a *Bam*HI-*Xho*I fragment from the recombinant TOPO plasmid and introduced into the corresponding sites of pGEV2³². The resulting pGEV2-BvgS plasmid encodes the periplasmic portion of BvgS (BvgS^P) (Ala₂₉-Leu₅₄₄) with an N-terminal GB1 and a C-terminal His tag. The numbering starts at the initiator Met.

The recombinant protein was produced in *E. coli* HMS174(DE3). A 50-ml overnight LB medium culture supplemented with 100 µg/ml ampicillin (LB-Amp₁₀₀) was used to inoculate 1 liter of LB-Amp₁₀₀; the culture was incubated at 37°C in a rotary shaker at 220 rpm. Transcription of recombinant BvgS^P was induced at an OD₆₀₀ of 0.8 by adding 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). After 3 h of incubation under the same conditions, the cells were harvested by centrifugation at 8,000 g for 20 min at 4°C. Cell pellets were resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole (binding buffer) with 5 µg/ml of DNase I (Sigma) and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche).

Cells were disrupted by three passages in a French pressure cell, and the bacterial debris was removed by centrifugation for 20 min at 20,000 g. The supernatant was loaded onto a Ni²⁺-Sephacrose affinity column (GE Life Sciences) pre-equilibrated with the binding buffer. Two washing steps were performed using 10 mM and 75 mM of imidazole, followed by elution with 200 mM imidazole in the binding buffer. The protein solution was conserved in 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM NaCl and 200 mM imidazole. Purification was carried out at 4°C.

Crystallization of BvgS^P

Purified BvgS^P was concentrated using a stirred ultrafiltration cell (10 kDa membrane, Amicon-Millipore, Billerica, MA). Protein purity, estimated to be 95%, was assessed by SDS-PAGE and staining of the gel with Coomassie brilliant blue. Initial crystallization screening was carried out using the sitting-drop, vapor-diffusion technique in 96-well microplates. Trays were set using a Cybi-Workstation (Cybio) and commercial crystallization kits (Nextal-Qiagen and JBSscreen kits). The drops were set up by mixing equal volumes (0.5 μ l) of the protein and the precipitant solutions equilibrated against 75 μ l of the precipitant solution. In all trials, the protein concentration was 20 mg/ml. The best crystals were obtained at 19°C by manual refinement with the following crystallization solution (adapted from Nextal-Qiagen CationSuite kit condition #52): 100 mM sodium acetate (pH 4.6) and 1.6 M NaCl. Large, extremely fragile crystals grew to their final size in five to seven days. All manual crystallization attempts were carried using the hanging-drop, vapor-diffusion technique in 24-well plates. The drops were set up by mixing equal volumes of the protein and the precipitant solutions equilibrated against 500 μ l of the precipitant solution. Before collecting the diffraction data, crystals were stepwise soaked in the crystallization solution containing increasing concentrations of glycerol to a final concentration of 20%.

Crystallographic data collection and processing

Because the crystals had a very poor diffraction quality (diffraction range from 8 to 3 Å), a preliminary diffraction screening was performed on 80 crystals. On the best crystal, diffracting at 3.10 Å, a single diffraction dataset (160 images) could be collected at a temperature of 100 K using an in house Mar345dtb detector with an oscillation range of 1°. Diffraction images were indexed using the Xds program package³³. The crystal belongs to the orthorhombic primitive space group P2₁2₁2₁, with cell dimensions a = 72 Å, b = 120 Å and c = 286 Å and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

Structure determination and refinement

Phasing was done by molecular replacement using MOLREP program version 11.0³⁴ for an automated multi-copy searching in the asymmetric unit. The crystallographic structure of the VFT2 domain (PDB code: 3MPK) was used as a search model. Manual model building and refinement of the 3.10 Å structure were conducted iteratively using Coot³⁵ and phenix.refine, with the use of local non-crystallographic symmetry restraints.

Torsion angle optimization of the structure was performed by using the Godzilla web server (<http://godzilla.uchicago.edu/>)³⁶. The structure was refined to final Rwork of 20.1 % and R_{free} of 25.45 %. The N-terminal GB1 tag of BvgS^P as well as the C-terminal His tag are not visible in the electron density maps, nor are the last five BvgS residues at the C-terminus. Crystal packing shows an empty space close to the N-terminal segment of each chain, indicating that the GB1 domain might be unseen in the electron density map because it is not involved in order and crystal symmetry. In each homodimer, non-protein densities are present in hydrophobic pockets formed of W₅₃₅ from one chain and Y₄₆₈, Y₄₆₉, Y₄₇₃ and W₅₂₅ from the other.

Coordinates of *B. pertussis* periplasmic region of BvgS will be deposited in the Protein Data Bank.

Structure analyses

The interfaces between domains were defined using the PDBePISA software (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html). According to PISA, dimerization is an authentic feature of BvgS. The surface values given in the text for the interfaces were calculated by PISA and the H bonds and salt bridges were listed for each interface. The following website: <http://capture.caltech.edu/> was used to identify the cation-Pi interactions. Most interactions were found in both dimers of the asymmetric unit.

Determination of secondary structures

The opening angles of the VFT domains were determined by defining one residue on the lip of lobe 1, one in the hinge between the lobes and one on the lip of lobe 2 for each VFT. The angle formed between the vectors defined by the α carbons of residues 2 and 1 and the α carbons of residues 2 and 3, respectively, was thus determined. The sequence positions of these residues are Tyr70, Gly244 and Ser199, and Leu314, Val391, and Pro444 for VFT1 and VFT2, respectively.

The Modeller 9v8 software ³⁷ was used to obtain a model for the closed VFT1 domain on the basis of its closest homologue, the liganded *E. coli* Gln-binding protein (pdb code: 1WDN).

Illustrations were made using PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger).

For the introduction of the disulfide bonds, residues to be replaced by cysteines were chosen by using the Disulfide by Design Version 1.2 software (<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD/>) ³⁸.

Construction of mutant *Bordetella* strains

Selected residues were replaced by directed mutagenesis using overlapping PCR. The procedure was as described in ²⁴. Briefly, the desired mutations were introduced into the relevant DNA fragment, and after verification of the sequence, the mutated fragment was exchanged for its wild type counterpart in a plasmid that contains most of the *bvgAS* operon in tandem restriction cassettes ²⁴. The mutations were introduced into the chromosome of BPSM Δ *bvgAS*, a Tohama I derivative harboring a large deletion in *bvgAS* operon, by using allelic exchange. Finally a *ptx-lacZ* transcriptional fusion was generated in each of the recombinant strains. Of note, the BvgS sequence corresponds to that of *Tohama I* except that a Glu residue is found at position 705, as in most other *B. pertussis* strains ²⁴. For BvgS variants showing no activity of the *ptx-lacZ* fusion, the reporter gene was also introduced into another, more sensitive Bvg-regulated gene, *fhaB* ³⁹, allowing detection of low levels of activity.

Measurement of BvgS activity using β -galactosidase reporter

The strains were grown in modified Stainer-Scholte medium (SS) ⁴⁰ containing 100 μ g/ml streptomycin and 10 μ g/ml gentamycin. After 24 h growth at 37°C under rotating agitation (220 rpm), the bacterial suspension was used to initiate cultures in 10 ml of SS medium non supplemented or containing 1 to 8 mM of nicotinate for negative modulation. 3 to 10 mM of reducing agent TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) (SIGMA) was added when required for

analysis of the SS-bond-containing variants. We checked that TCEP does not affect the activity of wt BvgS or its response to nicotinate modulation. The inoculation volume was adapted to compensate for slower growth in the presence of high concentrations of nicotinate and/or TCEP. The bacteria were grown until the cultures reached an OD₆₀₀ of 1.5, harvested by centrifugation, resuspended to an OD₆₀₀ of 5 and broken by using a Hybaid Ribolyser apparatus for 30 s at speed 6 in tubes containing 0.1 mm silica spheres as the lysing matrix. β -galactosidase activities were calculated as described⁴¹. The experiments were performed in triplicate. Note that in this work we did not determine the effect of sulfate on BvgS activity for the variants proteins, because its site of action is unknown, and therefore the effects of the substitutions cannot be interpreted.

Detection of inactive BvgS variants

For the mutants lacking BvgS activity, the production of the recombinant protein was verified by immunoblotting of *B. pertussis* membrane extracts using anti-BvgS polyclonal antibodies. Detection of the BvgS variant indicated that the introduced substitution(s) generated no major structural defect that might cause BvgS to misfold and be degraded intracellularly.

Acknowledgments

We thank Sean Crosson, Esmael Haddadian, Tobin Sosnick and other members of the Crystallography group in Chicago for help and advise on the Godzilla software, and Alex Wohlkönig for crystallogensis attempts. Elian Dupré has been supported by a French Research Ministry predoctoral grant and by a grant from the Fonds pour la Recherche Médicale (FRM). René Wintjens is Research Associate at the National Fund for Scientific Research FNRS-FRS (Belgium)

Bibliography

1. Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215 (2000).
2. Hoch, J.A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **2**, 165-170 (2000).
3. Bekker, M., Teixeira de Mattos, M.J. & Hellingwerf, K.J. The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci Prog* **89**, 213-42 (2006).
4. Wuichet, K., Cantwell, B.J. & Zhulin, I.B. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* **13**, 219-25 (2010).
5. Ulrich, L.E. & Zhulin, I.B. MiST: a microbial signal transduction database. *Nucleic Acids Res* **35**, D386-90 (2007).
6. Barakat, M., Ortet, P. & Whitworth, D.E. P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res* **39**, D771-6 (2011).
7. Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 763-71 (2010).
8. Kristensen, A.S., Geballe, M.T., Snyder, J.P. & Traynelis, S.F. Glutamate receptors: variation in structure-function coupling. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 65-9 (2006).
9. Felder, C.B., Graul, R.C., Lee, A.Y., Merkle, H.P. & Sadee, W. The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci* **1**, E2 (1999).
10. Furukawa, H., Singh, S.K., Mancusso, R. & Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**, 185-92 (2005).
11. Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P. & Gouaux, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* (2009).
12. Jacob-Dubuisson, F., Wintjens, R., Herrou, J., Dupré, E. & Antone, R. BvgS of pathogenic *Bordetella*: a paradigm for sensor kinase with Venus Flytrap perception domains. in *Two-component system in bacteria* (ed. Beier, R.G.a.D.) 57-83 (Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2012).
13. Hewlett, E.L. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr Infect Dis J* **16**, S78-84 (1997).
14. Cotter, P.A. & Jones, A.M. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* **11**, 367-73 (2003).
15. Mattoo, S., Foreman-Wykert, A.K., Cotter, P.A. & Miller, J.F. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front. Biosci.* **6**, E168-186 (2001).
16. Melton, A.R. & Weiss, A.A. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**, 807-15 (1993).
17. Oh, B.H. et al. Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* **268**, 11348-11355 (1993).
18. Bjorkman, A.J. & Mowbray, S.L. Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change. *J Mol Biol* **279**, 651-664 (1998).
19. Trakhanov, S. et al. Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine

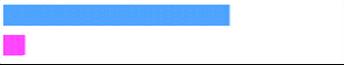
- transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* **44**, 6597-608 (2005).
20. Quioco, F.A. & Ledvina, P.S. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* **20**, 17-25 (1996).
 21. Herrou, J. et al. Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17351-5 (2010).
 22. Gielen, M. et al. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57**, 80-93 (2008).
 23. Blanke, M.L. & VanDongen, A.M. Constitutive activation of the N-methyl-D-aspartate receptor via cleft-spanning disulfide bonds. *J Biol Chem* **283**, 21519-29 (2008).
 24. Herrou, J. et al. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* **4**, e6996 (2009).
 25. Beier, D., Schwarz, B., Fuchs, T.M. & Gross, R. In vivo characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **248**, 596-610 (1995).
 26. Perraud, A.L. et al. Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys Acta* **1478**, 341-54. (2000).
 27. Airola, M.V. et al. Architecture of the Soluble Receptor Aer2 Indicates an In-Line Mechanism for PAS and HAMP Domain Signaling. *J Mol Biol* **425**, 886-901 (2013).
 28. Moore, J.O. & Hendrickson, W.A. An asymmetry-to-symmetry switch in signal transmission by the histidine kinase receptor for TMAO. *Structure* **20**, 729-41 (2012).
 29. Gao, R. & Lynn, D.G. Integration of rotation and piston motions in coiled-coil signal transduction. *J Bacteriol* **189**, 6048-56 (2007).
 30. Lowe, E.C., Basle, A., Czjzek, M., Firbank, S.J. & Bolam, D.N. A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7298-303 (2012).
 31. Sonnenburg, E.D. et al. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* **141**, 1241-52 (2010).
 32. Huth, J.R. et al. Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Sci* **6**, 2359-2364 (1997).
 33. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-32 (2010).
 34. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-5 (2010).
 35. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
 36. Haddadian, E.J. et al. Automated real-space refinement of protein structures using a realistic backbone move set. *Biophys J* **101**, 899-909 (2011).
 37. Sali, A. & Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**, 779-815 (1993).

38. Dombkowski, A.A. Disulfide by Design: a computational method for the rational design of disulfide bonds in proteins. *Bioinformatics* **19**, 1852-3 (2003).
39. Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *Embo J* **10**, 3971-5 (1991).
40. Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, Y. & Sato, H. Heptakis (2,6-O-dimethyl)beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J Clin Microbiol* **17**, 781-786 (1983).
41. Antoine, R. et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **182**, 5902-5905 (2000).

Table 1. Data collection and refinement statistics

Data collection	Native
Wavelength (Å)	1.5418
Anode, detector	Cu, Mar345dtb
Resolution range (Å)	19.99 - 3.1 (3.18-3.10)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell parameters (Å)	72.46, 285.82, 128.15
Completeness (%) 99.0 (95.6)	99.0 (95.6)
I/σI	11.02 (2.76)
Rmeas (%)	21.9 (71)
Nr of reflections	344517 (48335)
Nr of unique reflections	53893 (8178)
Refinement	
Resolution range (Å)	19.9- 3.1
Nr of reflections	49795
Rfactor (%)	20.12
Rfree (%)	25.45
Model statistics	
B factor analysis All (Å ²)	44
RMSD from ideal	
Bond angles (°)	1.477
Bond length (Å)	0.016
Ramachandran analysis	
Preferred (%)	92.3
Disallowed (%)	2.3

Table 2. In vivo effects of substitutions in the VFT domains

Substitutions	Targeted interaction	Activity
Wt protein		
E113C+N177C	SS bond in VFT1 (intra)	nd a
L316C+S445C	SS bond in VFT2 (intra)	 a
T355C+D442C	SS bond in VFT2 (intra)	 a
Y81A+E86A	VFT1 L1 - VFT2 hinge (inter)	nd
E200A	VFT1 L2 - VFT2 hinge (inter)	nd
Q463A	VFT1 L2 - VFT2 L2 (inter)	
N231A	VFT1 L2 - C dom (inter)	
R234A	VFT1 L2 - VFT2 L1 (intra)	 b
F230A+S287A	VFT1 L2 - VFT2 L1 (intra)	
S271A+E272A +R274A+S275A	VFT1 - VFT1 (inter)	 b
S271C	VFT1 - VFT1 (inter)	 a
R472A	VFT2 L2 - C dom (inter)	
Y473A	VFT2 L2 - C dom (inter)	
R324G+T325G +D326G+E327G	VFT2 L1 - C dom (inter)	
R526A	VFT2 L2 - C dom (intra)	
W535A	VFT2 L2 - C dom (inter)	nd

Intra and inter represent intra- and inter-chain interactions, respectively.

Blue bars represent the mean activity of three distinct experiments carried out in absence of modulator. Pink bars represent the mean activity of three distinct experiments carried out in presence of 8 mM of nicotinic acid. All bars are on scale.

nd: Mutant having no detectable activity while BvgS is produced.

a: A treatment with the reducing agent TCEP leads to recovery of activity and/or modulation.

b: A considerable decrease in activity is measured in presence of 20 mM of nicotinic acid, indicating a poorly responsive rather than a non-responsive phenotype.



Figure 1 Crystal structure of the periplasmic domain of BvgS shown in cartoon mode. Monomer A is shown in different shades of blue and monomer B in different shades of red, representing VFT1, VFT2 and the Ct domain.

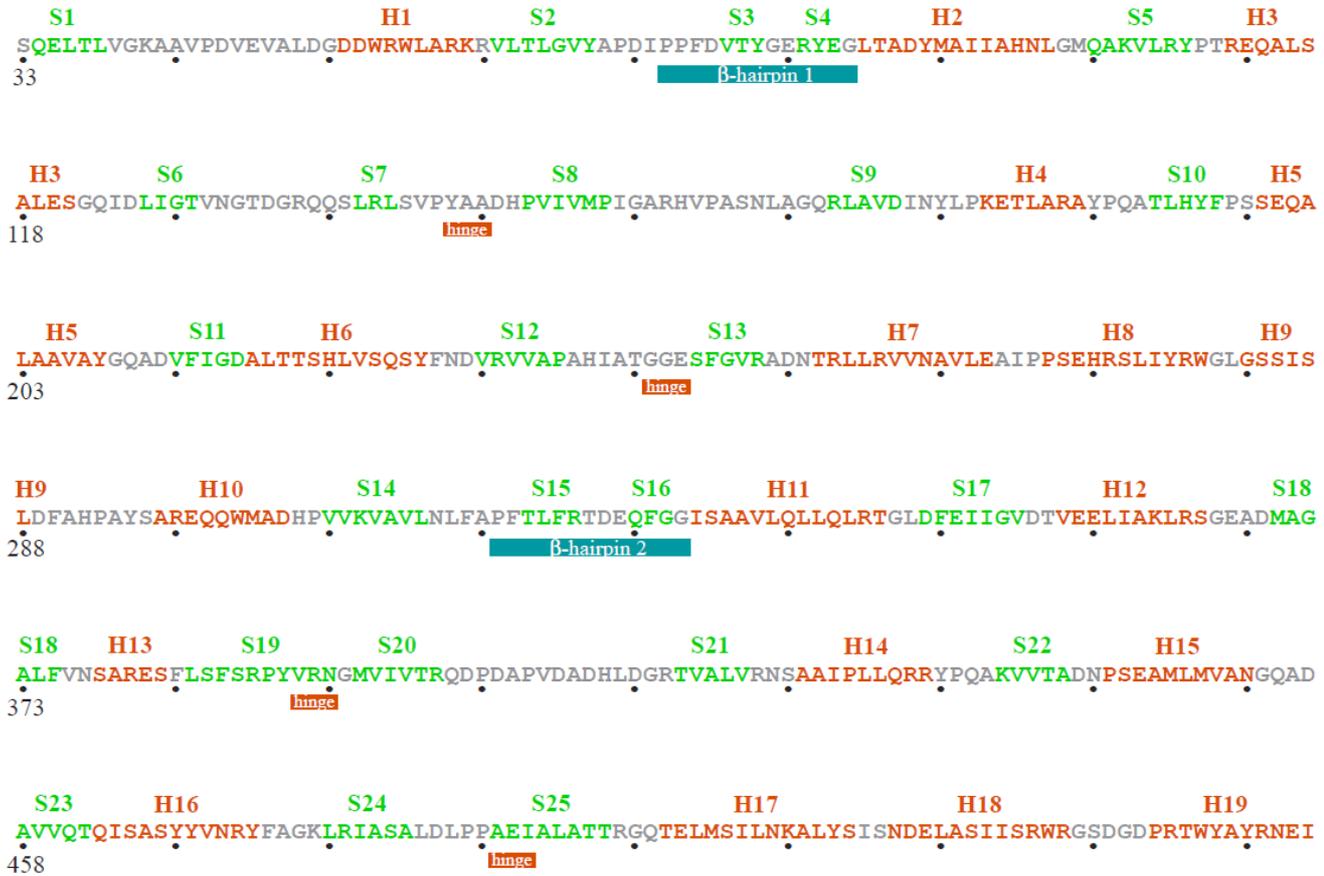


Figure 2 Sequence of the periplasmic domain of BvgS and secondary structure elements. α -helices are colored red and β -strands green.

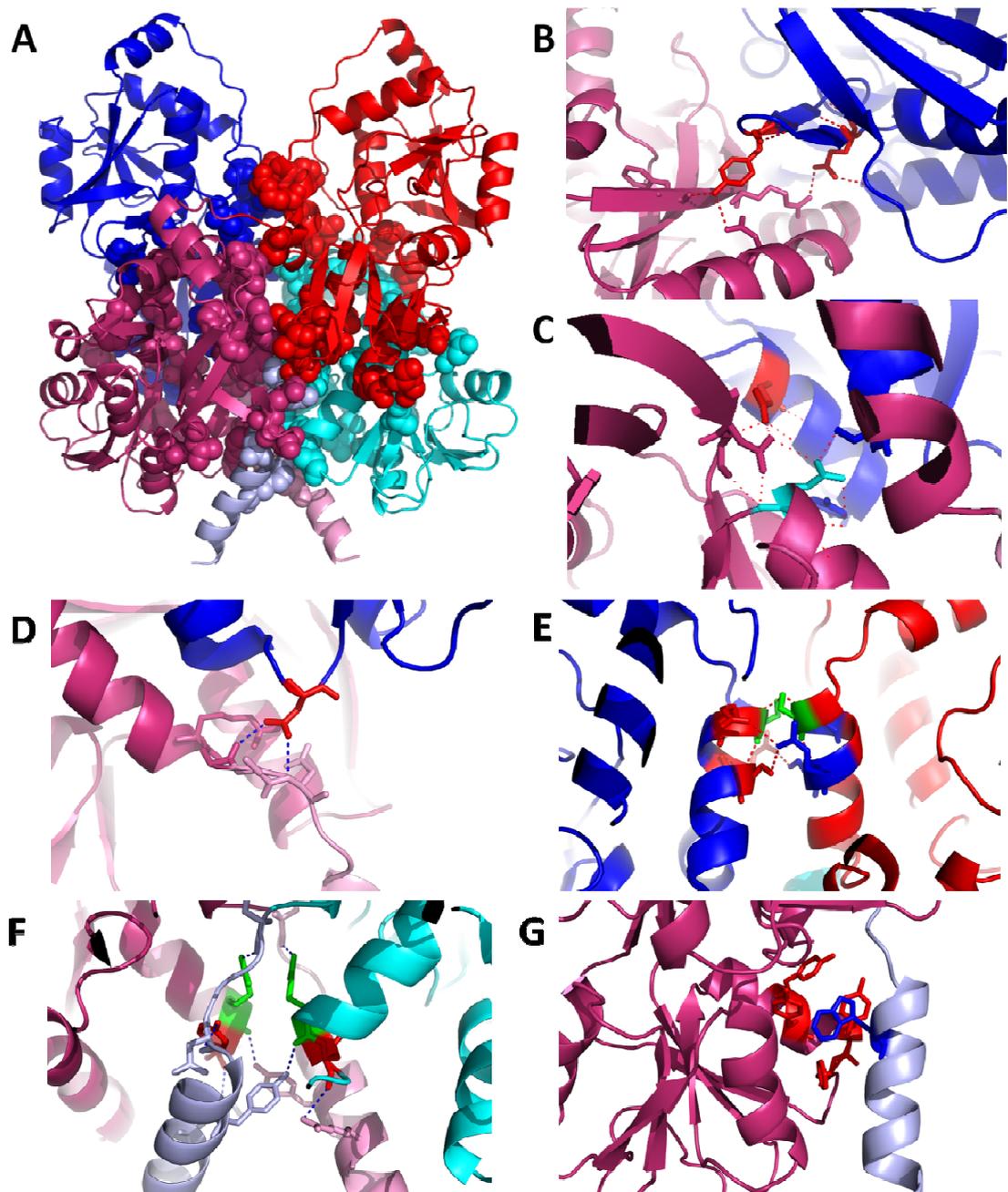


Figure 3 Interfaces in the BvgS dimer. A. The spheres represent the residues involved in the total dimeric interface, emphasizing its extent. B to G. Close-up views of specific inter-monomer interactions, with interacting residues shown as sticks and polar contacts (H bonds) shown as discontinuous lines. B. Interactions between the β hairpin of VFT-L1 (Y₈₁ and E₈₆, in red) and VFT2-L2 (toward the S19 hinge β strand and H17). C. Interactions between VFT1-L2 and VFT2-L2. E₂₀₀ (in red) mediates interactions between H5 and the S19 hinge β strand, and Q₄₆₃ (in cyan) mediates interactions between H16 and H6. D. Direct interactions between VFT1-L2 (N₂₃₁ in red, located in the H6-S12 loop) and the Ct loop of VFT2. E. Interactions between the H8 helices of the VFT1s. S₂₇₁ is shown in green. F. Interactions between VFT2 (R₄₇₂ and Y₄₇₃ from H16, in green and red, respectively) and the Ct domain. Both intra- and inter-monomer interactions are shown in this panel, to convey a sense of the strong connectedness of this region. G. Representation of W₅₃₅ (in blue), connecting H19 to VFT2-L2 of the opposite monomer through possible pi-stacking interactions with different aromatic residues (in red).

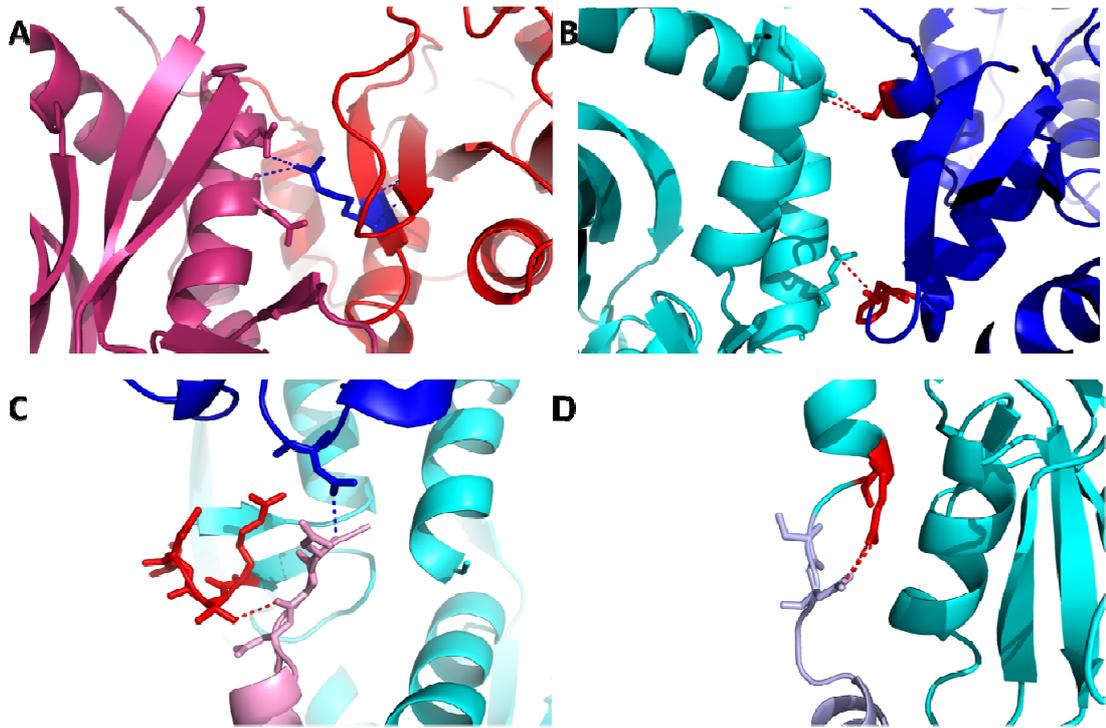


Figure 4 Close-up views of intra-protomer interactions, with specific residues shown as sticks and their polar contacts shown as discontinuous lines. A. Interactions between VFT1-L2 (R₂₃₄ from S12, in blue) and H11 of VFT2-L1. B. Interaction between VFT1-L2 (F₂₃₀ in the H6-S12 loop and S₂₈₇ in H9, both in red) and VFT2-L1 through H11 (top) and H18 (bottom). Note that F₂₃₀ forms a cation-pi interaction with R₅₂₄ (figured as a discontinuous line). C: Interaction between the VFT2 β-hairpin (R₃₂₄, T₃₂₅, D₃₂₆, E₃₂₇, in red) and the Ct domain. The inter-protomer interaction between N₂₃₁ (in blue) and the Ct-domain is figured as a reminder. D: Interaction between H18 of VFT2 (R₅₂₆ in red) and the Ct-loop of the same protomer.

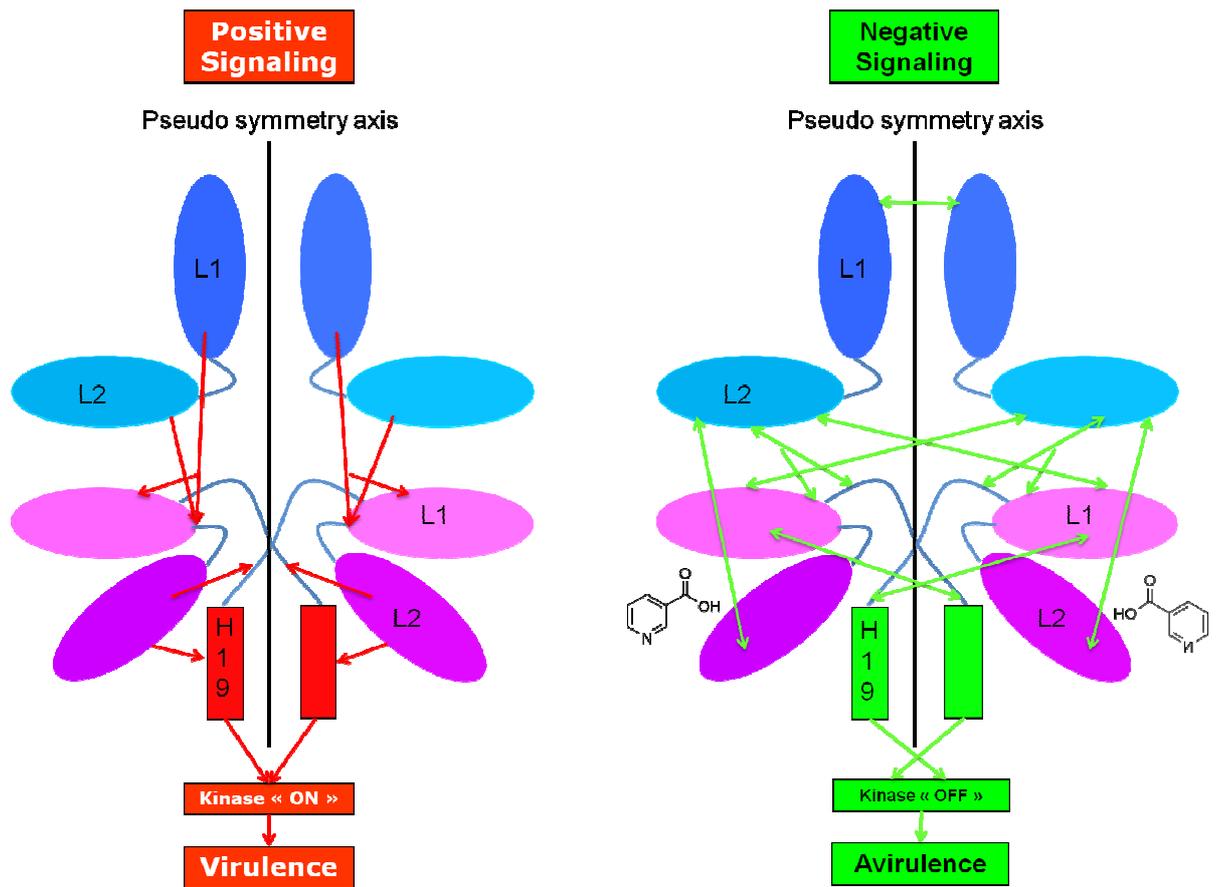


Figure 5 Schematic representation of the signaling mechanisms. VFT1s are represented in blue and VFT2s in pink. The respective positions of the L1 and L2 lobes of the two VFTs are specified in one of the monomers. (The linkers between VFT 1 and 2 are not represented as they are not involved in signaling). The VFT hinges are represented by blue lines, as are the Ct loops (note that the latter are not drawn to scale). H19 is shown as red and green rectangles to represent its positive and negative signaling conformations, respectively. Positive signaling is shown in the left-hand drawing, and the major interactions involved are figured by red arrows. Transmission appears to be an essentially one-way mechanism in this case. Negative signaling induced by nicotinic acid (represented under its molecular form) is represented in the right-hand drawing. Double-sided arrows represent interactions needed for negative signaling, but they have not been oriented because our data suggest a more complex, two-way signaling pathway. The inter-chain connections between H19 and VFT2-L2 mediated by W₅₃₅, and other interactions needed for positive signaling are not represented but might be required as well for transmission of the negative signal.

Supplementary figures

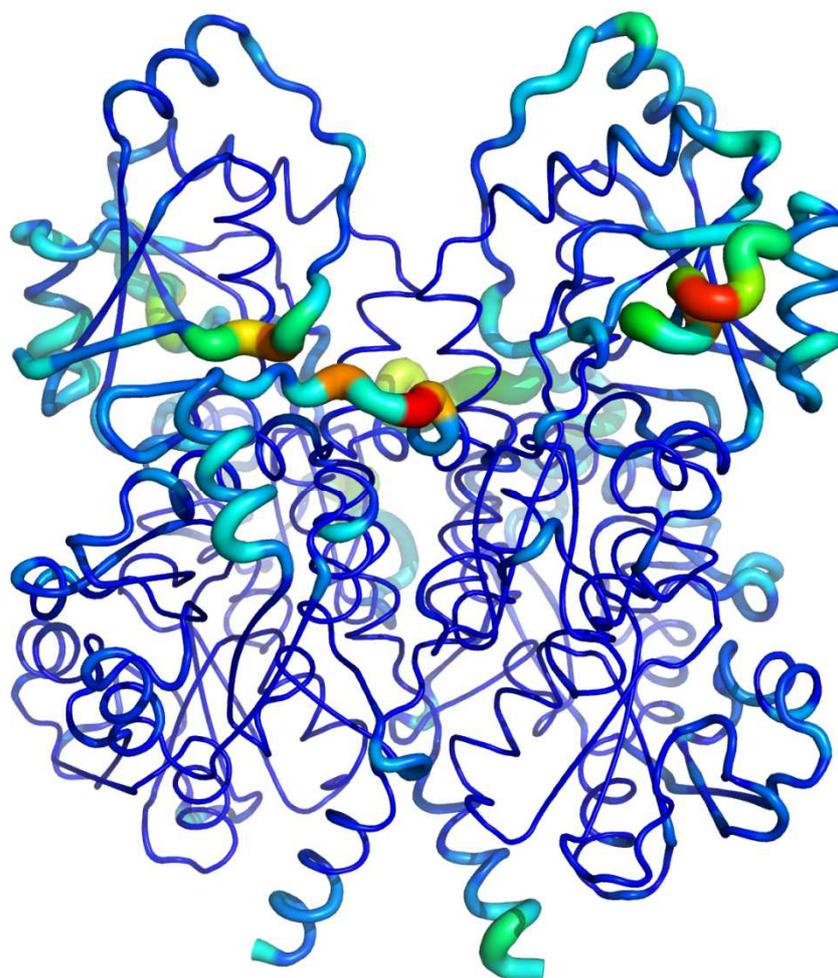


Figure S1 Representation of the B factors of the dimer. Low and high B factors are represented by thin blue elements and thick red elements, respectively.

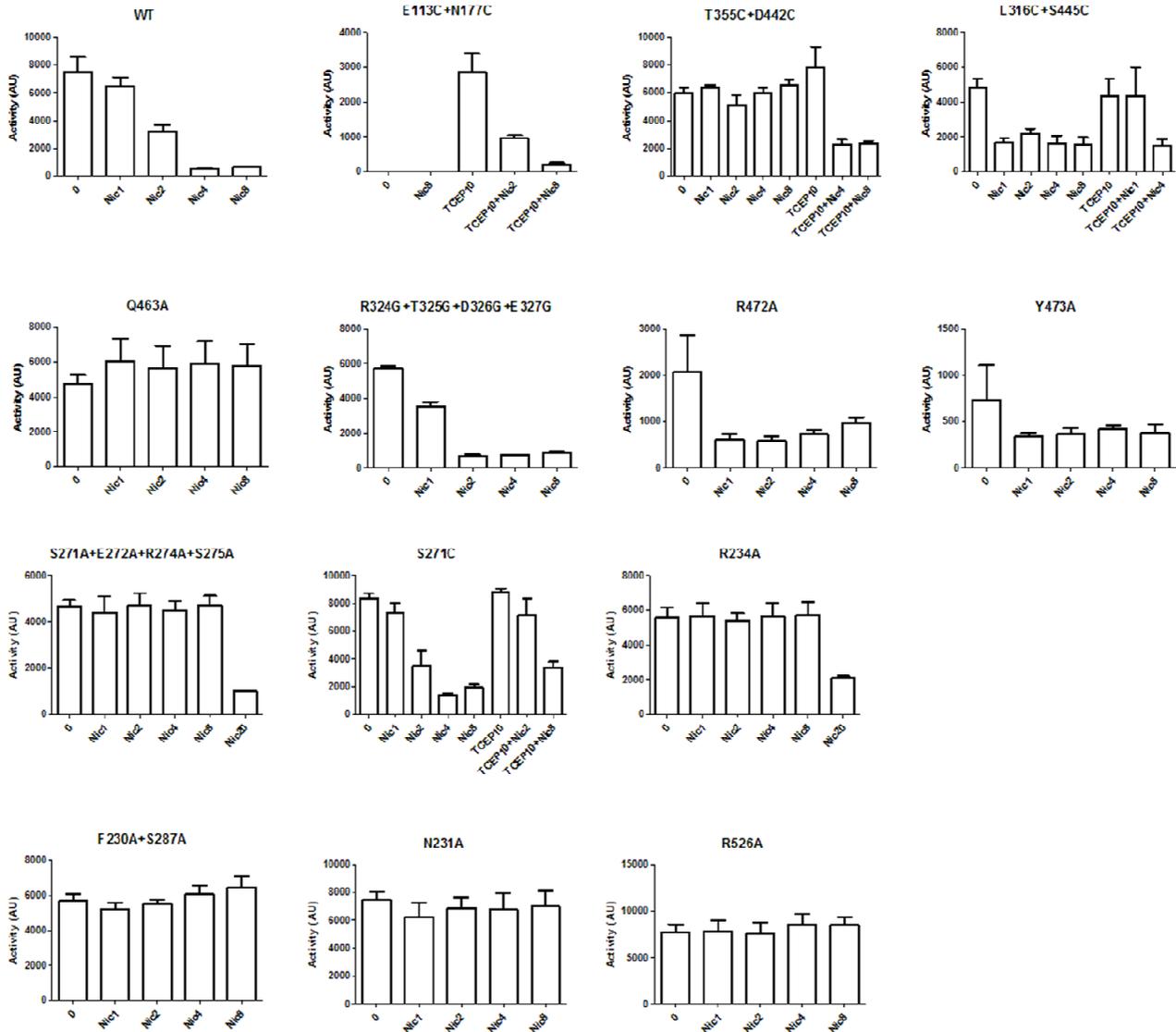


Figure S2 β -galactosidase activities in arbitrary units (AU) showing the activity of the pertussis toxin promoter in the different strains grown under various conditions. NicX stands for the addition of nicotinic acid at X mM to the culture medium. TCEP10 represents the addition of this reducing agent to the culture medium at 10 mM. WT : Wild type strain (Tohamal K705E)

Figure S3

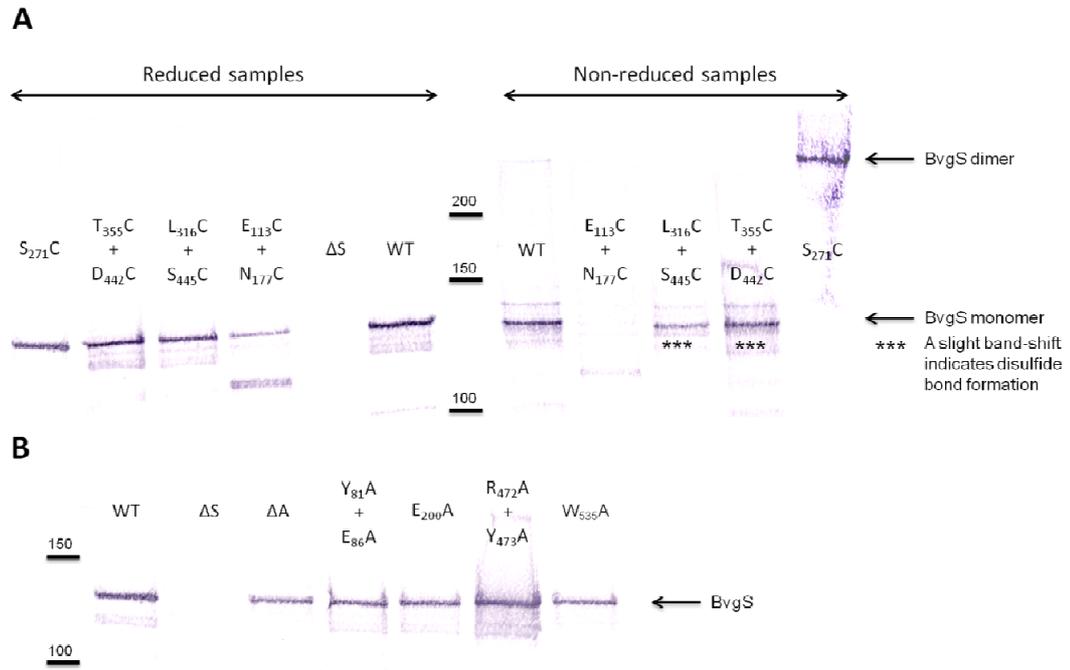


Figure S3 Detection of specific BvgS mutants in membrane extracts of *B. pertussis*. A. Western blot analysis of cysteine-containing BvgS after SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions. B. Western blot analysis of the avirulent BvgS mutants. WT : Wild Type strain, ΔS : Mutant harboring a deletion of *bvgS*, ΔA : Mutant harboring a deletion of *bvgA*.

Figure S4

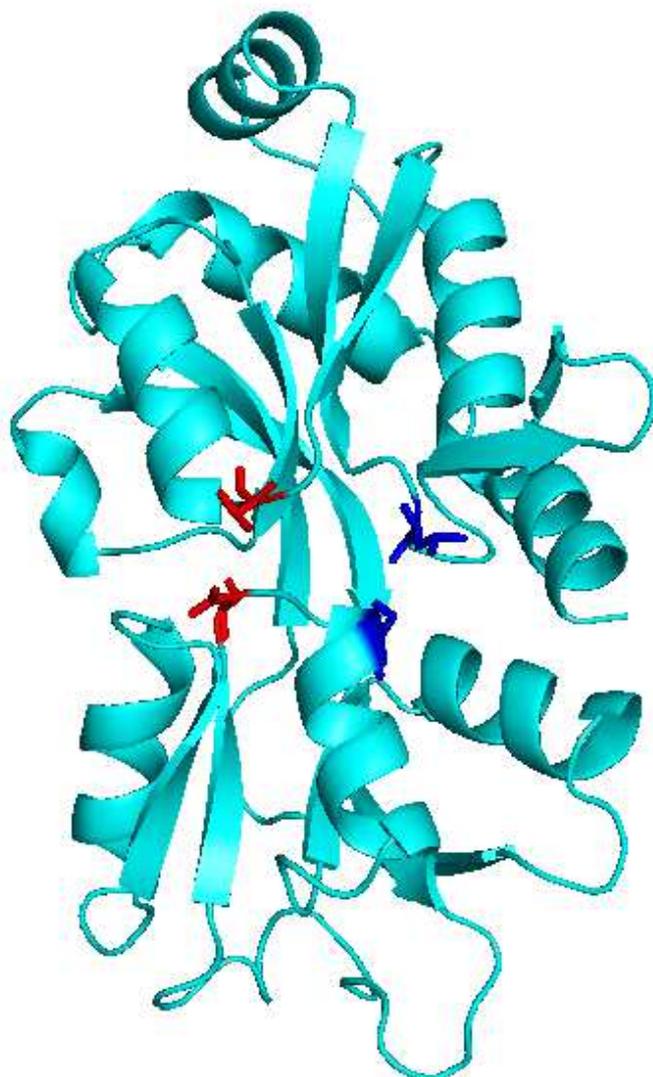


Figure S4 Illustration of the two pairs of residues used to maintain VFT2 in closed conformation by disulfide bond formation. L₃₁₆ and S₄₄₅ are shown in blue, T₃₅₅ and D₄₄₂ are shown in red, in the VFT2 domain from the A monomer.

Figure S5

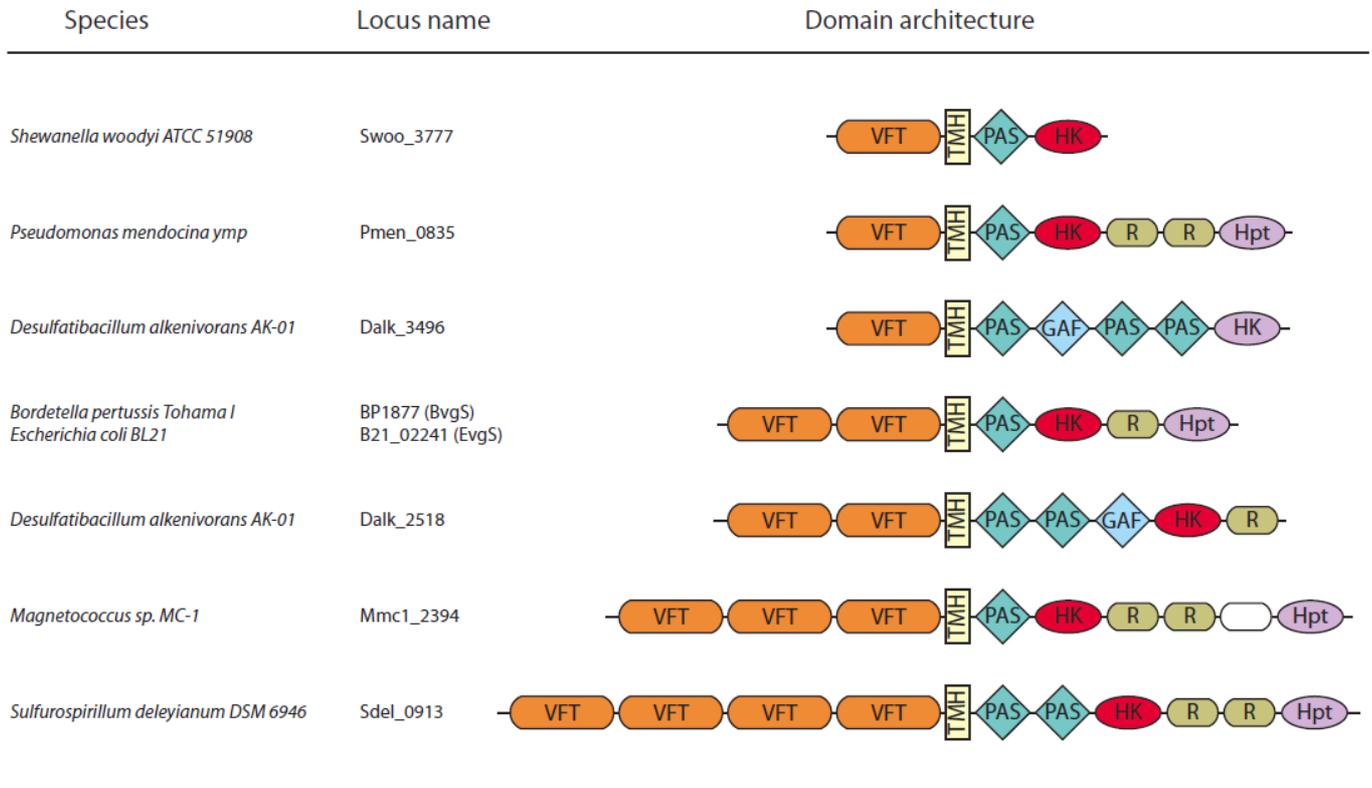


Figure S5 Representation of different sensor-kinases harboring VFT domains in their periplasmic portions. VFT: Venus Flytrap domains, TMH: predicted Transmembrane Helices, PAS: Per/Arnt/Sim domains, GAF: GAF domains, HK: Histidine-kinase domains, R: Receiver domains, HPT : Histidine-Phosphotransfer domain. An open box represents an uncharacterized domain.

Figure S6

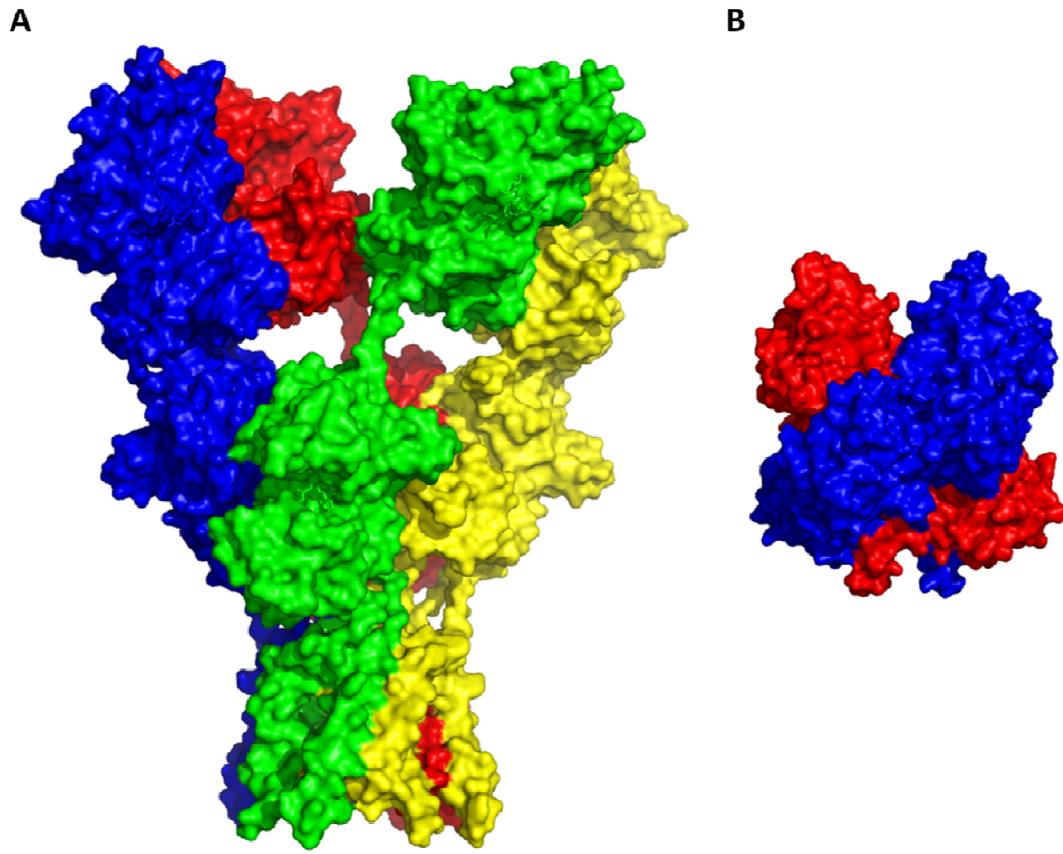


Figure S6 Surface representation of AMPA receptors (A, PDB code 3KG2) and the BvgS periplasmic moiety (B). Each monomer is represented in its own color, both proteins are shown at the same scale.

b. Résumé

Dans cet article, nous décrivons la structure inédite de la portion périplasmique de BvgS (Fig. 1) et l'organisation dimérique originale des domaines VFT. En effet, les domaines VFT de BvgS s'organisent en un dimère très imbriqué, de type hélicoïdal, définissant de larges interfaces entre les 4 VFTs. Les domaines VFT2 sont fermés, sans ligand, avec une structure très proche de celle observée pour le domaine isolé, tandis que les domaines VFT1 sont ouverts. Les différents éléments structuraux sont représentés en figure 2 pour référence dans le texte.

Nous avons donc induit la fermeture artificielle de chacun de ces domaines par formation d'un pont disulfure entre leurs deux lobes afin de définir si les formes, respectivement ouverte de VFT1 et fermée de VFT2, correspondent à la conformation active de BvgS. La fermeture du VFT1 entraîne l'avirulence alors que la fermeture du VFT2 maintient l'activité basale de BvgS, laissant supposer que la conformation de ces domaines dans la structure cristallographique représente bien la forme active de ces domaines, soit de signalisation positive. Notons que cette forme active semble indépendante de la présence d'un ligand dans la cavité de l'un ou l'autre des VFT. Par ailleurs, le résidu W₅₃₅ (décrit en VII.A.2.), qui est positionné sur l'hélice H19 et qui forme plusieurs interactions de type pi stacking avec des résidus aromatiques de VFT2 de l'autre monomère, est vraisemblablement critique pour la transmission de signaux depuis les domaines périplasmiques au travers de la membrane. En effet, la substitution de ce résidu par une alanine génère un mutant avirulent. Ceci est en adéquation avec la nécessité d'un message positif provenant du périplasma pour le maintien de l'activité kinase.

Nous nous sommes alors particulièrement intéressés au rôle des interfaces dans la transduction de signal par les domaines VFT. Ces interfaces se font au sein d'un même monomère (intra-chaîne), ou entre les deux monomères (inter-chaînes)

La plus grande interface dimérique est située entre le domaine VFT1 d'un monomère et le domaine VFT2 de l'autre (Fig. 3). Ainsi, la perturbation des interfaces inter-chaînes entre les domaines VFT 1 et 2 au niveau des résidus Y₈₁, E₈₆ et E₂₀₀, génère des mutants avirulents, indiquant l'importance des interactions maintenues par ces résidus. BvgS étant détecté dans des extraits membranaires de ces souches mutantes, les interactions perdues n'empêchent pas la bonne localisation de la protéine et ne perturbent pas sa conformation ce qui aboutirait à une protéolyse cellulaire. BvgS reste donc vraisemblablement structuré en absence de ces interactions. En revanche, on peut conclure que cette zone d'interface est cruciale au maintien d'un message positif périplasmique. Cependant toutes les interactions inter-chaînes ne semblent pas indispensables, comme démontré par le maintien de la virulence dans certains autres mutants des différentes interfaces inter-chaînes (Q₄₆₃A, entre le domaine VFT1 d'un monomère et le domaine VFT2 de l'autre, et R₃₂₄G+T₃₂₅G+D₃₂₆G+E₃₂₇G, entre le domaine VFT2 d'un monomère et le domaine C-terminal de l'autre, Fig. S2). Un rôle de ces zones d'interfaces dans la transduction du signal négatif est envisageable au vu de la perturbation de la réponse aux modulateurs négatifs de mutants de ces résidus.

Au contraire, les interfaces entre les VFT 1 et 2 d'un même monomère sont limitées (Fig. 4). Ces interfaces intra-chaîne ne semblent pas importantes dans le maintien de l'activité kinase de BvgS, mais seraient impliquées dans la transmission de signaux négatifs, comme démontré par une perte de sensibilité aux modulateurs de la virulence de mutants dans lesquels ces interfaces sont perturbées (R₂₃₄A ou F₂₃₀A+S₂₈₇A, Fig. S2).

Une interface composée d'interactions majoritairement inter-chaînes, mais aussi intra-chaîne, se situe entre les domaines VFT2 et les domaines C-terminaux (domaines Ct, Fig. 3 et 4) comprenant l'hélice H19 et une boucle non structurée la reliant au domaine VFT2. Cette zone d'interface, particulièrement inter-chaînes, semble cruciale à la transmission d'informations des domaines périplasmiques au travers de la membrane. En effet, la perturbation des interactions entre l'hélice H16 du domaine VFT2 et le domaine Ct génère un mutant avirulent (R₄₇₂A+Y₄₇₃A). Le maintien partiel de l'activité dans les mutants simplement substitués (R₄₇₂A ou Y₄₇₃A, fig. S2) indique que cette zone critique d'interface serait stabilisée par des interactions partiellement redondantes. L'interface intra-chaîne semble beaucoup moins importante, mais possiblement impliquée dans la transmission du message négatif fourni par le nicotinate, comme indiqué par le phénotype du mutant R₅₂₆A.

Une interface se situe aussi entre les deux domaines VFT1 au travers de l'hélice H8. Elle serait impliquée en partie dans la transmission du signal négatif, comme démontré par une perte de sensibilité à la modulation du mutant S₂₇₁A+E₂₇₂A+R₂₇₄A+S₂₇₅A, déstabilisé dans cette interface. Ceci se confirme par la sensibilité légèrement accrue d'un mutant S₂₇₁C, stabilisant normalement cette interface par formation de pont disulfure entre les hélices H8 des domaines VFT1 (formation du dimère vérifiée par Western blot, fig. S3).

Le résidu N₂₃₁ est localisé dans une zone très importante et participe à la stabilisation de l'interface située entre le domaine VFT1 d'un monomère et la boucle du domaine Ct de l'autre monomère (Fig. 3D). La mutation de ce résidu en alanine génère un mutant virulent non modulable par les modulateurs chimiques. Ainsi, cette zone d'interface semble importante dans la transmission du signal négatif « nicotinate ».

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la forme dimérique des domaines VFT de BvgS. Le fonctionnement de ce dimère semble hautement dépendant des interfaces situées entre les domaines. Les interactions inter-chaînes semblent davantage impliquées dans le maintien de l'activité tandis que les interactions intra-chaîne semblent plus souvent importantes dans la capacité de transmission d'un signal négatif. En outre, nos données supportent la nécessité d'un message positif provenant du périplasma pour le maintien de l'activité kinase. Ce message pourrait provenir de la conformation particulière du dimère des domaines périplasmiques avec le VFT2 en forme fermée et le VFT1 en forme ouverte. La conformation du VFT1 semble particulièrement importante au message positif, mais il est aussi possible que sa mobilité contribue à donner le message positif.

Par ailleurs, bien que le nicotinate soit perçu au niveau du VFT2, des interactions entre les VFT 1 et 2, et même des VFT1 entre eux, ont un rôle dans la transmission du message négatif ainsi généré. Il y aurait donc une implication du VFT1 dans l'intégration du message négatif perçu par VFT2. De façon surprenante, deux mutants différents dans lesquels le VFT2 est

maintenu sous forme fermée par pont disulfure ont une sensibilité altérée aux modulateurs. L'un devient hypersensible à leur présence tandis que l'autre semble incapable d'y répondre. La formation du pont disulfure entre les résidus C₃₅₅ et C₄₄₂ (T₃₅₅C+D₄₄₂C) pourrait alors empêcher la fixation du nicotinate ou le changement de conformation du domaine VFT2 nécessaire à la transmission du message négatif « nicotinate ». La formation du pont disulfure entre les résidus C₃₁₆ et C₄₄₅ (L₃₁₆C+S₄₄₅C) aurait quant à elle un effet contraire, en favorisant la fixation du nicotinate ou le changement de conformation du domaine VFT2. La contrainte imposée par un pont disulfure ne doit permettre, dans tous les cas, que des changements conformationnels mineurs. On pourrait alors supposer que la perception du nicotinate ne génère qu'un changement mineur dans la conformation et/ou la dynamique du domaine VFT2 et qu'il serait répercuté sur le domaine VFT1, modifiant ainsi sa conformation et/ou sa dynamique, permettant alors le passage à l'état inactif de BvgS. Une étude de la dynamique de la portion périplasmique de BvgS serait sans doute un atout pour la compréhension des mécanismes de transduction du signal.

2. Résultats complémentaires

D'autres expériences ont été menées dans le but de la caractérisation des domaines VFT de BvgS et ne sont pas présentées dans l'article. Par exemple, le site de perception du sulfate de magnésium restant indéterminé, nous n'avons présenté que la modulation par le nicotinate agissant au travers du VFT2. D'autres souches mutantes ont aussi été construites mais non discutées précédemment. Ces résultats non mentionnés jusqu'ici seront donc discutés.

a. Modulation par le sulfate de magnésium

Des expériences de modulation des différentes souches mutantes par le sulfate de magnésium ont été menées. Les résultats sont présentés en figure 66.

Dans la majorité des cas, la capacité de modulation des différents mutants par le sulfate de magnésium est semblable à celle de l'acide nicotinique. Par exemple, le mutant S₂₇₁A+E₂₇₂A+R₂₇₄A+S₂₇₅A conserve une capacité de modulation en présence de fortes concentrations de modulateurs dans les deux cas, soit 20 mM d'acide nicotinique ou 50 mM de sulfate de magnésium, ce qui indique qu'il est affecté dans sa capacité de réponse mais qu'elle n'est pas abolie. De même le mutant S₂₇₁C est plus sensible aux modulateurs lorsque le pont disulfure est formé. La modulation reste cependant incomplète lors de l'ajout du TCEP, ce qui est probablement lié à l'effet de la substitution, montrant l'importance du résidu S₂₇₁ dans l'interaction entre les VFT1, se rapprochant du phénotype du mutant S₂₇₁A+E₂₇₂A+R₂₇₄A+S₂₇₅A.

En revanche, certains mutants ont une sensibilité différente vis-à-vis des deux modulateurs utilisés. Ceci indiquerait à nouveau que les sites de perception de ces modulateurs ne sont pas identiques. Ainsi, ces messages négatifs différents feraient aussi intervenir des mécanismes de transduction au moins en partie différents. Ce cas de figure se rencontre dans les mutants L₃₁₆C+S₄₄₅C et R₄₇₂A particulièrement.

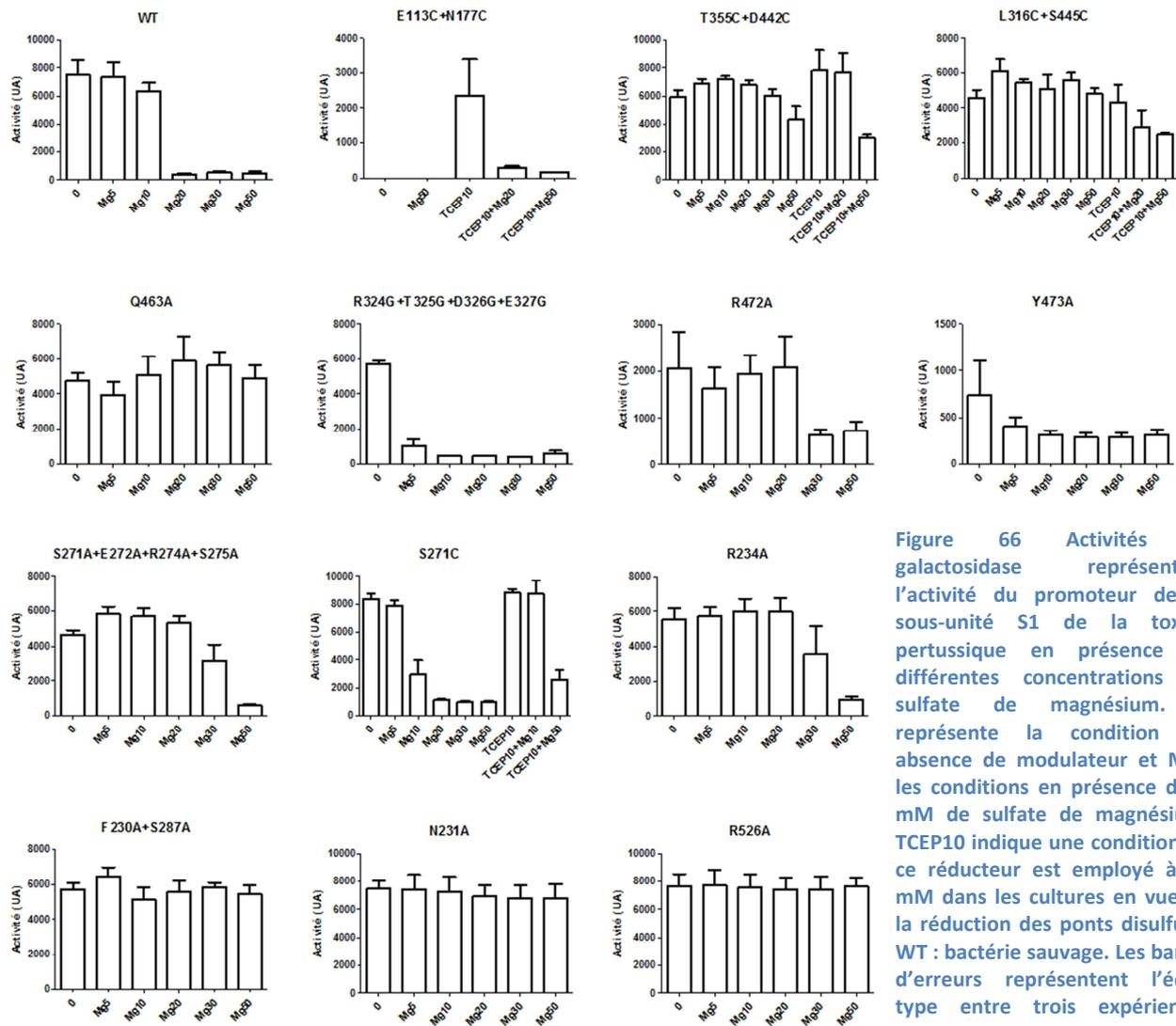


Figure 66 Activités β -galactosidase représentant l'activité du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique en présence de différentes concentrations de sulfate de magnésium. 0 représente la condition en absence de modulateur et MgX les conditions en présence de X mM de sulfate de magnésium. TCEP10 indique une condition où ce réducteur est employé à 10 mM dans les cultures en vue de la réduction des ponts disulfure. WT : bactérie sauvage. Les barres d'erreurs représentent l'écart type entre trois expériences distinctes

En effet, le mutant R₄₇₂A semble plus sensible à la présence de nicotinate que BvgS sauvage alors qu'en présence de sulfate de magnésium son comportement est proche de celui de la bactérie sauvage, malgré une diminution de l'activité basale chez ce mutant. Par ailleurs, la légère différence observée ici entre le mutant R₄₇₂A et le mutant Y₄₇₃A, qui n'apparaît pas en modulation par le nicotinate, suggère que le résidu Y₄₇₃ aurait une plus forte implication dans le maintien de la conformation active, et/ou la transmission du message positif, même si ces résidus doivent permettre ensemble une certaine robustesse dans le maintien de la conformation active et/ou du signal positif.

Le mutant L₃₁₆C+S₄₄₅C semble lui aussi plus sensible à la présence de nicotinate que la bactérie sauvage. Cependant, il semble incapable d'être modulé par le sulfate de magnésium. Il semblerait donc que la conformation du domaine VFT2 soit importante dans la transmission du signal négatif généré par la perception du sulfate de magnésium. Ceci est confirmé par l'absence de réponse à ce modulateur du mutant T₃₅₅C+D₄₄₂C. Dans un tel cas, il est impossible d'exclure une fixation du MgSO₄ au niveau du VFT2, ou que les conformations modulées en présence de MgSO₄ ou nicotinate soient différentes comme discuté en VII.A.3.b.

Il reste impossible d'expliquer les bases mécanistiques qui expliqueraient la dissociation des effets modulateurs de l'acide nicotinique et du sulfate de magnésium chez certains mutants. La définition du ou des sites de perception du sulfate de magnésium permettrait de mieux comprendre les différences observées dans la capacité de transduction des messages négatifs générés par les deux modulateurs. Jusque là, il a seulement été possible de supposer une action différente des deux modulateurs. En effet, des zones spécifiques de la portion périplasmique de BvgS semblent avoir une plus grande importance pour l'effet de l'un ou de l'autre des modulateurs, alors que certaines zones semblent nécessaires à la modulation par chacun d'entre eux. On peut donc supposer qu'il y aurait un mécanisme de transduction du signal négatif spécifique à chaque modulateur. Ces deux mécanismes distincts se rejoindraient en un mécanisme plus général, conduisant à l'inactivation de BvgS, au travers des hélices H19 au moins.

b. Autres souches mutantes

Afin de mieux caractériser le rôle des interfaces entre les domaines périplasmiques dans la fonction de BvgS, quelques mutants supplémentaires ont été construits portant des substitutions de résidus particuliers impliqués dans des interactions au sein du dimère des domaines VFT de BvgS.

1) Présentation des substitutions

Les substitutions E₂₀₀A et Q₄₆₃A avaient initialement été combinées dans un mutant E₂₀₀A+Q₄₆₃A vu que ces deux résidus participent à la même grande interface entre les domaines VFT 1 et 2 par interactions inter-monomères. Cependant, les éléments structuraux qui sont en interaction dans cette interface via ces résidus sont différents et nous avons choisi de découpler ensuite ces substitutions pour essayer de clarifier les contributions respectives de ces interactions dans l'activité de BvgS (cf. article ci-dessus). Les résultats du double mutant sont présentés ici.

L'extrémité chargée (RTDE) de la boucle du β hairpin situé dans le lobe 1 du domaine VFT2 a été modifiée (cf. article ci-dessus), ce qui a suggéré qu'elle aurait un rôle dans le maintien de la conformation active et la robustesse face à la modulation en générant un mutant plus sensible à la modulation. Une boucle du même type est présente dans le lobe 1 de VFT1. La modification de résidus dans les brins β de ce hairpin (Y₈₁A+E₈₆A, cf. article ci-dessus) a montré qu'elle serait importante pour le maintien de la conformation active. A l'instar de la boucle du VFT2, l'extrémité du β hairpin de VFT1 contient des résidus chargés alors que dans la famille des VFT (qu'ils soient impliqués dans le transport ou la signalisation), on retrouve plus fréquemment des résidus glycine dans cette zone (non montré). Nous avons donc choisi de remplacer ces résidus chargés par des résidus glycine, comme dans le cas de VFT2. Le mutant E₈₃G+R₈₄G a donc été construit.

Le résidu R₁₆₀ du domaine VFT1 est en interaction avec deux résidus du domaine VFT2 du même monomère. Afin de vérifier la contribution de ce résidu et de cette interface dans la fonction de BvgS, un mutant R₁₆₀A a été construit.

Les différentes interfaces du dimère des domaines VFT ont été déstabilisées grâce à des substitutions de résidus particuliers en alanine pour empêcher la formation de ponts hydrogène stabilisant ces interfaces (cf. article ci-dessus). Ainsi, une démarche complémentaire de stabilisation de ces interfaces a été entreprise. Des résidus dont la position permettrait la formation de pont disulfure par leur substitution en cystéine ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Disulfide by Design Version 1.2 (<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD>), à l'instar du résidu S₂₇₁ présenté dans l'article. Ainsi, les mutants A₂₀₄C+A₄₈₃C et G₂₈₁C+A₅₁₉C ont été construits en vue de stabiliser l'interface entre le domaine VFT1 d'un monomère et le domaine VFT2 de l'autre monomère. Les mutants S₅₂₃C+R₅₂₄C, afin de maintenir les hélices H18 dans la position qu'elles adoptent dans la structure, et Y₄₇₃C+W₅₃₅C, pour stabiliser l'interaction entre le domaine VFT2 d'un monomère et l'hélice H19 de l'autre monomère, ont aussi été construits.

2) Matériel et méthodes

Les différentes mutations ont été introduites par mutagenèse dirigée par PCR chevauchante dans la cassette d'intérêt du plasmide puc19-BvgSmos comme décrit précédemment (cf. VII.A.2.b.). Le plasmide pFUS S1 a été inséré dans les différentes souches pour rapporter l'activité du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique par activité β -galactosidase.

3) Résultats et discussion

Les effets phénotypiques sur l'activité du promoteur de la toxine pertussique des substitutions déstabilisant les interfaces sont représentés en figure 67.

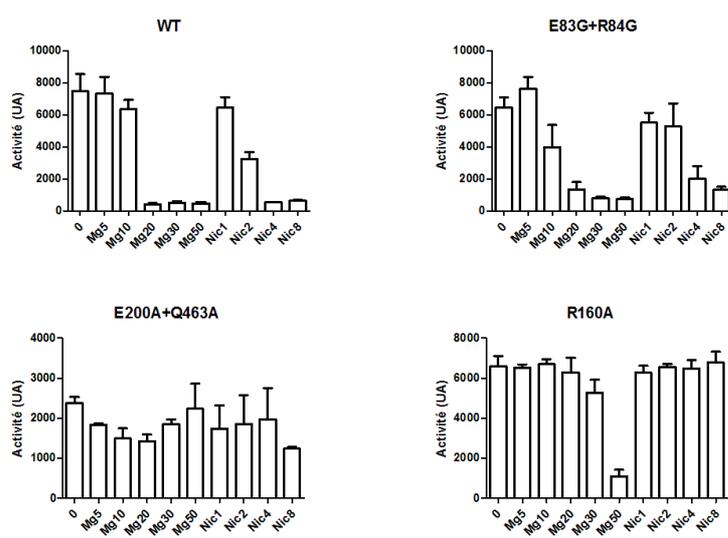


Figure 67 Activités β -galactosidase représentant l'activité du promoteur de la toxine pertussique dans les différentes souches construites ici, comparées au sauvage (WT). 0 est la condition en absence de modulateurs, MgX représente une condition en présence de X mM de MgSO₄ et NicX représente une condition en présence de X mM d'acide nicotinique. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre trois expériences distinctes.

La combinaison des substitutions E₂₀₀A et Q₄₆₃A génère un mutant incapable de répondre aux modulateurs chimiques mais dont l'activité basale est grandement diminuée. Ceci est en accord avec l'importance du résidu E₂₀₀ dans le maintien du signal positif et du résidu Q₄₆₃

dans la capacité de réponse à la modulation. Ceci indique aussi que la substitution du résidu E₂₀₀, qui génère un mutant avirulent, ne doit pas créer un défaut structural trop important qui occasionnerait la dégradation protéolytique de BvgS dans la bactérie, mais que la substitution de ce résidu affecte BvgS par la perte des interactions auxquelles il participe normalement. Ces interactions seraient donc nécessaires au maintien de la forme active des domaines VFT mais peuvent possiblement être compensées en partie par d'autres mutations favorisant le maintien de la forme active de BvgS, comme Q₄₆₃A.

Le mutant E₈₃G+R₈₄G a un phénotype très proche de celui de la bactérie sauvage. Ainsi, les charges présentes sur cette boucle ne seraient pas une caractéristique nécessaire au fonctionnement de BvgS. Ces résidus ne semblent que peu impliqués dans la formation de l'interface dimérique ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de leur substitution. Cependant, le béta hairpin a une grande importance pour la transmission du signal positif, car les substitutions combinées des résidus Y₈₁ et E₈₆, impliqués dans l'interface dimérique, rendent BvgS inactif. Cette zone doit donc permettre le transit d'une information positive entre les domaines VFT 1 et 2.

Le mutant R₁₆₀A a une capacité de réponse aux modulateurs fortement altérée. Il reste cependant modulable par de fortes concentrations de modulateurs (50 mM de sulfate de magnésium ou 20mM d'acide nicotinique, non montré), ce qui confirme l'implication de l'interface entre les VFT 1 et 2 d'un même monomère dans la capacité de modulation et donc dans la transmission du message négatif.

La formation de ponts disulfure entre les deux résidus cystéine distincts des différents mutants construits ici n'a pas pu être mise en évidence bien que toutes les souches produisent BvgS (non montré). Seuls les mutants G₂₈₁C+A₅₁₉C et S₅₂₃C+R₅₂₄C permettent la détection d'une activité β-galactosidase, bien que le niveau d'activité basale du mutant G₂₈₁C+A₅₁₉C soit réduite de moitié. Il a été impossible de restaurer un phénotype sauvage par ajout d'un réducteur (TCEP) dans le milieu de culture chez tous ces mutants. Ainsi, les résultats obtenus ne sont pas présentés car il est impossible de définir si les phénotypes obtenus sont liés à la présence d'un pont disulfure ou à la substitution des résidus. Il est alors impossible de conclure quant à l'implication des mutations sur la nature des effets observés.

3. Nouvelles protéines recombinantes

Nous avons pu obtenir la structure de la portion périplasmique de BvgS. Or, il a été très difficile d'obtenir des cristaux montrant une bonne qualité de diffraction et il serait intéressant de pouvoir répéter la cristallisation de cette protéine, pourquoi pas à meilleure résolution. Il serait aussi intéressant d'obtenir la structure de différentes protéines portant des substitutions spécifiques, conférant des phénotypes intéressants comme ceux décrits ci-dessus. Nous avons donc voulu améliorer notre construction protéique en espérant définir une protéine favorable à la cristallisation.

a. Variation sur un même thème

La construction originalement utilisée (BvgSp) contient un domaine GB1, qui permet d'augmenter la solubilité de la protéine recombinante à haute concentration, suivi des domaines VFT1 et 2 de BvgS et de l'hélice H19 pré-membranaire et finalement d'un motif « six histidines » (His⁶) pour la purification par affinité. La structure obtenue à partir de cette protéine montre la dimérisation particulière des domaines VFT de BvgS. Cependant, lors des purifications préparatives par tamisage moléculaire (colonne Sephadex G-200, GE Healthcare) de la protéine susmentionnée, nous avons remarqué que seul un faible pourcentage de la protéine semblait dimérique (<5%) et que la construction initiale donnait une protéine recombinante majoritairement monomérique (fig. 68). A présent convaincus de la nature dimérique de ces domaines, nous avons choisi de faciliter cette organisation par ajout d'un domaine leucine-zipper à la suite l'hélice H19, précédant ainsi le motif His⁶. La dimérisation des domaines VFT est ainsi forcée par la présence dans la partie C-terminale d'un domaine dont la capacité de dimérisation est très prononcée (définissant la protéine BvgSp-ZIP).

Une telle contrainte pourrait cependant être problématique dans l'organisation normale du dimère, en effet on peut imaginer que les hélices H19 font partie d'un domaine naturellement organisé sous la forme d'un enroulement d'hélices dans BvgS qui comprendrait cette hélice et se poursuivrait jusqu'au domaine PAS dans le cytoplasme. Or, l'enchaînement d'heptades de ces domaines hélicaux (coiled-coil, cf. V.C.1.) est très important et définit une interface particulière entre ces hélices. De fait, il est possible que la contiguïté de l'hélice H19 et du domaine leucine-zipper perturbe la conformation de H19, ce qui pourrait alors générer un défaut dans la formation du dimère des domaines VFT. Ainsi, nous avons créé deux autres protéines dans lesquelles un (BvgSp-ZIPG) ou deux résidus glycine (BvgSp-ZIPGG) sont introduits entre l'hélice H19 et le domaine leucine-zipper (fig. 69), afin de créer une zone à mobilité accrue qui favoriserait l'arrangement naturel des hélices H19 et donc des domaines VFT. Ces différentes protéines ont ainsi été purifiées et les profils d'élution obtenus par tamisage moléculaire suggèrent bien une organisation dimérique (fig.68). Des expériences de cristallisation ont été menées, mais aucun cristal ayant une bonne qualité de diffraction n'a été obtenu à ce jour.

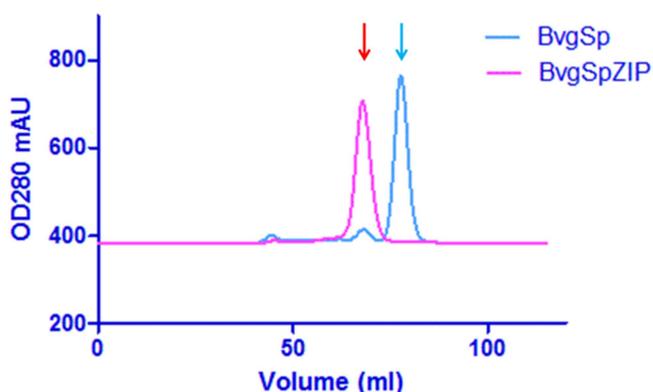


Figure 68 Profils d'élution des protéines recombinantes BvgSp et BvgSp-ZIP. La flèche bleue indique le volume d'élution théorique d'un monomère de BvgSp et la flèche rouge indique le volume d'élution théorique d'un dimère de BvgSp. Les profils d'élution de BvgSp-ZIPG et BvgSp-ZIPGG étant indistinguables de celui de BvgSp-ZIP, seul ce dernier est représenté. Un pic est visible à V = 40ml, volume mort de la colonne, représentant sans doute une petite fraction agrégée de la protéine.

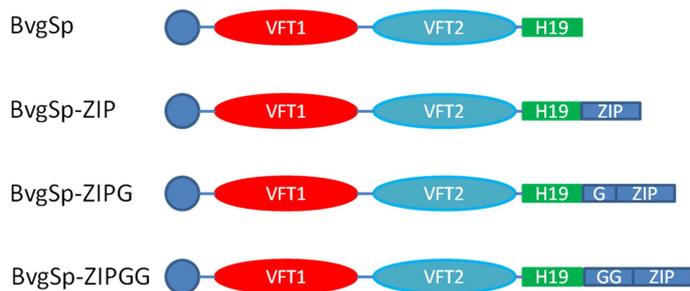


Figure 69 Représentation schématique de différentes protéines recombinantes des domaines périplasmiques de BvgS construites ici. Le rond bleu représente le domaine GB1. ZIP représente le leucine zipper. L'ajout d'une glycine est mentionné par la lettre G. Les autres éléments sont représentés avec leur nom habituel. La taille des différents domaines n'est pas représentative.

La structure cristalline précédemment obtenue possède une autre caractéristique particulière. En effet, le domaine GB1, présent en position N-terminale de la protéine recombinante, semble absent de la structure. L'inspection des paramètres de la maille cristalline indique qu'un espace potentiellement suffisant serait présent dans cette maille pour y accueillir ces domaines manquants. Alternativement, on peut supposer qu'un événement de protéolyse excisant ce domaine soit survenu au cours des étapes de purification et/ou cristallisation. Le rôle de ce domaine pour BvgSp est possiblement à la difficulté des domaines VFT1 et 2 à dimériser dans le cytoplasme d'*E. coli* en absence du reste de la protéine et à la mauvaise solubilité du monomère. Ainsi, dans les protéines rendues dimériques par la présence du domaine leucine-zipper, il est possible que ce domaine soit superflu. Un site de clivage par la thrombine (LVPRGS) est présent dans la séquence protéique de la jonction entre le domaine GB1 et le domaine VFT1. Le clivage protéolytique de ce domaine est relativement efficace et approche les 100% après 1 heure à 37°C en présence de 0,02 unité NIH de thrombine (une unité NIH correspond à $0.324 \pm 0.073 \mu\text{g}$ de thrombine) pour $10 \mu\text{g}$ de protéine (fig. 70).

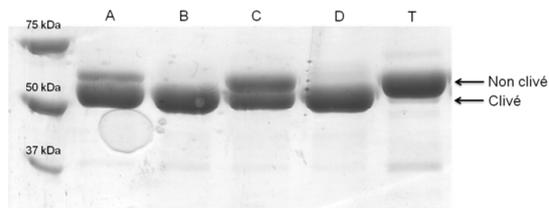


Figure 70 Expérience de clivage du domaine GB1 de la protéine BvgSp-ZIPGG en présence de 0,02 unités NIH de thrombine. A : 37°C, 1 heure. B : 37°C, 2 heures. C : 20°C, 1 heure. D : 20°C, 2 heures. En T, la protéine témoin incubée à 37°C pendant 4 heures sans thrombine.

Il est impossible de prévoir l'effet de l'ajout du domaine leucine-zipper sur la capacité de cristallisation de la protéine. Ainsi, nous avons choisi de créer aussi une version clivable de ce domaine. Une protéine contenant la séquence du site de clivage par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus protéase, issue du virus de la mosaïque du tabac) a été créée (BvgSp-ZTEV, fig. 71). Ce motif additionné de résidus glycine en positions N- et C-terminales (GENLYFQGG) a été inséré entre les deux résidus glycine de la protéine BvgSp-ZIPGG. Le clivage s'est montré relativement inefficace (non montré) et nous avons choisi de réutiliser un site de clivage thrombine, en espérant qu'il se montre également bien clivé en cette position. Cependant, pour éviter l'obtention d'une préparation hétérogène après protéolyse en raison de la présence de ce site à deux positions dans la protéine recombinante, nous avons aussi créé une protéine où ce motif serait absent de la jonction entre le domaine GB1 et le domaine VFT1 et présent uniquement entre l'hélice H19 et le domaine leucine-zipper (BvgSp-ZThr). Nous avons donc

substitué les résidus proline et arginine de ce motif, chacun indispensable au clivage, par des résidus alanine entre les domaines GB1 et VFT1 (LVAAGS). Enfin, il semblait intéressant de créer une protéine où le domaine leucine-zipper serait clivable mais où le domaine GB1 serait absent (BvgSp-ZΔGThr). Ainsi, nous avons aussi délété la séquence de ce domaine, générant ainsi une construction qui porte la séquence du site de clivage par la thrombine entre les séquences codant l'hélice H19 et le domaine leucine-zipper (fig. 71). Dans ces deux conditions, le domaine leucine-zipper est clivable dans les mêmes conditions que précédemment avec une efficacité similaire (non montré). Des expériences de cristallisation des protéines BvgSp-ZThr et BvgSp- ZΔGThr

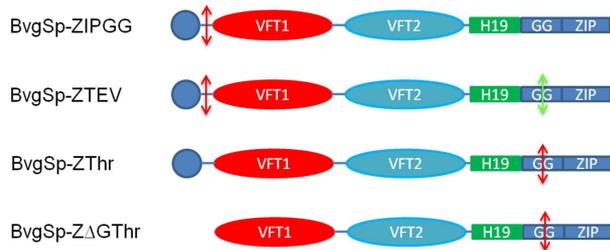


Figure 71 Représentation schématique de différentes protéines recombinantes des domaines périplasmiques de BvgS construites ici. Les domaines sont représentés comme en Figure 69. Une double flèche rouge indique la présence d'un site de clivage par la thrombine et une double flèche verte un site de clivage par la protéase TEV.

en prévision. dans leur état clivé ou non sont en cours ou

b. Matériel et méthodes

Les différentes constructions ont été réalisées dans le plasmide pGEV2-BvgSp décrit dans l'article ci-avant et représenté en figure 72.

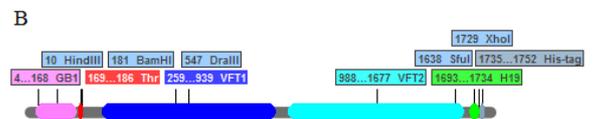
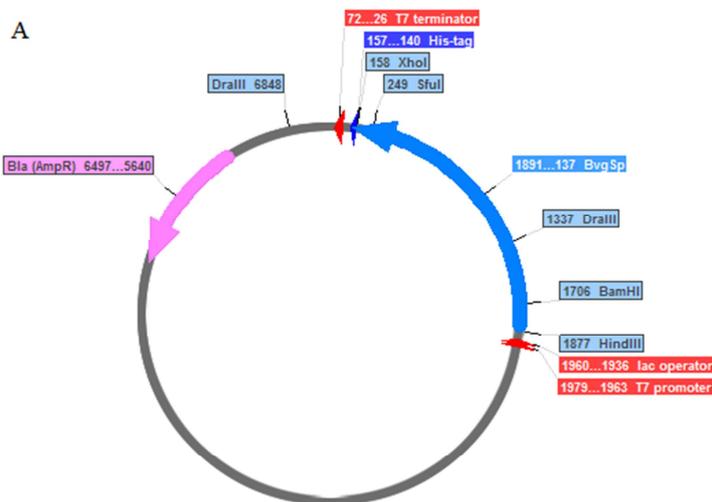


Figure 72 A. Représentation du plasmide pGEV2-BvgSp. En bleu la portion codante pour la protéine recombinante et le motif His⁶, en rouge les séquences promotrice, opératrice et terminatrice. En rose la cassette de résistance à l'ampicilline. Les sites de restriction pour les différentes enzymes d'intérêt sont indiqués. L'origine de réplication et le gène codant pour la protéine Lacl présents sur ce plasmide ne sont pas représentés. La numérotation est indicative. B. Représentation du fragment codant BvgSp, les différents domaines et sites de restriction d'intérêt sont représentés en bleu clair, Thr indique le site de clivage par la thrombine. La numérotation commence au A du codon ATG d'initiation de la traduction.

1) Construction des plasmides pGEV2-BvgSp-ZIP

Le fragment codant pour le domaine leucine-zipper a été amplifié à partir du plasmide pT18-zip, précédemment décrit (Karimova et al., 1998) en utilisant le couple d'amorces ZIP UP et ZIP LO (tableau 2). Un fragment correspondant à la portion C-terminale du domaine VFT2 et

aux premiers résidus du domaine leucine-zipper a été amplifié à partir du plasmide pGEV2-BvgSp avec le couple d'amorces VFT2ZIP UP / VFT2ZIP LO. Alternativement, l'amorce VFT2ZIP LO a été remplacée par les amorces VFT2ZIPG LO ou VFT2ZIPGG LO (Tableau 2) pour introduire respectivement un ou deux résidus glycine entre le domaine leucine zipper et l'hélice H19.

Ces deux fragments ont été fusionnés par PCR chevauchante en utilisant les amorces VFT2ZIP UP et ZIP LO et clonés dans le plasmide TOPO® (Invitrogen) pour séquençage. Ce fragment est introduit dans le plasmide pGEV2-BvgSp par digestion préalable par les enzymes de restriction SfuI et XhoI et ligation générant les plasmides pGEV2-BvgSpZIP, pGEV2-BvgSpZIPG et pGEV2-BvgSpZIPGG.

Tableau 2 Amorces PCR utilisées pour les constructions des différents plasmides contenant un domaine leucine-zipper.

Amorces	Séquence
ZIP UP	5'-CAACGTATGAAACAGCTGGAAGA-3'
ZIP LO	5'-TACTCGAGCCCACGTTACCCACCAGTTT-3'
VFT2ZIP UP	5'-ACAGCATTTTGAACGACGAGC-3'
VFT2ZIP LO	5'-TCTTCCAGCTGTTTCATACGTTGCTCGTTGCGGTAGGCGTACCA-3'
VFT2ZIPG LO	5'-TCTTCCAGCTGTTTCATACGTTGTCCCTCGTTGGGGTAGGCGTACCA-3'
VFT2ZIPGG LO	5'-TCTTCCAGCTGTTTCATACGTTGTCCACCCTCGTTGCGGTAGGCGTACCA-3'

Ces différents plasmides ont été introduits dans *E. coli* BL21(DE3) en vue de la production et purification des protéines. Ces étapes se font dans les conditions présentées dans l'article ci-avant, bien que ces protéines puissent aussi être purifiées et semblent stables dans un tampon Tris-HCl 10 mM à des pH allant de 7,5 à 9, additionné de seulement 150mM de NaCl contrairement à la protéine BvgSp qui nécessite 500mM de NaCl et un pH de 8,8 pour sa stabilité.

2. Construction des autres plasmides.

L'insertion d'un site de clivage par la protéase TEV entre l'hélice H19 et le domaine leucine-zipper dans la construction pGEV-BvgSpZIPGG a été faite par introduction d'un gène synthétique (GeneCust) correspondant à un fragment SfuI-XhoI. Ce fragment contient la séquence du site de clivage par la protéase TEV précédé de deux résidus glycine, faisant la jonction avec l'hélice H19, et également suivi de deux résidus glycine, faisant la jonction avec le domaine leucine-zipper. Ce fragment est inséré dans le plasmide pGEV2-BvgSpZIPGG par ligation après digestion préalable par les enzymes SfuI et XhoI (le plasmide pGEV2-BvgSp aurait pu tout aussi bien être utilisé) générant le plasmide pGEV2- BvgSp-ZTEV.

L'insertion d'un site de clivage par la thrombine entre l'hélice H19 et le domaine leucine-zipper a été réalisée de la même façon avec l'aide d'un gène synthétique (GeneCust) correspondant à la cassette SfuI-XhoI, la séquence est comme décrite ci-dessus, la séquence du site de clivage par la thrombine remplaçant celle du site de clivage par la protéase TEV. Le plasmide ainsi généré est nommé pGEV2- BvgSp-ZThr2X

La suppression du site de clivage par la thrombine entre les domaines GB1 et VFT1 a été faite par amplification d'un fragment HindIII-BamHI à l'aide des amorces Δ Thr UP et Δ ThrLO (Tableau 3) à partir du plasmide pGEV2-BvgSpZIPGG (les autres plasmides pGEV2 décrits jusqu'ici conviendraient aussi parfaitement). Le fragment est inséré dans le plasmide TOPO® pour séquençage puis inséré dans le plasmide pGEV2-BvgSp-ZThr2X par ligation après digestion préalable par les enzymes de restriction HindIII et BamHI, générant ainsi le plasmide pGEV2-BvgSp-ZThr.

La délétion complète du domaine GB1 a été faite par amplification PCR en utilisant le couple d'amorces Δ GB1 UP-DraIII LO à partir du plasmide pGEV2-BvgSp (Tableau XX). Le fragment ainsi obtenu est inséré dans le plasmide TOPO® pour séquençage. Un fragment sauvage de la portion DraIII-SfuI et le fragment HindIII(Δ GB1)-DraIII sont insérés dans le plasmide pGEV2-BvgSp-ZThr, préalablement digéré par les enzymes HindIII et SfuI, par triple ligation. Le plasmide résultant est nommé pGEV2-BvgSp-Z Δ GThr.

Tableau 3 Amorces PCR utilisées dans les constructions présentées ci-haut

Amorces	Séquence
Δ Thr UP	5'-TAAGCTTGCTCTTAATGGTAA-3'
Δ Thr LO	5'-ATGGATCCAGCAGCAACCAGTTCGGTTACCG-3'
Δ GB1 UP	5'-ATAAAGCTTAGTCAAGAGCTGACCCTGGTCGGCA-3'
Dra LO	5'-GCATGACGATCACCGGGTGGTTCG-3'

Ces différents plasmides ont été introduits dans *E. coli* BL21(DE3) en vue de la production et purification des protéines. Ces étapes se font dans des conditions identiques à celles présentées dans l'article ci-avant.

2) Digestion protéolytique

Les expériences de digestion par la protéase TEV étant peu concluantes, les différents protocoles de digestion testés ne seront pas détaillés ici.

La protéolyse par la thrombine se fait dans le tampon normal de la protéine (T_N : Tris-HCl 10mM pH 8,8 et 500 mM NaCl) additionné de 2,5 mM de $CaCl_2$. La définition des conditions de clivage a été faite par digestion de 10 μ g de protéine par 0,005 à 0,04 unité NIH de thrombine dans un volume de 50 μ l. Différentes conditions de temps (de 30 minutes à 24 heures) et de température (4°C, 20°C et 37°C) ont été utilisées. La condition adéquate de clivage définie (1,5 heures à 37°C en présence de 0,02 unité NIH de thrombine par 10 μ g de protéine) a été utilisée sur de plus grandes quantités, en vue de préparation de protéines clivées pour les expériences de cristallogénèse. La concentration en protéine semble influencer relativement peu sur la capacité de clivage, seul le ratio de quantité protéine/protéase doit être maintenu (non montré). Une étape supplémentaire de purification sur résine Ni-NTA Agarose (Qiagen) est effectuée après le clivage.

Après clivage du domaine GB1, la protéine d'intérêt est fixée sur la colonne et éluée par 200mM d'imidazole dans le tampon T_N après lavage de la colonne en présence de

concentrations croissantes d'imidazole dans le tampon T_N . L'imidazole est ensuite éliminé par dialyse contre la solution tampon T_N .

Après clivage du domaine leucine-zipper, la protéine d'intérêt ne se fixe pas à la colonne, mais seulement le fragment contenant le leucine-zipper. Ainsi, la protéine d'intérêt est directement récupérée en sortie de colonne, le fragment clivé indésirable y restant accroché. La protéine peut alors être dialysée contre le tampon T_N pour éliminer le chlorure de calcium présent dans le tampon de clivage et reconcentrée.

4. La mobilité des domaines VFT

Nos résultats précédents semblent indiquer l'importance de la mobilité des domaines VFT de BvgS pour définir son état de signalisation, particulièrement au niveau de VFT1. Ainsi, nous nous sommes intéressés à une technique particulière qui permet de définir la mobilité de la protéine au niveau d'un résidu donné. Cette technique est la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et l'acquisition des données a été faite en collaboration avec le Dr. Hervé Vezin au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman de l'UMR CNRS 8516.

La technique de RPE ne sera pas décrite ici en raison de sa complexité. Son principe est décrit en détail dans l'article de Klug and Feix (2008) et son application particulière aux protéines est développée dans l'article de Fajer (2000). Elle est utilisée pour estimer la mobilité des protéines et définir des changements conformationnels (Doebber et al., 2008; Ottemann et al., 1998).

a. Matériel et méthodes

Les différentes expériences ont été réalisées lors des stages successifs de deux étudiantes en première année de Master, que j'ai personnellement encadrées au cours de mon travail de thèse. Leurs travaux ont fait l'objet de mémoires de recherche.

Mlle Sophie Tronet a réalisé les constructions protéiques et effectué les premières productions et purifications de mise au point. Brièvement, les codons cystéine pour la formation de ponts disulfure permettant de maintenir les domaines VFT sous forme fermée ont été introduits un par un dans la construction BvgSp-ZIP décrite ci-dessus.

Les substitutions $E_{113}C$ et $N_{177}C$ ont été introduites par PCR simple permettant l'amplification de la portion contenant un résidu substitué en cystéine ou la portion sauvage à partir des plasmides pUC19-BvgSmos contenant ces mutations ou dans sa version sauvage comme matrice en utilisant les couples d'amorces Bam UP-DraIII LO et DraIII UP-Sfu LO (Tableau 4). Après insertion dans un plasmide TOPO® (Invitrogen) et vérification de la séquence, ces fragments sont intégrés dans le plasmide pGEV2-BvgSpZIPGG, préalablement digéré par les enzymes BamHI et SfuI, par triple ligation. Les substitutions $L_{316}C$, $T_{355}C$, $D_{442}C$ et $S_{445}C$ dans le domaine VFT2 ont été directement introduites dans le plasmide pGEV2-BvgSpZIPGG par mutagénèse dirigée à l'aide du kit Quikchange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) et des amorces PCR décrites dans le Tableau 4. La production et la purification des différentes protéines ont été réalisées comme décrit ci-dessus.

Tableau 4 Amorces PCR utilisées dans cette étude. Les amorces permettant la substitution en cystéine de résidus du VFT2 sont entièrement complémentaires pour l'utilisation du kit Quikchange®.

Amorces	Séquence
Bam UP	5'-TAGGATCCGCGCAGGCAAGCCAG-3'
Dralll LO	5'-GCATGACGATCACCGGGTGGTCG-3'
Dralll UP	5'-TAACCACCCGGTGATCGTCATG-3'
Sfu LO	5'-TATTCGAAATGCTGTAGAGCGC-3'
L ₃₁₆ C UP	5'-GGTGGCGGTCTGAATTGTTTCGCGCCCTTCACCC-3'
L ₃₁₆ C LO	5'-GGGTGAAGGGCGCGAAACAATTCAGGACCGCCACC-3'
T ₃₅₅ C UP	5'-CGAGATCATCGGCGTCTGACTGTGTCTGAGGAACTGATAGCC-3'
T ₃₅₅ C LO	5'-GGCTATCAGTTCCTCGACACAGTCGACGCCGATGATCTCG-3'
D ₄₄₂ C UP	5'-CGAAGGTGGTGACCGCCTGTAACCCGAGCGAGGCG-3'
D ₄₄₂ C LO	5'-CGCCTCGCTCGGGTTACAGGCGGTCCACCACCTTCG-3'
S ₄₄₅ C UP	5'-GACCGCCGACAACCCGTGTGAGGCGATGCTGATGG-3'
S ₄₄₅ C LO	5'-CCATCAGCATCGCCTCACACGGGTTGTCGGCGGTC-3'

Mlle Elodie Lesne a pris la suite de ces expériences et a ainsi continué les productions et purifications de ces protéines. Ensuite, une sonde spécifique, le MTSL ((1-oxy-2,2,5,5-tetraméthyl- Δ 3-pyrroline-méthyl)Méthanethiosulfonate), est incubée avec la protéine sous agitation orbitale légère pendant une nuit à 4°C en 10 excès molaire. Cette sonde se greffe alors de façon covalente au résidu cystéine, l'excès de sonde non fixée est éliminé par dialyse. La protéine peut alors être utilisée dans l'expérience de RPE.

b. Résultats et discussion

Seules les protéines contenant les substitutions N₁₇₇C ou L₃₁₆C ont montré une bonne capacité de marquage spécifique par le MTSL. La protéine sauvage ne fixe que très peu la molécule (fig. 73), indiquant qu'il est possible d'obtenir des spectres de qualité lors de la fixation de la sonde sur un résidu cystéine spécifique. Des spectres représentant la mobilité de ces deux protéines mutantes ont donc pu être obtenus et sont très similaires, ainsi seule la protéine N₁₇₇C sera représentée (fig. 74).

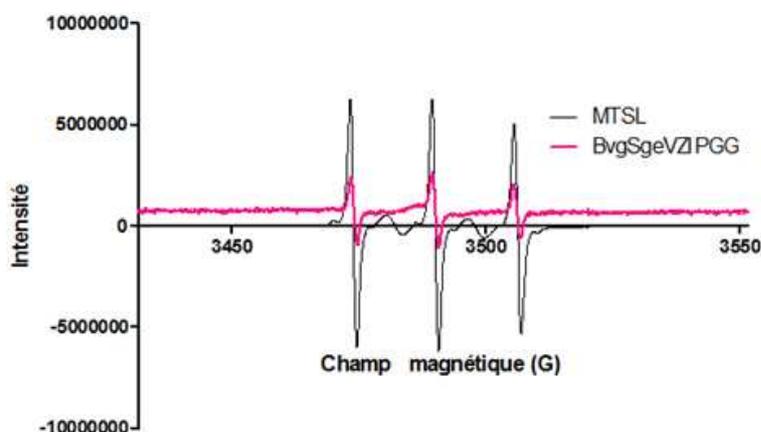


Figure 73 Représentation des spectres RPE du MTSL libre en solution (en noir) et de la protéine BvgSp-ZIPGG sauvage (en rose). Un faible signal correspondant à du MTSL libre est détecté dans la protéine sauvage, indiquant qu'il n'y aurait pas de marquage aspécifique mais que le MTSL n'a pas été totalement éliminé par les dialyses.

La mobilité en une zone donnée se définit par l'écartement entre un « pic d'entrée » (flèches bleues, fig. 74) et un « pic de sortie » moins visible, qui correspond à une petite inflexion vers les hauts champs. Cette distance en Gauss représente le paramètre A_{zz} . De façon simpliste, plus la distance entre ces pics (A_{zz}) est grande, plus les mouvements de la protéine sont lents. Ainsi, on peut dénoter la présence de deux composantes différentes dans la mobilité au niveau du résidu 177 marqué par le MTSL, une composante rapide (double flèche noire) et une composante plus lente (double flèche orange). De façon intéressante, l'ajout de modulateurs négatifs de la virulence, l'acide nicotinique ou le sulfate de magnésium, ont un effet très similaire sur la mobilité au niveau de ce résidu. Ils induisent une diminution de la composante rapide qui est décalée vers la composante lente.

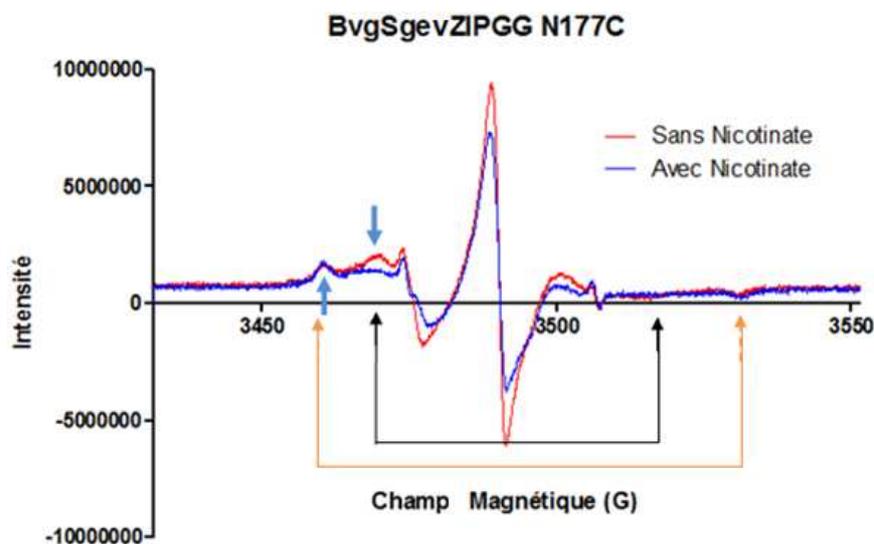


Figure 74 Représentation des spectres RPE de la protéine BvgSp-ZIPGG N177C marquée par le MTSL en absence ou en présence de nicotinate. Les différents éléments représentés sont repris dans le texte.

Bien que préliminaires, ces résultats confortent notre hypothèse du rôle de la mobilité des domaines VFT, particulièrement du domaine VFT1, dans l'activité de BvgS. En effet, l'ajout de modulateurs négatifs semble « ralentir » la dynamique de ce domaine. Ceci est cohérent avec le phénotype avirulent du mutant D1SS, dont le domaine VFT1 aurait une dynamique fortement perturbée à cause de sa fermeture forcée par la formation d'un pont disulfure.

La technique de RPE pourra sans doute être à nouveau utilisée pour tester la mobilité au niveau de différents résidus des domaines VFT, et pourquoi pas sur des mutants de ces domaines dont le phénotype est défini. Ceci nous permettrait de mieux juger de l'importance de la mobilité des domaines VFT dans les mécanismes de signalisation. Par ailleurs, une technique particulière de RPE, la résonance pulsée (PELDOR pour Pulsed Electron-electron Double Resonance), nécessitant cette fois un marquage de deux positions distinctes, permet d'évaluer la distance entre les deux résidus marqués. Ceci pourrait être utilisé à notre avantage pour définir des différences dans la position relative de résidus entre les conditions modulées et non modulées. Notre structure cristalline représente la condition active non modulée et ainsi nous pourrions avoir accès à la conformation des domaines VFT de BvgS en conditions de modulation, état inactif.

C. Conclusion des expériences sur les domaines VFT

Les différentes expériences menées jusqu'ici nous ont permis de définir les premières caractéristiques importantes de fonctionnement des domaines périplasmiques de BvgS. La (ou les) zone(s) de perception du sulfate de magnésium restant une énigme, au même titre que les mécanismes de modulation par ce modulateur, nous tenterons de bâtir un modèle vis-à-vis de la modulation par l'acide nicotinique.

1. De l'état des domaines VFT à la conformation de H19

Il apparaît clair aujourd'hui que **le domaine VFT2 définit la zone de perception de l'acide nicotinique**, vraisemblablement dans sa cavité. Ce domaine est fermé en absence de ligand, ce qui s'éloigne des mécanismes habituels de fonctionnement des domaines VFT. Assemblés dans la structure dimérique de la portion périplasmique complète, les domaines VFT2 semblent encore plus fermés. Une telle contrainte suggère que **la fixation du nicotinate n'entraînerait qu'un changement mineur dans la conformation du domaine VFT2**, plutôt qu'une ouverture franche par exemple.

Le domaine VFT1 est quant à lui ouvert. Cette conformation dans laquelle le domaine VFT1 semble très mobile, doit correspondre à un état de signalisation positive par ce domaine. De façon intéressante, bien qu'il ne soit pas lié à la perception directe de l'acide nicotinique, **le domaine VFT1 semble aussi important pour la modulation du système**. En effet, certaines substitutions de sa cavité entraînent une perte de la capacité de BvgS de répondre à la modulation, vraisemblablement car le domaine VFT1 modifié empêche alors le domaine VFT2 de fixer le nicotinate ou d'adopter sa conformation modulée. Par ailleurs, la rupture d'interactions spécifiques entre ce domaine et le domaine VFT2, particulièrement au sein de la même chaîne polypeptidique, ont le même effet. La fixation du modulateur entraînerait un changement de la mobilité des domaines périplasmiques. Celle du VFT2 semble relativement peu importante pour l'activité du système, contrairement à celle de VFT1. Même en ce qui concerne la modulation, un mutant hypersensible possédant un pont disulfure inter-lobes, donc peu mobile, a pu être obtenu. Ceci suggère qu'un (faible) changement conformationnel du VFT2 permet la transmission du signal négatif.

Les perturbations de la conformation du domaine VFT2 par la fixation de l'acide nicotinique seraient donc répercutées sur la conformation et/ou la mobilité du domaine VFT1, ce qui permettrait la transduction de ce signal négatif. VFT1 agirait, en quelque sorte, comme un amplificateur du signal négatif perçu par VFT2. La communication entre les domaines VFT se fait au travers des interfaces au sein du même monomère mais aussi entre les deux monomères.

Il est malheureusement impossible de juger de l'implication des interfaces dimériques essentielles à la transmission du signal positif dans la transmission du signal négatif, puisqu'il est impossible de mesurer une activité de BvgS pour les mutants correspondants. Cependant, les interfaces nécessaires à la transmission des signaux positif et négatif sont remarquablement différentes et les premières sont bien moins nombreuses. **Le nombre des substitutions qui empêchent la transmission d'un signal négatif est donc en faveur d'une**

augmentation des contraintes imposées au système pour la signalisation négative. Ceci correspondrait plus particulièrement à la transmission d'un changement conformationnel au travers de la membrane *via* l'hélice H19. Cette hélice et la boucle qui la précède sont dans une zone où s'opèrent de nombreuses interactions inter-domaines, intra- et inter-chaînes, ce qui plaide en faveur de l'importance de la conformation de cette hélice. **La conformation de l'hélice H19 traduirait alors le message global transmis par la portion périplasmique.**

Il est possible d'obtenir des mutants avirulents par la simple substitution d'un résidu de la portion périplasmique (par exemple W₅₃₅). Il est donc nécessaire qu'un message positif provienne du périplasmique et soit transmis au-delà de la membrane au travers de l'hélice H19. **Une contrainte doit être imposée à l'hélice H19 pour qu'elle adopte une conformation permissive pour l'activité kinase.** Cette contrainte représente une « tension modérée » du système, avant tout fournie par la structure dimérique particulière des domaines périplasmiques et particulièrement l'ouverture et la mobilité du domaine VFT1.

On passerait alors d'un état « en tension modérée », en absence de modulateurs, à un nouvel état, en « surtension », en présence d'acide nicotinique par exemple. **Un état, en « surtension », indique donc l'imposition de contraintes supplémentaires à l'hélice H19 pour son maintien dans une conformation alternative, qui défavorise fortement l'activité kinase** (figure 75). Les phénotypes des différents mutants ayant permis l'obtention d'un tel modèle sont représentés schématiquement en appendice (Le mini-guide des mutants de BvgS).

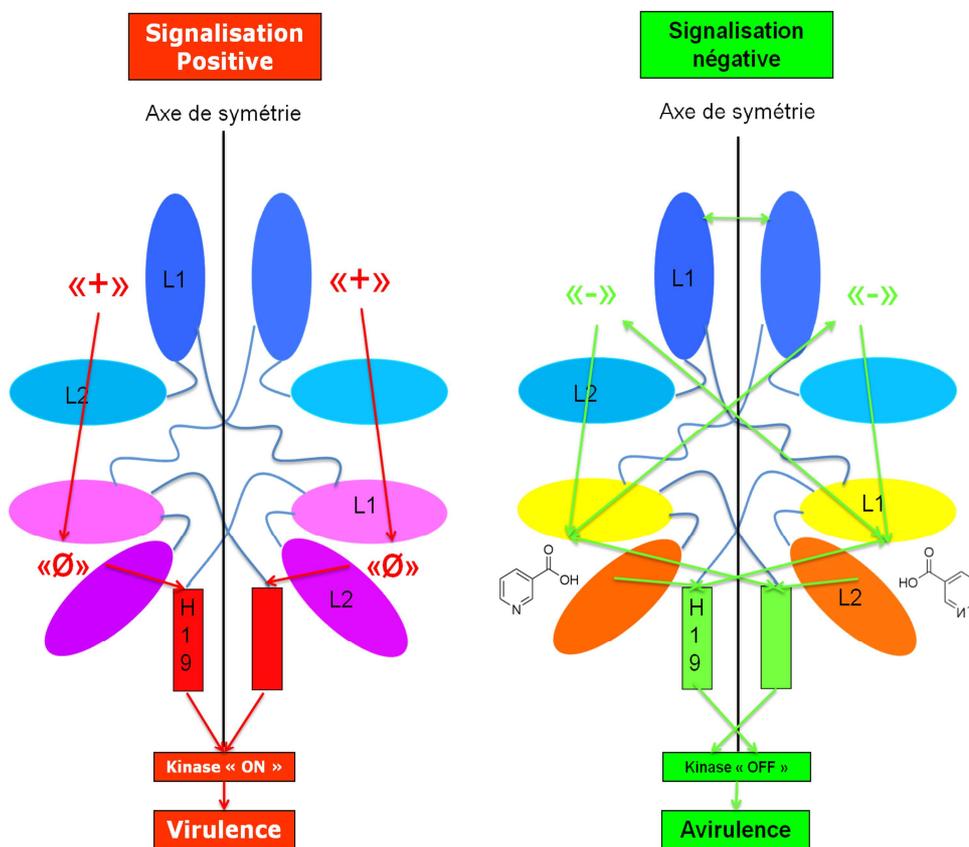


Figure 75 Représentation schématique des mécanismes de signalisation positive et négative par perception de l'acide nicotinique (représenté sous forme de molécule). Les domaines VFT1 sont représentés en bleu et leurs lobes différenciés dans un des monomères (L1 pour lobe 1, L2 pour lobe 2). Les domaines VFT2 sont en nuance de rose dans leur conformation « positive » et en nuance de jaune dans leur conformation « négative ». L'hélice H19 est représentée par un rectangle rouge dans sa conformation permettant l'activité kinase et en vert dans la conformation l'empêchant. Le signe «+» indique le message positif provenant de la mobilité et/ou de la conformation du domaine VFT1, le signe «-» indique sa perturbation et le signe «Ø» indique une cavité de VFT2 sans ligand spécifique (absence d'acide nicotinique). Les flèches indiquent de façon sommaire les trajets des signaux positifs (en rouge) ou négatifs (en vert).

Il apparaît de façon évidente que l'intégration du signal positif engendre des contraintes structurales sur différents éléments, particulièrement H19. **Ceci montre particulièrement que les domaines VFT 1 et 2 sont fortement interdépendants dans l'intégration du signal négatif** fourni par le nicotinate. En effet, la rupture de divers contacts entre ces domaines entraîne un défaut de sensibilité à la modulation.

Nous nous éloignons donc de plus en plus des mécanismes de transduction du signal par les iGluR. Dans ce cas, ce sont les mécanismes d'ouverture et fermeture des domaines VFT, par captation d'un ligand, qui influencent la distribution des interfaces au travers des linkers entre les différents domaines et, *in fine*, l'ouverture/fermeture du canal ionique lié. Dans le cas de BvgS, l'ouverture/fermeture des domaines semble moins importante particulièrement au niveau du VFT2.

Il serait vraiment intéressant de pouvoir définir les modifications structurales apportées au domaine VFT2 et à la portion périplasmique complète lors de la captation de l'acide nicotinique. Ceci permettrait de mieux cerner les contraintes nécessaires à la modification de la conformation de l'hélice H19. Cette hélice est certainement placée de manière artificielle dans notre structure en absence des domaines transmembranaires et cytoplasmiques, son positionnement réel reste donc difficile à prévoir. Comprendre la conformation de cette hélice, et mieux encore de l'enroulement d'hélices prédit dont elle fait partie, serait un atout. Pouvoir différencier la conformation des états modulé et non modulé permettrait la définition du signal que le domaine PAS doit intégrer, qu'il soit positif ou négatif. L'aspect dynamique des domaines VFT semble aussi important, surtout au travers de VFT1. Ainsi, des études en dynamique moléculaire ou par d'autres techniques permettant l'accès à la dynamique de la protéine seraient sans doute aussi très informatives.

2. Un mécanisme asymétrique ?

Des résidus tryptophane, conservés dans la famille des capteurs-kinases à VFT, ont été identifiés dans BvgS comme impliqués dans la transduction des signaux positifs et négatifs. Ces résidus se retrouvent dans une zone critique de la structure dimérique (Fig. 76). En effet, ces résidus sont situés au niveau central de la structure, formée d'un pilier d'hélices α central autour de l'axe de pseudo-symétrie. Ce type d'agencement autour d'un pilier central a été décrit pour les domaines périplasmiques du capteur-kinase TorS, à l'instar de ceux de la famille NarX (Moore and Hendrickson, 2009). Dans ces derniers cas, il s'agit cependant d'une organisation en paquet de quatre hélices alpha. Les états actif et inactif du système correspondent respectivement à des états symétrique et asymétrique de la protéine (Moore and Hendrickson, 2012). On ne peut exclure l'existence d'un tel mécanisme dans le fonctionnement de BvgS.

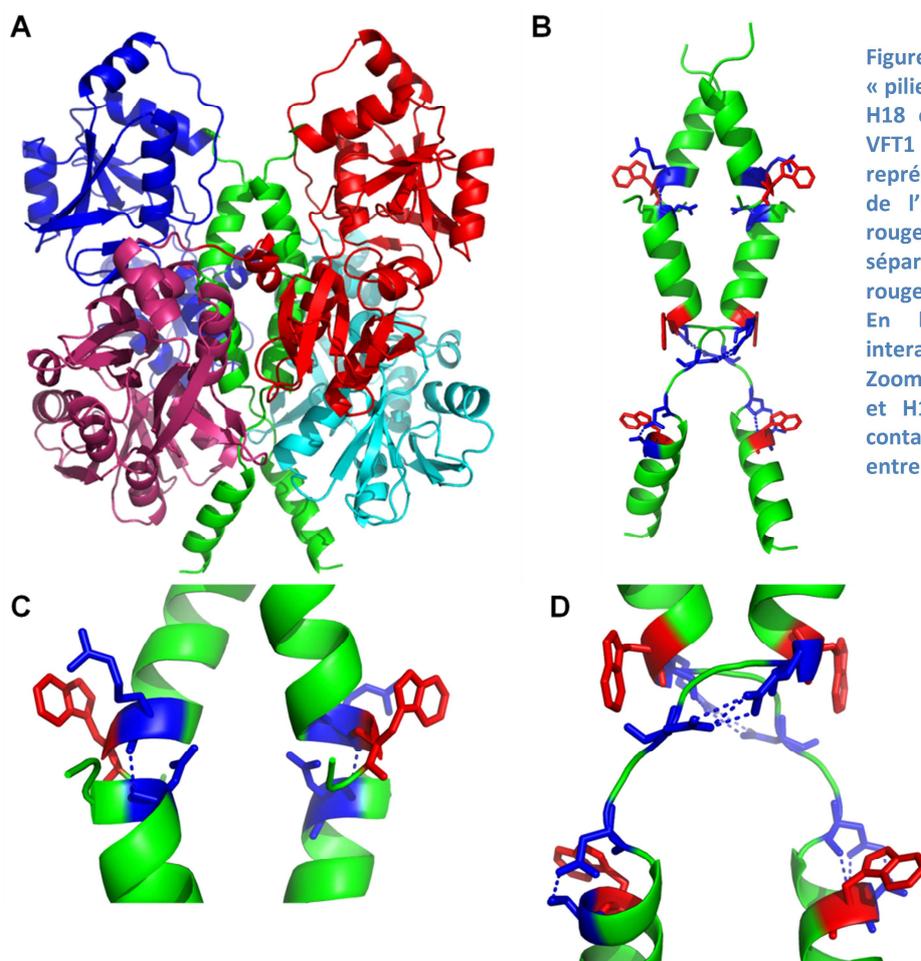


Figure 76 Représentation du « pilier central » formé par les hélices H8, H18 et H19 (en vert). A Les domaines VFT1 et VFT2 d'un monomère sont représentés en nuances de bleu, et ceux de l'autre monomère en nuances de rouge. B Les hélices H8, H18 et H19 séparées du reste de la structure. En rouge les résidus W280, W525 et W535. En bleu, les résidus formant les interactions présentées dans le texte. C Zoom sur la zone d'interaction entre H8 et H18. Les tirets bleus indiquent un contact polaire. D Zoom sur la jonction entre H18 et H19.

Les interactions entre les hélices de ce « pilier » sont cependant limitées. Il n'y a même aucune connexion directe entre H18 et H19, mais uniquement au travers de la boucle qui précède H19 et au sein du même monomère (cf. fig. 76). Cette zone est très chargée en interactions avec les différents domaines, mais la substitution du résidu R₅₂₆ en alanine, diminue la sensibilité aux modulateurs de BvgS tout comme celle du résidu W₅₂₅ (lui aussi localisé à la fin de H18), indiquant une implication de ces résidus dans la transduction du signal négatif. En supposant qu'un état symétrique permette l'activité, la modulation pourrait générer un état asymétrique. **Ainsi une conformation particulière, asymétrique par exemple, au niveau des hélices H18 imposerait directement une contrainte à l'hélice H19**, la maintenant dans une conformation non permissive pour l'activité kinase. Le remplacement en alanine du résidu W₂₈₀ (à la fin de H8) rend BvgS plus sensible à la modulation. Il pourrait être impliqué en partie dans le maintien du tronc central d'hélices, particulièrement H8 et H18, dans une conformation symétrique. On peut alors imaginer que la perception du nicotinate au niveau du VFT2 entraîne un changement conformationnel de celui-ci qui rendrait l'organisation dimérique plus asymétrique. Ce phénomène serait alors répercuté au niveau de VFT1, la conformation des hélices H8 s'en retrouverait modifiée, et ainsi celle des hélices H18 (ce qui possiblement permettrait, en partie, l'amplification du message négatif par VFT1 discuté précédemment). L'hélice H18 transmettrait donc ces changements conformationnels à l'hélice H19 au travers de la boucle qui les relie.

Il est aussi intéressant de constater que les interactions nécessaires à la transmission du signal positif ne traversent pas l'axe de symétrie, contrairement à celles requises pour la transmission du signal négatif (fig. 75). Ceci pourrait donc indiquer la transmission de contraintes asymétriques pour le passage en conformation inactive, ce qui est cohérent avec ce modèle.

Il nous faut donc maintenant comprendre quels sont ces changements structuraux, ce qui permettra de définir plus précisément le mécanisme de transduction des signaux négatifs. L'importance relative des différents mécanismes probables discutés ici pourrait aussi être définie et confirmée. Mesurer l'impact de tels changements sur l'hélice H19, et l'enroulement d'hélices dont elle fait partie, permettrait de définir le « message » perçu par le domaine PAS. Une meilleure compréhension de la transduction du signal jusqu'à son intégration par l'histidine-kinase, soit une activité kinase ou phosphatase, serait alors possible. Nous avons obtenu des mutants dont le niveau d'activité basal est diminué par substitutions de résidus des domaines périplasmiques, il semblerait donc que des activités intermédiaires puissent au moins résulter d'un état intermédiaire de ces domaines. A nouveau, c'est la conformation de l'hélice H19 qui semble cruciale à la transmission de ce type de signal et semble parfaitement intégrable par le domaine PAS.

VIII. Études du domaine PAS de BvgS

Comme nous l'avons vu, le domaine PAS de BvgS est très peu caractérisé. Les domaines PAS cytoplasmiques sont souvent capables de percevoir un signal particulier au travers de la fixation d'un ligand ou d'un cofacteur au sein de leur cavité, mais, parfois, aucun ligand n'est identifié. Une autre caractéristique importante de ce type de domaines est sa capacité de dimérisation, qui semble indispensable à de nombreuses fonctions, particulièrement dans la régulation de l'activité de divers capteurs-kinases. Le domaine PAS de BvgS est très conservé au sein du complexe *bronchiseptica* (Herrou et al., 2009), ce qui suggère une grande importance fonctionnelle de ce domaine. Afin de mieux appréhender le rôle de ce domaine dans la régulation de l'activité kinase de BvgS, nous avons entrepris une caractérisation de ce domaine par diverses approches.

A. Etudes de la fonction du domaine PAS

Ainsi nous avons entrepris de caractériser ce domaine tout d'abord par homologie avec des systèmes décrits dans la littérature en recherchant des résidus conservés pour leur probable fixation d'un ligand ou leur rôle dans la signalisation entre le domaine PAS et les domaines en amont et en aval. Nous avons donc mesuré l'effet de substitutions particulières au sein du domaine PAS *in bacterio* par reconstitution du système BvgAS par recombinaison homologue. Des études *in vitro* par construction de protéines recombinantes ont aussi été conduites. Une campagne de cristallisation a été menée avec certaines de ces protéines recombinantes.

Ces résultats ont été mis en valeur par la publication d'un article dans le journal BMC Microbiology (Dupré et al., 2013).

1. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission

2. Résumé

NB : Les figures citées ici sont celles de l'article ci-dessus

Dans ce travail, plusieurs protéines recombinantes ont été produites. Leurs séquences (figure 1) correspondent soit au domaine PAS isolé (N0-C0), donnant une protéine peu soluble vraisemblablement monomérique, ou à ce domaine flanqué d'extensions de différentes longueurs en positions N- et C-terminales (N1, N2 ou N3 en combinaison avec C1, C2 ou C3). J'ai pu participer à la tentative de cristallisation de plusieurs de ces protéines (N2 ou N3 combiné avec C2 ou C3, les plus stables et solubles), mais sans succès. La plus stable d'entre elles (N2-C3) a été utilisée en spectrométrie de masse non dénaturante afin de déterminer la présence d'un éventuel ligand associé et vérifier sa nature supposée dimérique comme observée au cours des étapes de purification. Aucun ligand n'a pu être identifié par cette technique mais la dimérisation du domaine PAS de BvgS a été confirmée.

Ajoutons ici que les molécules présentes dans le milieu de culture liquide Stainer-Scholte ainsi que les différents acides aminés et divers modulateurs chimiques de la virulence ont été testés quant à leur rôle potentiel de ligand du domaine PAS. Aucun de ces composés n'a montré une capacité de stabilisation significative de la protéine recombinante N2C3 par Thermal-Shift Assay (TSA) et ainsi ces résultats ne seront pas autrement détaillés.

La construction N2-C3 a aussi été utilisée afin de comparer la stabilité entre sa version sauvage et plusieurs variants où un résidu particulier du domaine PAS est substitué en alanine (Table 1). Les différents résidus substitués sont présentés ci-après, ainsi que les phénotypes de mutants pour lesquels ces substitutions ont été introduites dans BvgS complet (Fig. 4).

En absence de structure disponible pour le domaine PAS de BvgS nous avons donc travaillé sur base d'un modèle structural et par homologie avec d'autres systèmes. Différents résidus ont ainsi été remplacés sur la base d'un rôle putatif de perception ou de signalisation par le domaine PAS.

Le résidu H₆₄₃ a été ciblé pour son implication potentielle dans la fixation d'un ligand de type hème par homologie au système FixL. La mutation de ce résidu entraîne une perte de la capacité de modulation chez la bactérie et une diminution significative de la stabilité de la protéine. Il ne semblerait pas que le domaine PAS soit capable de fixer un hème mais le résidu H₆₄₃, avec sa volumineuse chaîne latérale probablement orientée vers sa cavité, permettrait une stabilisation du domaine.

Le domaine PAS de BvgS a été proposé comme possible senseur rédox, à l'instar du système ArcB, qui fait intervenir des résidus cystéine. Des résidus cystéine sont aussi impliqués dans la fixation de cofacteur dans des domaines de la sous-famille LOV de domaines PAS. Or, un seul résidu cystéine est présent dans le domaine PAS de BvgS (C₆₀₇), ce résidu pourrait alors participer à la fixation d'un ligand au sein de la cavité de ce domaine ou percevoir l'état rédox du cytoplasme. Sa substitution en alanine entraîne la perte de sensibilité à la modulation ainsi qu'une diminution significative de la stabilité de la protéine recombinante. La capacité de

réponse à la modulation chimique est altérée, suggérant à nouveau un rôle de la stabilité du domaine PAS dans la transmission du message négatif. En revanche, BvgS reste actif.

Un domaine PAS de *Mycobacterium tuberculosis* a été cristallisé avec un ligand de type acide gras C16. La fixation de ce ligand fait intervenir un résidu arginine présent dans une position similaire dans le domaine PAS de BvgS (R₆₇₀). La mutation de ce résidu n'affecte pas le phénotype de la bactérie et ne déstabilise la protéine recombinante que modérément. Il a été impossible de démontrer la fixation d'un ligand de ce type.

D'autres résidus de cavité, possiblement impliqués dans la fixation de ligands, ont été identifiés (Y₅₉₆ et N₆₃₁). La substitution simultanée en alanine de ces résidus dans BvgS génère un mutant avirulent et une protéine très largement déstabilisée. Cette forte déstabilisation ne conduit cependant pas à la dégradation de BvgS chez *B. pertussis*, mais inactive la protéine. Ceci indique un rôle important de la cavité du domaine PAS dans le maintien de son intégrité structurale, dans sa capacité de transmission d'informations et dans le maintien de la conformation active de BvgS, bien que ceci ne dépende pas nécessairement de sa capacité de fixation d'un ligand.

Des résidus très conservés dans la famille des domaines PAS (N₆₀₈ et D₆₉₅) sont respectivement impliqués dans des interactions du « noyau » avec les hélices flanquantes N-terminale et C-terminale. La substitution de chacun de ces résidus séparément entraîne un phénotype avirulent *in bacterio* bien que BvgS soit détecté. Les protéines recombinantes résultantes sont très fortement déstabilisées et moins solubles (le variant N_{608A} particulièrement) mais semblent conserver leur capacité de dimérisation..

Ces résultats indiquent la nécessité d'un repliement « stable » du domaine PAS pour permettre un bon fonctionnement du système. La cavité du domaine PAS doit être intacte pour maintenir la stabilité du domaine. Autrement, en fonction de l'effet plus ou moins prononcé sur la stabilité du domaine, une substitution va entraîner la perte de sensibilité à la modulation du système ou son inactivation complète. La cavité du domaine PAS serait ainsi nécessaire à sa stabilité et donc à sa capacité de transmission et de maintien des messages perçus en amont. Le couplage du domaine PAS avec ses hélices flanquantes est aussi crucial dans ces mécanismes. Découplé de l'une d'entre elles, il ne permet plus le maintien de l'activité kinase de BvgS. Ceci indique qu'un message positif proviendrait des domaines amont et serait maintenu et transmis vers la kinase. Ce mécanisme est rendu possible par un repliement « stable » du domaine PAS, dépendant entre autres de l'état de sa cavité mais aussi du couplage avec les hélices flanquantes.

Le couplage entre le « noyau » du domaine PAS et l'hélice flanquante du côté N-terminal pourrait se faire en partie au travers de la boucle formée entre les brins H β et I β . En effet, différentes substitutions dans cette zone et dans cette hélice, donc possiblement en contact avec la boucle HI, ont été rapportées comme rendant le système insensible à la modulation (Fig. 2). Ainsi, nous suggérons que cette interaction est nécessaire à la transmission d'une information négative provenant du périplasme. Cette transmission se ferait au travers d'une augmentation de la tension du système qui permettrait le passage en conformation inactive de la kinase.

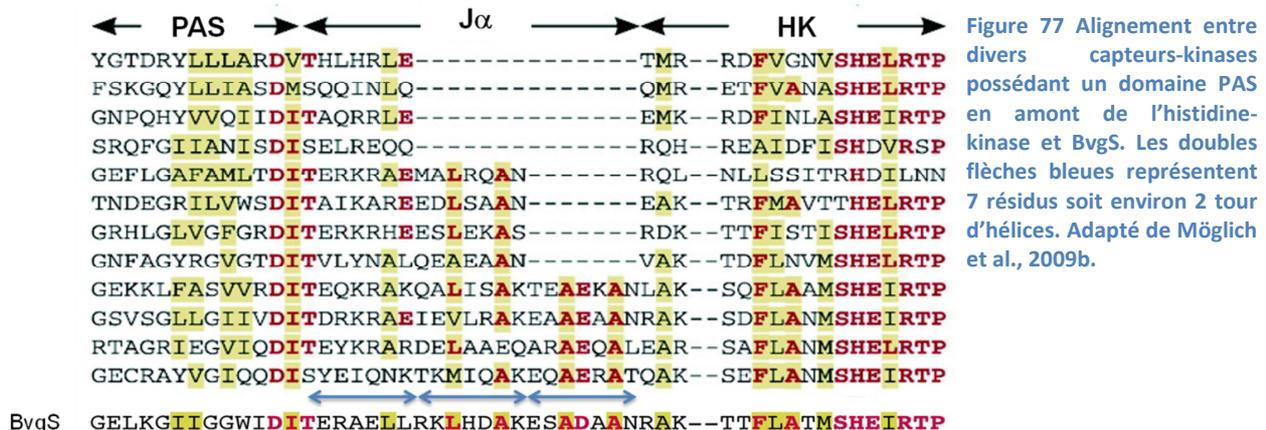
Une tension basale, provenant vraisemblablement des domaines amont, semble nécessaire au maintien de l'activité kinase. Cette tension serait transmise au domaine PAS au travers de sa connexion à l'hélice le précédant. Un repliement stable du domaine PAS serait alors nécessaire au maintien de cette tension et donc de l'activité de la kinase. Cette stabilité dépendrait de l'état de la cavité du domaine PAS, du couplage aux hélices flanquantes et fort probablement de sa capacité de dimérisation, vu que ce domaine ne semble stable que sous forme dimérique. Le couplage du domaine PAS avec l'hélice suivante, qui précède donc la kinase, est le dernier point de contrôle dans la transmission des signaux. Il est nécessaire au maintien de l'activité kinase, ce qui indique que le domaine PAS permet bien la transmission d'un message positif à la kinase. Un message négatif peut être intégré par le domaine PAS qui va alors permettre le passage en conformation inactive (ou phosphatase) de la kinase.

B. Les régions flanquantes du domaine PAS

Nous avons donc vu que le domaine PAS sert de lien dans la transmission des informations depuis les domaines périplasmiques vers l'histidine-kinase. Un domaine dont la conformation est plus lâche nuit à la transmission correcte des signaux, positifs ou négatifs. Mais comment ces signaux lui parviennent-ils ? Comment sont-ils transmis à l'histidine-kinase ?

1. Jonction avec l'histidine-kinase

Nous allons donc voir ici la jonction entre le domaine PAS et l'histidine-kinase. Comme nous l'avons décrit précédemment, cette zone est sans doute conformée en hélice α qui s'étend jusqu'au domaine DHP de l'histidine-kinase, lui aussi en hélice α (cf. V.C. Transduction du signal). Ces hélices, dites $J\alpha$, sont prédites pour former un enroulement d'hélices, et donc doivent se caractériser par un enchaînement de résidus dont la longueur peut normalement varier de 7 résidus pour maintenir l'activité du système. L'hélice $J\alpha$ suivant le domaine PAS de BvgS semble répondre aux critères de longueur d'un multiple de 7 résidus, avec 21 résidus (cf. fig. 77).



Nous avons alors cherché un système dont la séquence de l'hélice $J\alpha$ serait au plus proche de celle de BvgS mais dont la longueur serait différente. Ainsi, un capteur-kinase d'une cyanobactérie (WP_009783999 de *Lyngbya* sp. (souche PCC 8106), aussi nommée *L.*

aestuarii CCY9616) s'est avéré très proche en séquence et possède une hélice $J\alpha$ de 28 résidus (cf. fig. 78). Nous avons donc choisi de modifier la longueur de l'hélice $J\alpha$ de BvgS, en l'allongeant, en se basant sur les résidus présents dans cet autre capteur-kinase.

BvgS : QDSLGLKGIIGGWIDITER-----AELLRKLHDAKESADAANRAKTTFLATMSHEIRTPMNAIIGMLE
 WP_XX : RNELGKVRGVIGAFLDVTERKQAEAEEREQLLARERSAREEAEANRIKDEFLLAVLSHELRSPLNPILGWAN

Figure 78 Alignement entre les capteurs-kinases BvgS (BP1877) et WP_009783999. En vert le domaine PAS, en rouge le domaine histidine-kinase. L'hélice $J\alpha$ est représentée en noir et l'insertion des 7 résidus dans cette hélice du capteur de *Lyngbya* sp est en bleu.

a. Matériel et méthodes

Ces expériences ont été réalisées avec Mlle Elodie Lesne, alors étudiante en licence, que j'ai encadrée pendant ma thèse, dans un travail qu'elle a pu mettre en valeur au travers de la réalisation de son mémoire de stage. La démarche expérimentale pour la construction de souches contenant l'insertion de un, deux, trois, quatre ou sept résidus est la même que celle explicitée en VII.A.2.b., en utilisant les couples d'amorces PCR décrites dans le tableau 5 par PCR chevauchante pour reconstruire le fragment BlgII-XbaI (cf. fig.62, pUC19-BvgSmos).

Tableau 5 Liste des amorces de PCR utilisées dans cette étude. Elles sont utilisées en couple avec les amorces BvgBIII UP et BvgXbaI LO décrites dans le tableau 1.

Amorces	Séquence
$J\alpha+1$ UP	5'-AAGGCCGAGCTGCTGCGCAAGCTG-3'
$J\alpha+1$ LO	5'-CTTGCGCAGCAGCTCGGCCTTACGTTTCGGTGATGTTCGATCCA-3'
$J\alpha+2$ UP	5'-AAACAAGCCGAGCTGCTGCGCAAGCTG-3'
$J\alpha+2$ LO	5'-GCGCAGCAGCTCGGCTTGTTTACGTTTCGGTGATGTTCGATCCA-3'
$J\alpha+3$ UP	5'-AAACAAGCTGCCGAGCTGCTGCGCAAGCTG-3'
$J\alpha+3$ LO	5'-CAGCAGCTCGGCAGCTTGTTTTCGGTGATGTTCGATCCA-3'
$J\alpha+4$ UP	5'-AAACAAGCTGAAGCCGAGCTGCTGCGCAAGCTG-3'
$J\alpha+4$ LO	5'-CAGCTCGGCTTCAGCTTGTTTTCGGTGATGTTCGATCCA-3'
$J\alpha+7$ UP	5'-AAACAAGCTGAAGCTGAACGAGCCGAGCTGCTGCGCAAGCTG-3'
$J\alpha+7$ LO	5'-TCGTTTCAGCTTCAGCTTGTTTTCGGTGATGTTCGATCCA-3'

Le plasmide pFUS S1 codant la β -galactosidase sous la dépendance du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique a ensuite été introduit dans les différentes souches recombinantes portant les insertions dans l'hélice $J\alpha$.

Les différents mutants ainsi obtenus ont été cultivés en milieu SS à 37°C sous agitation en présence ou non de modulateurs chimiques afin d'attester de leur activité de virulence.

Les modifications attendues de la périodicité des hélices $J\alpha$ sont représentées schématiquement en figure 79.

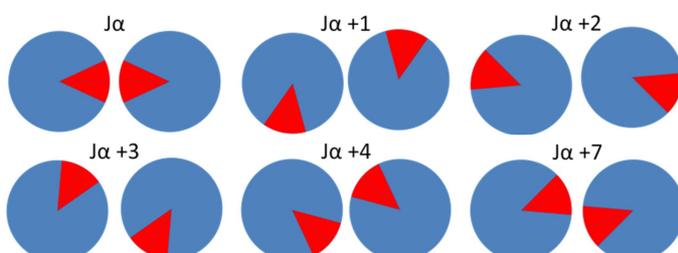


Figure 79 Représentation schématique du positionnement relatif des hélices $J\alpha$ après insertion de différents nombres de résidus en son sein. La portion rouge représente une interface dimérique entre ces hélices (ou entre les hélices du domaine DHp sous-jacent) permissive pour l'activité kinase

b. Résultats et discussion

Malheureusement, aucune des souches ainsi construites n'a conservé une activité détectable de BvgS en utilisant notre système rapporteur habituel *ptx-lacZ* (non représenté) et les mutants semblent avirulents. Deux explications différentes sont alors envisageables à ce niveau.

La première est que le fonctionnement de BvgS diffère des modèles sur lesquels nous sommes basés au niveau de la transmission d'information entre le domaine PAS et l'histidine-kinase. Cette hypothèse est la plus difficilement envisageable. En effet, les domaines PAS sont connus pour réguler l'activité de l'histidine-kinase au travers de l'hélice J α , et donc BvgS devrait suivre cette règle. Nous ne pouvons pas totalement exclure, un contact direct entre les domaines PAS et histidine-kinase, qui a été décrit comme mécanisme de régulation directe de l'activité kinase dans un autre système (Miyatake et al., 2000). Dans ce cas, l'augmentation de la distance entre le domaine PAS de BvgS et son histidine-kinase lors de l'insertion de résidus empêcherait cette interaction directe et ainsi la régulation de l'activité kinase, bloquant le système en conformation inactive.

La seconde hypothèse serait que la perturbation ainsi générée dans l'hélice J α ne permette plus le maintien de l'activité kinase et ceci pourrait s'expliquer de différentes façons. En effet, on s'attendrait à ce que l'insertion de 7 résidus restitue une activité kinase proche de l'activité du sauvage (Möglich et al., 2009b). Cependant, cette insertion de résidus ne correspond pas parfaitement à deux tours d'hélices, mais 700° d'angle, soit -20° par rapport à la condition sauvage. On peut alors supposer que la kinase de BvgS soit très sensible à la position des hélices et que l'angle dans lequel l'activité est permise soit plus restreint que dans les modèles testés précédemment et dont la fonctionnalité est restaurée lors de l'ajout de 7 résidus dans l'hélice J α (Möglich et al., 2009b). Alternativement, il serait possible qu'il y ait une atténuation du message lors de l'allongement de l'hélice, comme cela a parfois été décrit (Falke and Erbse, 2009), et dans notre cas cette atténuation affecterait fortement l'activité kinase. Le choix des résidus a été fait sur la base d'un système dont la séquence est très proche de celle de BvgS à ce niveau, on peut donc supposer qu'il devrait aussi être convenable pour la fonction de BvgS. Cependant, c'est possiblement ce choix de résidus ou encore le site d'intégration choisi qui nuit à l'activité de la kinase.

L'insertion d'un résidu unique dans l'hélice J α du système YF1 a généré un système ayant une activité inversée, son activité kinase s'exprimant à la lumière et non dans l'obscurité (Möglich et al., 2009b). Nous avons donc testé l'hypothèse qu'un tel mutant « +1 » de BvgS pourrait fonctionner inversement par rapport à BvgS sauvage, c'est à dire être inactif à l'état basal et être activé par les modulateurs négatifs de la virulence. Cependant l'ajout de modulateurs lors de la culture d'un tel mutant chez *B. pertussis* n'a pas permis la récupération d'une activité kinase.

Par ailleurs, dans le cas YF1, l'ajout de 4 résidus semble rendre le système non modulable, exprimant en permanence une activité kinase (Möglich et al., 2009b). Dans notre cas, le système BvgS « +4 » reste inactif avec le rapporteur *ptx-lacZ*. Cependant, il a été possible de

détecter une faible production de FHA (non montrée) dans le mutant contenant l'insertion de quatre résidus dans l'hélice $J\alpha$ de BvgS chez *B. pertussis*, ce qui semble indiquer une activité résiduelle de la kinase de BvgS dans ce mutant. Rappelons ici que le gène *fhaB* est un gène précoce du régulon Bvg, c'est à dire qu'une faible quantité de BvgA phosphorylé suffit à son expression. Ceci contraste avec les gènes *ptx*, qui sont tardifs et nécessitent de grandes quantités de BvgA phosphorylé pour être transcrits. Ce résultat indiquerait donc que l'activité de BvgS n'est pas totalement abolie dans ce mutant. La modification attendue pour la position des hélices par rapport à la situation sauvage est d'un angle de $+40^\circ$ ($4 \times 10^\circ$), ce qui semblerait maintenir une activité résiduelle du système. La production de FHA semble indépendante de l'ajout de modulateurs, dans la mesure où les concentrations normalement inhibitrices de l'activité kinase de BvgS ne modifient pas cette production (non représenté). Pour quantifier ces résultats, il serait utile d'insérer le rapporteur *lacZ* sous contrôle du promoteur de *fhaB*, ce qui n'a pu être réalisé faute de temps.

On peut donc supposer que le phénotype avirulent de la plupart des mutants construits ici reflète **un mécanisme d'atténuation dû à la longueur de l'hélice $J\alpha$ ou la nécessité d'une orientation rotationnelle relative des deux hélices selon un angle assez restreint pour le maintien de l'activité de l'histidine-kinase chez BvgS**. Une interaction directe entre le domaine PAS et l'histidine-kinase de BvgS ne peut cependant pas être totalement exclue.

Il reste donc difficile de comprendre les phénotypes observés. Particulièrement, pourquoi une modification de l'arrangement de ces hélices de -20° ($J\alpha +7$) semble-t-elle plus drastique encore qu'une modification de 40° ($J\alpha +4$) dans notre cas? En dehors des considérations déjà soulevées, une telle différence pourrait s'expliquer de façon simpliste, en supposant que la zone d'interface permissive pour l'activité kinase (comme représentée en figure 79), ne soit pas parfaitement symétrique dans son état sauvage. En effet, si l'on considère une position initiale de -15° par exemple (le 0 représentant la position parfaitement symétrique), et en restreignant l'interface permissive à 50° d'angle, le décalage de positionnement généré par l'insertion de 4 ou 7 résidus pourrait expliquer une telle différence. Dans ce cas, l'interface permissive pour l'activité kinase serait encore partiellement accessible après insertion de 4 résidus, mais bien plus difficilement après insertion de 7 résidus (Fig. 80). Un tel mécanisme simpliste pourrait refléter en partie une réalité mécanistique, et dans ce modèle, **c'est l'interface dimérique entre les hélices $J\alpha$ et entre les hélices du domaine DHp qui serait la clé de la régulation de l'activité kinase**. Une telle interface permissive pour l'activité kinase serait permise dans une gamme d'angle relativement restreinte permettant une régulation fine de l'activité kinase.

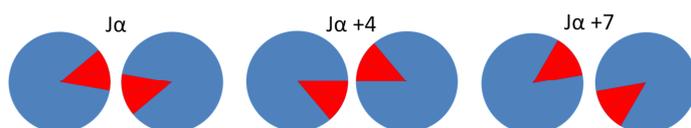


Figure 80 : Représentation schématique du positionnement des hélices $J\alpha$ dans leur position sauvage ou après insertion de 4 ou 7 résidus. La portion rouge représente la zone d'interface permissive pour l'activité kinase.

2. Jonction avec les domaines en amont

Le domaine PAS de BvgS est relié aux domaines en amont grâce à une séquence protéique prédite en hélice α . Au sein d'un dimère, ces hélices seraient capables de former elles aussi un domaine de type coiled-coil. Comme discuté précédemment (cf. VIII.A.1.), ces hélices seraient potentiellement en interaction avec la boucle située entre les brins H β et I β du domaine PAS. Diverses substitutions situées dans cette boucle et dans l'hélice susnommée ont été rapportées dans la littérature. D'autre part, à partir de souches rendue avirulentes par certaines substitutions dans les domaines périplasmiques de BvgS, des mutants de BvgS sont apparus qui retrouvaient spontanément leur activité. Les mutants ainsi obtenus semblaient par ailleurs incapables de répondre à la modulation par l'acide nicotinique et le sulfate de magnésium. Nous avons donc choisi de sélectionner ces mutants et de reséquencer le gène *bvgS*, afin d'obtenir un catalogue de mutations compensatoires des défauts périplasmiques..

a. Matériel et Méthodes

Afin de sélectionner des souches redevenues virulentes, des mutants avirulents à cause de substitutions dans les domaines périplasmiques ont été cultivés sur milieu BG agar complété par 10% de sang frais de mouton. Les souches utilisées pour ce faire sont les souches F₃₂₀A, Y₈₁A+E₈₆A, W₅₃₅A ainsi qu'une souche F₇₇A non décrite précédemment, contenant toutes le plasmide rapporteur pFUS S1.

Les cultures se font normalement sur une durée de 2 jours. Les souches ont été passées en cultures successives de nombreuses fois (jusque dix repiquages) par étalement sur gélose fraîche et isolement. Les clones ayant récupérés une activité de BvgS et ainsi leur virulence ont été sélectionnés par apparition d'un halo d'hémolyse (lié à l'activité de l'hémolysine CyaA), autour des colonies. De façon intéressante, lorsque les cultures sur boîte sont prolongées jusqu'à 4 à 5 jours, une plus grande proportion de bactéries retrouve sa capacité de virulence au passage suivant. Ainsi, les passages successifs ont été effectués après ce temps de culture une fois cette observation faite.

Les souches virulentes ainsi obtenues ont été reséquencées pour couvrir la région codant les domaines VFT1, VFT2 et PAS (fragments de PCR SpeI-BamHI, BamHI-BglII et BglII-XbaI). Ces souches possédant un système rapporteur, leur niveau d'activité ainsi que leur capacité de réponse face à des concentrations élevées (normalement inhibitrices) de modulateurs ont été vérifiés.

b. Résultats et discussion

De façon intéressante, les mutations des domaines périplasmiques étant toujours présentes, de nouvelles mutations étaient apparues au niveau du fragment BglII-XbaI, codant la portion de BvgS comprenant le domaine PAS et l'hélice en amont. Quelque soit la souche utilisée, ces observations sont restées valables. De plus, entre les différentes souches portant des mutations initiales différentes dans le domaine périplasmique, il est arrivé régulièrement de retrouver la même mutation dans le domaine cytoplasmique, indiquant que le mécanisme permettant la

réactivation du système n'est pas dépendant de la nature de la mutation qui inactive BvgS dans son domaine périplasmique.

Les mutations réactivant le système se font, dans tous les cas observés, par la modification d'une seule base au niveau de la séquence ADN, le plus fréquemment par transition mais aussi par transversion (la fréquence naturelle de la transition est plus élevée que celle de la transversion). On peut donc supposer que ces mutations apparaissent de façon aléatoire en suivant la fréquence naturelle de mutation. L'observation d'une augmentation de la fréquence d'apparition de telles mutations lorsque les cultures sont prolongées pourrait refléter une augmentation de la fréquence globale de mutation dans un contexte de stress général, qui serait lié ici à une carence nutritive.

Les fréquences de mutation en conditions standard de culture ou en culture « prolongée », générant probablement un stress, n'ont pas été évaluées. Les différentes mutations ainsi obtenues, et celles déjà citées dans la littérature comme rendant le système non modulable, sont représentées en figure 81 par la substitution générées au niveau protéique.

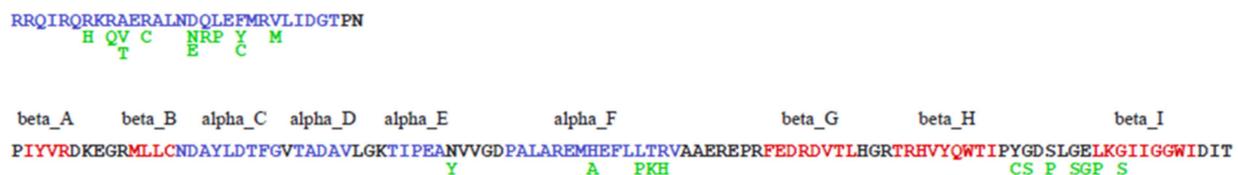


Figure 81 Représentation de la séquence protéique de la portion de BvgS pouvant contenir des substitutions rendant le système non modulable. La couleur bleue représente les hélices alpha, le rouge les brins bêta et le noir une zone non structurée dans les prédictions de structures secondaires. La première ligne correspond à l'hélice cytoplasmique reliant le segment transmembranaire au domaine PAS, lui-même représenté en seconde ligne. Les substitutions empêchant la modulation du système sont reprises en vert à leurs positions respectives sous la séquence initiale.

Les mutations sont donc particulièrement représentées au niveau de l'hélice précédant le domaine PAS et dans la boucle située entre les brins H β et I β de ce domaine (dénommée ci-après boucle HI). On retrouve aussi quelques mutations dans les hélices E α et F α , décrites comme critiques pour la signalisation dans de nombreux systèmes comme exposé dans la partie V, et ainsi il n'est pas surprenant que ces hélices soient aussi représentées.

En revanche, il est surprenant de trouver des substitutions assez conservatrices (D vers E, F vers Y...) et qui ont pourtant un effet drastique sur la capacité du système à répondre à la modulation. Notre hypothèse est que **ces substitutions affaibliraient modérément l'interaction entre l'hélice en amont de PAS et la boucle HI du domaine PAS**. Selon notre modèle expliqué plus haut, **la modulation génèrerait une tension supplémentaire qui nécessite une interaction relativement stable entre ces éléments structuraux pour être transmise**. En présence de ces mutations, la tension supplémentaire ne peut plus être transmise.

D'un autre côté, dans les mutants initiaux utilisés, le signal positif périplasmique est interrompu. Ainsi, on peut supposer que la perte d'activité proviendrait d'une mauvaise conformation de H19, qui impose alors une contrainte « négative » sur le domaine PAS (*i.e.* différente de la contrainte « activatrice » qui existe chez BvgS sauvage), avec comme

conséquence une perte de l'activité kinase. Un affaiblissement, même mineur, de l'interaction entre la boucle HI et l'hélice N-terminale flanquante, qui prolonge H19 (dénommée ci-après hélice de jonction H19), libèrerait une partie de cette tension et permettrait alors le bon repositionnement des interfaces du domaine PAS pour la transmission d'un signal activateur à la kinase. Ce positionnement correspondrait environ à celui adopté en présence d'un signal positif périplasmique dans le cas sauvage, sauf que la petite perte de tension empêcherait la transmission des signaux négatifs « nicotinate » provenant du périplasme.

Dans BvgS sauvage, la boucle HI semble donc primordiale au maintien de cette conformation tout comme, sans doute, la longue hélice de jonction H19 elle-même. Dans un tel cas de figure, les domaines périplasmiques seraient les acteurs majeurs de la régulation de l'activité kinase au travers de la conformation qu'ils imposent à l'hélice H19 et donc à la longue hélice de jonction H19. Le domaine PAS intégrerait les signaux périplasmiques au travers de cette hélice et par une connexion entre celle-ci et la boucle HI. L'état basal actif des domaines périplasmiques permettrait donc d'amener le domaine PAS en conformation activatrice, état qui serait similaire à sa conformation par défaut, en absence de contraintes fournies par l'amont, sans doute grâce au positionnement optimal de son interface dimérique. Cet état actif peut être perturbé lorsque le couplage avec l'amont ou l'aval est rompu ou lorsque le « noyau » PAS lui-même est fortement déstabilisé, ou encore en présence de modulateurs générant un message négatif périplasmique. L'état avirulent des mutants N608A et N608S indiquerait alors qu'une trop forte déstabilisation au niveau de la jonction amont du domaine PAS empêcherait la conformation normale et activatrice, certainement par perturbation de l'interface dimérique de ce domaine, nécessaire au maintien en état actif du domaine histidine-kinase.

D'autre part, la portion cytoplasmique de BvgS isolée en solution possède une activité kinase *in vitro* (Bock and Gross, 2002). On peut imaginer que la conformation du domaine PAS est alors peu contrainte par l'hélice en amont, comme dans les différents mutants non modulables décrits ici, et adopte alors une conformation activatrice « par défaut », ce qui est cohérent avec notre modèle. Dans BvgS complet, la conformation de l'hélice de jonction H19 et les contraintes qu'elle impose au domaine PAS apparaissent être le point clé de la régulation de l'activité kinase, le domaine PAS semblant être un relais du message, et possiblement un point de contrôle final. Comprendre l'agencement de cette hélice serait alors critique pour la compréhension globale de la transduction des signaux périplasmiques.

3. Délétion du domaine PAS

Les différentes expériences menées jusqu'ici n'ont pas permis de montrer la fixation d'un ligand par le domaine PAS. Les différentes évidences accumulées jusqu'ici n'excluent pas cette hypothèse de fixation de ligand, mais il semblerait que le rôle principal du domaine PAS soit un rôle de transmission mécanique. De plus, il existe plusieurs systèmes contenant des domaines VFT périplasmiques et dépourvus de domaine PAS. Les domaines VFT sont alors reliés directement à la kinase via un segment transmembranaire prédit comme étant prolongé par une hélice α dans le cytoplasme. Dans ces systèmes, ces hélices de jonction entre le domaine membranaire et l'histidine-kinase sont très souvent prédites comme capables de former un enroulement d'hélices. Nous avons donc supposé que le domaine PAS n'était pas indispensable au fonctionnement de ce type de système. Nous avons alors recherché un système homologue ne contenant pas de domaine PAS afin de définir la zone de délétion du domaine pour créer un variant de BvgS dépourvu de domaine PAS. Le capteur-kinase PP_3413 de *Pseudomonas putida* KT2440 a été utilisé comme modèle de capteur contenant deux domaines VFT périplasmiques et dépourvu de domaine PAS, pour sa proximité de séquence avec BvgS au niveau cytoplasmique (Fig. 82).

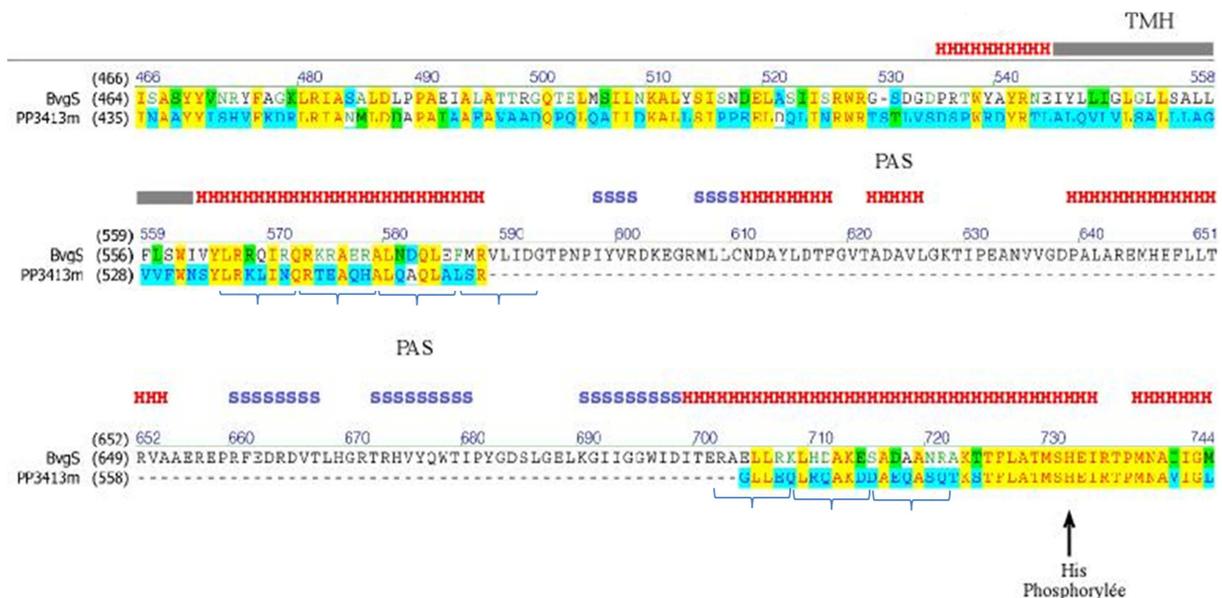


Figure 82 Alignement entre BvgS (BP1877) et PP_3413. Les structures secondaires sont figurées, H pour les portions prédites en hélices α , S pour les portions prédites en brins β . La barre grise correspond à l'hélice transmembranaire prédite (TMH). Le résidu histidine phosphorylable du domaine DHp est indiqué.

a. Matériel et Méthodes

Les expériences suivantes ont été réalisées dans le cadre d'un stage de Mlle Justine Ecotière, étudiante en licence 2 que j'ai encadré pendant ma thèse. Nous avons choisi de construire différentes variantes de la délétion du domaine PAS. Chacune a été construite grâce à un gène synthétique sous forme d'un amplicon du fragment BglII-XbaI, contenant la séquence désirée, inséré dans un vecteur pUC18 (Genecust) pour réintroduction dans notre vecteur pUC19 BvgSmos. La démarche expérimentale de construction des souches est la même que celle explicitée en VII.A.2.b.

Dans un premier temps nous avons voulu supprimer le domaine PAS en conservant la séquence native des hélices flanquantes, de façon à recréer un enroulement d'hélices continu à partir de ces hélices flanquantes. La périodicité en heptade étant peu marquée, il a été décidé de construire plusieurs souches, portant des délétions s'étendant des résidus V₅₈₆ à A₇₀₀ inclus (Δ PAS-1) ou R₅₈₅ à A₇₀₀ inclus (Δ PAS-2) ou M₅₈₄ à A₇₀₀ inclus (Δ PAS-3) ou encore F₅₈₃ à A₇₀₀ inclus (Δ PAS-4). Ceci a été réalisé dans le but d'augmenter nos chances de générer un enroulement d'hélices ayant une périodicité convenable pour l'agencement entre les domaines et permettant une activité kinase. Notons tout de même dans ces séquences le remplacement du résidu E₇₀₁ de BvgS par une glycine, retrouvée dans PP_3413, et la présence de la substitution K₇₀₅E rendant le système plus sensible à la modulation.

Dans un second temps, nous avons choisi de remplacer entièrement ces hélices par l'hélice naturellement trouvée dans le capteur-kinase PP_3413. Ceci a été fait soit en conservant l'hélice transmembranaire de BvgS ou en la remplaçant aussi par l'hélice transmembranaire de PP_3413. Ainsi des mutants portant une délétion des résidus de BvgS R₅₆₄ à E₇₀₁ inclus, remplacés par les résidus de PP_3413 R₅₅₈ à G₅₈₀ inclus (Δ PAS-H), ou portant une délétion des résidus de BvgS L₅₄₄ à E₇₀₁ inclus, remplacés par les résidus de PP_3413 Q₅₃₈ à G₅₈₀ inclus (Δ PAS-TMH), ont été construits. La substitution K₇₀₅E rendant le système plus sensible à la modulation est aussi conservée dans ces constructions.

Après intégration du plasmide rapporteur pFUS-S1, les souches ont été cultivées en milieu Stainer-Scholte à 37°C sous agitation en présence ou non de différentes concentrations de modulateurs.

b. Résultats et discussion

Les souches Δ PAS-1, Δ PAS-2, Δ PAS-3, Δ PAS-4 ont un phénotype avirulent. Elles ne créent pas de halo d'hémolyse sur gélose au sang frais, et leurs activités β -galactosidase sont en deçà de la limite de détection (non représenté) lorsque *lacZ* est sous contrôle du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique. Il semblerait que BvgS ne soit pas fonctionnel dans ces mutants. Afin de vérifier l'absence de facteurs de virulence, une immunodétection de la FHA, produite dès la présence d'une faible quantité de BvgA phosphorylé, a été pratiquée. La protéine n'a pu être détectée que dans le mutant Δ PAS-4 (non montré) indiquant une possible activité résiduelle de l'histidine-kinase qui reste à étudier par l'intégration du plasmide rapporteur pFUS-FHA.

En revanche, les mutants Δ PAS-H et Δ PAS-TMH s'avèrent virulents et capable de générer un halo d'hémolyse sur gélose au sang frais. Cette hémolyse apparaît toutefois de façon plus tardive que chez la bactérie sauvage. Les activités β -galactosidase, sous dépendance du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique, dans les différentes conditions sont rapportées en figure 83.

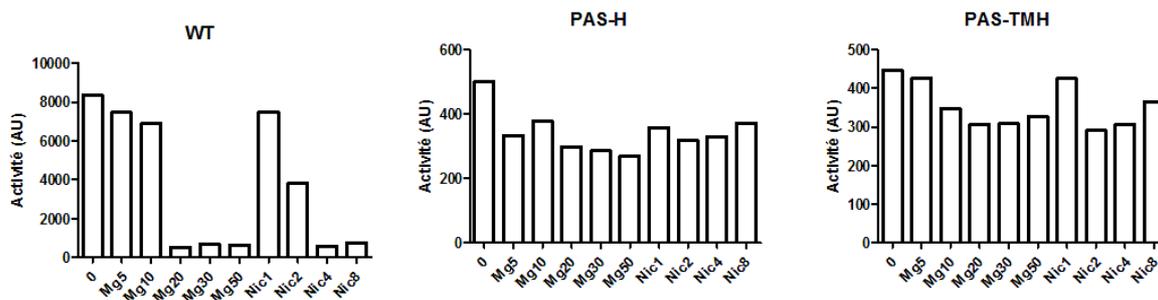


Figure 83 Activités β -galactosidase d'une expérience représentative reflétant l'activité du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique en présence de quantités croissantes de modulateurs dans les souches délétantes du domaine PAS en comparaison avec la souche sauvage (WT). 0 est la condition en absence de modulateurs, MgX représente une condition en présence de X mM de $MgSO_4$ et NicX représente une condition en présence de X mM d'acide nicotinique.

Bien que l'activité soit détectable chez les mutants, elle est très largement réduite, soit d'un facteur vingt environ. Ceci est en accord avec l'apparition tardive de l'hémolyse sur gélose au sang frais. Cette activité est du même niveau que celui obtenu en conditions de modulation chez une bactérie sauvage, mais reflète tout de même une réelle activité car elle est aisément mesurable. Lorsque le système est totalement inactivé, les activités sont non mesurables. En effet, la cinétique Michaelienne de cet enzyme permet l'obtention d'une vitesse initiale, permettant le calcul d'activité. Or, la qualité de cette mesure est jugée par un facteur (R^2), normalement proche de 1, et lorsque les mutants sont inactifs, les activités « mesurées » sont inférieures à une cinquantaine d'unités, et les coefficients de détermination R^2 mesurés sont généralement inférieurs à 0,7, alors que dans les valeurs d'activités présentées en figure 83 (et ailleurs), R^2 est toujours supérieur ou égal à 0,99. Ainsi, l'activité mesurée ne semble pas être un artefact et **le domaine PAS de BvgS semble dispensable pour l'activité du système**, cependant le niveau d'activité est fortement diminué, suggérant l'importance de ce domaine dans le maintien d'un niveau élevé d'activité basale chez BvgS.

La modulation par les modulateurs chimiques semble inefficace, mais l'activité restant au niveau de celle mesurée ordinairement dans les conditions modulées pour une bactérie sauvage, il est difficile de tirer une conclusion nette. L'utilisation d'un rapporteur pFUS-FHA pourrait permettre de mieux définir l'effet de la délétion du domaine PAS, en effet son expression demandant beaucoup moins de BvgA phosphorylé, on peut s'attendre à voir une activité plus forte du promoteur de ce gène. Ainsi, en conditions modulatrices, il serait plus aisé de dénoter une différence du niveau d'activité.

c. Conclusions et perspectives

Nous avons donc pu obtenir une protéine BvgS active en absence du domaine PAS. Cependant ces résultats préliminaires indiquent que ce système serait largement perturbé et incapable de maintenir un niveau d'activité normale. L'utilisation d'un rapporteur plus sensible, comme la FHA, permettrait sans doute de répondre à la question de la capacité de modulation de ces mutants.

La conservation de l'activité mais particulièrement la diminution de son niveau, entraîne de nombreuses questions. Comment expliquer une activité si faible ? Ce niveau reflète-t-il un

niveau d'activité normal pour les capteurs-kinases ayant des domaines VFT périplasmiques mais pas de domaine PAS ? Aucune donnée n'est disponible pour PP_3413 permettant d'en juger, ni d'ailleurs pour d'autres systèmes de ce type.

On peut spéculer que le niveau d'activité va dépendre de la périodicité des heptades des enroulements d'hélices formés par les hélices de jonction entre ces domaines. En effet, bien que nous ayons utilisé en référence un système fort probablement fonctionnel dans une autre bactérie pour construire un BvgS sans PAS, il est possible que l'agencement de la kinase sous-jacente soit légèrement différent. Dans un tel cas, on peut supposer que le positionnement du domaine DHp dans nos constructions ne soit pas optimal, réduisant de fait l'activité kinase nette.

De plus, on peut supposer que la stabilité de l'enroulement d'hélice va jouer un rôle important dans le niveau d'activité kinase. Par exemple, une interface très stable entre ces hélices permettrait le maintien de l'activité kinase à son niveau optimal, et en relâchant cette interface on aurait une perte conséquente de cette activité. Néanmoins, il est nécessaire que ces interfaces ne soient pas trop stables ou le système ne serait plus modulable, l'enroulement d'hélices serait « fixe » et maintiendrait indéfiniment la conformation active de l'histidine-kinase.

Les effets de la périodicité des heptades sur l'enroulement d'hélices (domaine coiled-coil) et de la stabilité des interfaces de ce domaine ne sont pas exclusifs. Ils peuvent chacun apporter une contribution à la régulation de l'activité kinase. L'importance probable des interfaces à ce niveau n'est pas sans rappeler la contribution des interfaces d'un dimère de domaine PAS dans l'activité du domaine kinase sous-jacent comme cela a été démontré dans le capteur-kinase KinA de *Bacillus subtilis*, régulant en partie les mécanismes de sporulation (Eswaramoorthy and Fujita, 2010; Eswaramoorthy et al., 2009). On peut donc supposer que le domaine PAS de BvgS remplisse un rôle de stabilisation de la forme active de la protéine au travers de ses interfaces, pour maintenir le niveau d'activité de la kinase et pourquoi pas conférer une certaine robustesse au système face à la modulation.

Il serait alors intéressant de modifier le domaine coiled-coil du mutant de délétion pour se rapprocher d'une séquence consensus de type leucine zipper, caractérisé par une interaction dimérique très forte, ou, au contraire, pour le déstabiliser en s'éloignant de ce consensus. De façon complémentaire, il pourrait être intéressant de travailler sur la stabilité de l'interface dimérique entre les domaines PAS d'un dimère de BvgS. Cependant, l'absence d'une structure cristallographique empêche l'identification des résidus impliqués dans cette interface. Ces résidus étant situés dans un feuillet bêta, le décalage dans la prédiction d'un résidu inverserait son positionnement entre cavité et interface.

C. Conclusions des expériences sur le domaine PAS

Nous avons donc vu qu'**un repliement « stable » du domaine PAS semblait nécessaire au bon fonctionnement du système**. En effet, le phénotype de mutants dont le domaine PAS semble déstabilisé est toujours altéré par rapport au sauvage. Ainsi, **la stabilité, ou la rigidité, de ce domaine est une caractéristique nécessaire à l'intégration de signaux provenant des domaines en amont**, positif (conformation basale de BvgS) comme négatif (perception du nicotinate par VFT2). Par ailleurs, **un couplage entre l'hélice amont et le domaine PAS au travers de sa boucle HI semble aussi un point critique dans l'intégration du message négatif**. La cavité du domaine PAS joue un rôle déterminant dans sa stabilité et donc, un défaut « léger », déstabilisant le domaine relativement modérément, va nuire à la transmission du signal négatif.

Les domaines périplasmiques semblent aussi fournir un message positif définissant l'activité basale du système. **Le couplage du domaine PAS avec l'hélice le précédant est nécessaire au maintien de ce message positif périplasmique**, comme le montrent les mutants de N₆₀₈. Ce message positif nécessite lui aussi que le domaine PAS soit relativement stable, et par exemple une trop forte perturbation de sa cavité empêche la transmission des signaux positifs. On peut supposer que, dans ces conditions, le domaine PAS ne soit plus capable de maintenir les signaux provenant des domaines en amont ; il serait intégré au niveau de la connexion avec l'hélice précédente mais serait dissipé par manque de stabilité du domaine PAS et ainsi ne pourrait plus être transmis vers l'hélice J α .

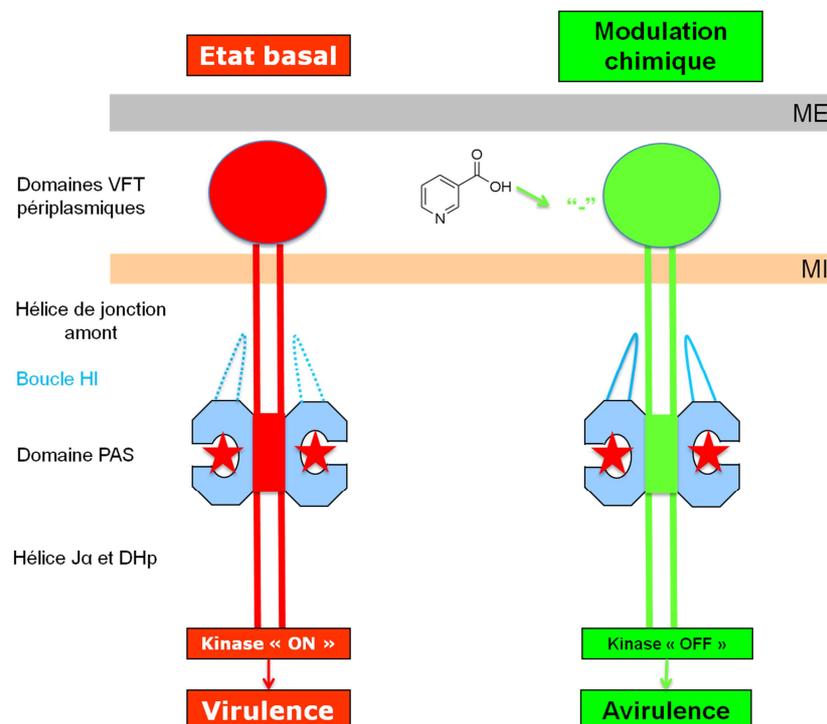
La stabilité du domaine PAS pourrait aussi être liée à sa capacité de dimérisation. En effet, toutes les protéines recombinantes du domaine PAS générées sont dimériques, et la dimérisation semble nécessaire au maintien d'un domaine soluble et dans une conformation convenable, lui conférant une stabilité suffisante pour l'intégration des signaux. D'autre part, le fonctionnement dimérique des différents domaines de BvgS semble aujourd'hui certain, et donc les interfaces dimériques semblent importantes dans l'activité du système. Ainsi, entre les domaines PAS, **une interface dimérique stable semble nécessaire au maintien du niveau d'activité de l'histidine-kinase**, comme suggéré par l'obtention de mutants ne possédant plus ce domaine et ne conservant qu'une faible activité de virulence. Cette baisse du niveau d'activité tendrait à suggérer que les positionnements des hélices en amont et en aval du domaine PAS définissent l'activité du système. Les interfaces du dimère de BvgS entre ses domaines PAS seraient alors nécessaires au maintien de la position de ces hélices, particulièrement l'hélice J α , qui va déterminer l'activité kinase. **Le bon positionnement des interfaces du dimère va alors maintenir l'activité kinase. Une modification de cette interface**, provoquée par exemple par un changement conformationnel transmis par l'hélice amont du domaine PAS, **entraînerait alors une modification de la position des hélices J α et ainsi du domaine DHP de la kinase. L'histidine kinase serait alors en conformation inactive** (ou phosphatase).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la fixation d'un ligand ou d'un cofacteur dans le domaine PAS. Cependant **il n'est pas exclu qu'un ligand puisse se fixer dans le domaine PAS** au vu de la grande conservation de la cavité. De plus, **l'intégrité de sa cavité est**

indispensable à la bonne transmission des signaux amont, qui seraient autrement dissipés. Dans un tel contexte, on peut supposer que la présence d'un ligand, probablement un petit métabolite, contribue à la stabilité du domaine dans BvgS complet et permette la transduction des signaux positifs de par cette stabilité. En absence de ce ligand, le signal positif provenant des domaines amont serait alors dissipé dans un domaine PAS devenu plus lâche. Cette hypothèse d'un ligand activateur semble la plus plausible dans la mesure où la fixation d'un ligand entraîne généralement une augmentation de la stabilité d'une protéine donnée, qui semble être le point clé de la capacité de transmission de signaux par le domaine PAS de BvgS. Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse d'un ligand qui serait capable d'inactiver le système. Sa fixation entraînerait alors un changement de conformation du domaine PAS, modifiant probablement aussi l'interface dimérique et ainsi l'organisation des hélices $J\alpha$ qui maintiendraient alors la kinase dans une conformation inactive.

Un modèle schématique représentant les phénotypes de nombre des différents mutants de BvgS est présenté en appendice. Les différentes données générées par la caractérisation de ces mutants suggèrent qu'**une tension basale serait générée par les domaines périplasmiques, et qu'elle serait nécessaire au maintien de l'activité kinase. Cette tension serait transmise au domaine PAS au travers de sa connexion à l'hélice le précédant. Le domaine PAS doit alors être suffisamment stable pour transmettre ce signal activateur et ainsi maintenir l'activité de la kinase. Cette stabilité dépendrait de l'état de la cavité du domaine PAS (particulièrement par sa composition mais possiblement la présence ou l'absence d'un ligand), de son couplage aux hélices flanquantes et fort probablement de sa capacité de dimérisation** (fig. 84).

Figure 84 Modèle de l'implication du domaine PAS dans la régulation de l'activité kinase de BvgS. Les domaines périplasmiques sont figurés par un cercle et les différentes hélices par des barres. Le domaine PAS est en bleu et l'interface dimérique est représentée par un rectangle plein. Les domaines suivant le DHP ne sont pas représentés et seul les états actif et inactif de la kinase sont mentionnés. La couleur rouge indique une conformation « activatrice » des domaines et une couleur verte une conformation « inactive ». L'étoile rouge représente un ligand activateur possible (ou l'absence de ligand inhibiteur). La boucle HI, en bleu, est représentée sous forme de trait plein lorsqu'elle contribue à la signalisation, sinon le trait est discontinu. La modulation chimique correspond à la modulation par le nicotinate (représenté) mais pourrait s'appliquer de même au sulfate de magnésium, voire à la température. Les membranes interne (MI) et externe (ME) sont représentées pour refléter la compartimentation des domaines.



IX. La perception de la température

Nous avons jusqu'ici pu déterminer en partie le mécanisme d'action des modulateurs négatifs de type nicotinate au travers du domaine VFT2. La perception du sulfate de magnésium semble quant à elle se faire en divers endroits, probablement en jouant sur la stabilité des interfaces du dimère des domaines périplasmiques. Ce modulateur pourrait aussi être perçu d'autres façons mais aucune évidence d'une zone de perception précise n'a été obtenue. Cependant, BvgS est aussi capable de percevoir un facteur physique et non chimique, la température. Bien que la sensibilité du système BvgAS à la température soit décrite depuis longtemps, les mécanismes de cette sensibilité restent entièrement incompris. La construction de nombreuses souches mutantes dans les différents domaines de perception de BvgS nous a donc amené à tester une sélection d'entre eux pour leur sensibilité à la température.

A. Méthodes

Les différentes souches utilisées et leurs phénotypes quant à la modulation par les composés chimiques sont résumés dans le tableau 6. Elles sont décrites dans les parties précédentes et les différents mutants sont utilisés ici pour leur incapacité à être modulés par l'acide nicotinique et/ou le sulfate de magnésium à l'exception d'une souche utilisée pour son hypersensibilité aux mêmes modulateurs.

Tableau 6 : Les différentes souches utilisées et leur sensibilité aux modulateurs chimiques acide nicotinique et sulfate de magnésium, nd : non déterminé, mutant non modulable. * représente le contexte sensible (K₇₀₅E)

Nom de la souche	Description	Concentration (mM) nécessaire à la modulation par	
		MgSO ₄	Nicotinate
WT _{to}	<i>B. pertussis</i> Tohamal	50	20
WT*	<i>B. pertussis</i> Tohamal K ₇₀₅ E	20	4
W ₂₈₀ A*	WT* W ₂₈₀ A	5	1
W ₅₂₅ A*	WT* W ₅₂₅ A	100	nd
H ₆₄₃ A*	WT* H ₆₄₃ A	nd	nd
C	WT _{to} F ₃₂₀ A R ₅₇₂ Q	nd	nd
D1on	WT _{to} D ₁₇₅ A Y ₁₇₈ A	nd	nd
D2on	WT _{to} F ₃₇₅ E Q ₄₆₁ E	nd	nd

Chaque domaine de perception impliqué dans le transfert ou la perception de l'information négative est ainsi représenté par un mutant ayant perdu cette capacité. Les plasmides contenant le gène rapporteur codant la β -galactosidase sous dépendance du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussique (pFUS-S1) ou sous dépendance du promoteur de la FHA (pFUS-FHA) ont été intégrés dans le génome de ses souches. Le mutant C fait exception, ayant été sélectionné dans une souche possédant le plasmide pFUS-S1, il a été impossible de construire la souche portant le plasmide pFUS-FHA.

Les différentes souches sont cultivées sur milieu BG agar complétement par 10% de sang frais de mouton pendant 48 heures à 37°C puis en milieu liquide Stainer-Scholte sous agitation pendant 24 heures à 37°C. Cette culture sert d'ensemencement à la culture à plus basse température subséquente. L'ensemencement se fait à une densité optique $DO_{600} = 0,15$ pour les cultures à 28°C et $DO_{600} = 0,2$ pour les cultures à 20°C. Le milieu est renouvelé au 4^{ème} jour dans les cultures à 20°C. Les cultures sont récoltées après 2 à 3 jours à 28°C et après 7 à 8 jours à 20°C lorsqu'elles ont atteint une densité optique comprise entre 1,6 et 2. Pour les cultures à 20°C, cette première culture sert aussi d'ensemencement à une subculture menée dans les mêmes conditions, l'opération pouvant être répétée plusieurs fois. A chaque fin de culture à 20°C, les souches ont été remises en culture à 37°C pour vérifier la conservation de leur phénotype. Chaque souche retrouve son niveau d'activité et ses capacités de modulation propres lors de ces tests (non représenté), confirmant que les phénotypes observés ne sont pas liés à des modifications génétiques supplémentaires.

B. Résultats et discussion

1. Modulation d'un gène *vag* tardif

Les premières expériences ont été effectuées dans les souches portant le plasmide pFUS-S1. Les activités correspondant aux cultures à différentes températures et aux passages successifs sont illustrées en figure 85. Les activités basales à 37°C des différents mutants sont sensiblement égales, ainsi seules les activités relatives sont figurées.

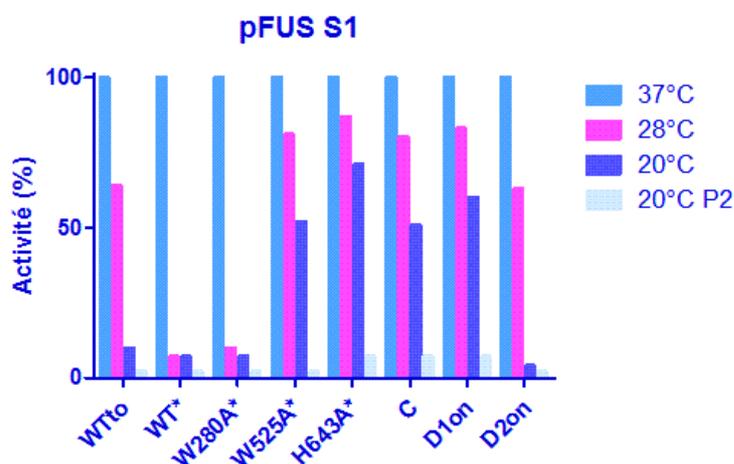


Figure 85 Activité β -galactosidase reflétant l'activité du promoteur de la sous-unité S1 de la toxine pertussive à différentes températures. 20°C P2 représente l'activité d'une culture après un premier passage à 20°C. L'activité est représentée en pourcentage relatif de l'activité à 37°C.

De façon frappante, **il y a une corrélation entre le phénotype de réponse à la modulation par les modulateurs chimiques et la réponse à la température**. Les différents mutants incapables de répondre aux modulateurs chimiques ont une réponse à la température moins efficace. Le mutant D2on semble faire exception en se comportant comme la bactérie sauvage correspondante. Il semblerait que ce mutant soit devenu incapable de percevoir le nicotinate et que sa réponse au sulfate de magnésium ne soit que partiellement altérée comme discuté précédemment (cf. VII.A.3.b). La perception du nicotinate et de la température représentent donc des mécanismes bien distincts. Il serait intéressant de comparer le mutant hypersensible

à la bactérie sauvage à des températures comprises entre 28°C et 37°C afin de déterminer si l'hypersensibilité à la modulation par les modulateurs chimiques se répercute sur la sensibilité à la température. En effet, les températures utilisées ne permettent pas la distinction entre le mutant W_{280A} et la bactérie sauvage correspondante.

On remarque qu'après un premier passage d'adaptation à 20°C, les mutants non modulables par les modulateurs chimiques conservent une activité importante, indiquant que l'activité du promoteur, et donc la virulence, est maintenue sur une grande période à cette température par ces mutants. Cependant, un second passage à 20°C montre une inactivation du promoteur, maintenue dans des passages subséquents (non représentés). Lorsque les bactéries ainsi modulées sont à nouveau cultivées à 37°C, leur phénotype initial est entièrement restauré. **La lenteur de la mise en place de la répression en réponse à de basse température indiquerait que cette réponse soit indirecte**, plutôt que directement liée à BvgS. En effet, son état de signalisation devrait s'adapter au moins un peu plus rapidement à un tel changement si sa capacité de perception n'était pas altérée, comme on peut le voir dans la bactérie sauvage. Cette baisse d'activité pourrait donc faire intervenir un mécanisme autre, pourquoi pas lié au métabolisme, certainement différent entre ces températures.

N'oublions pas que le promoteur régulant l'activité de notre rapporteur est celui d'un gène *vag* tardif, nécessitant une grande quantité de BvgA phosphorylé. On peut supposer que la perte d'activité après le premier passage est liée à une diminution de l'abondance de BvgA de telle sorte que le pool présent soit limitant pour la transactivation de la transcription de ce type de gène. Ceci serait aussi cohérent avec une diminution globale de la production de protéines par la bactérie à plus basse température. Ainsi, nous allons nous intéresser à la modulation de l'activité du promoteur d'un autre gène, *vag* précoce cette fois, la FHA.

2. Modulation d'un gène *vag* précoce

Les expériences ont été réalisées comme précédemment, les activités correspondantes aux différentes températures sont représentées en figure 86. Les activités basales à 37°C des différents mutants sont sensiblement égales, ainsi seules les activités relatives sont figurées

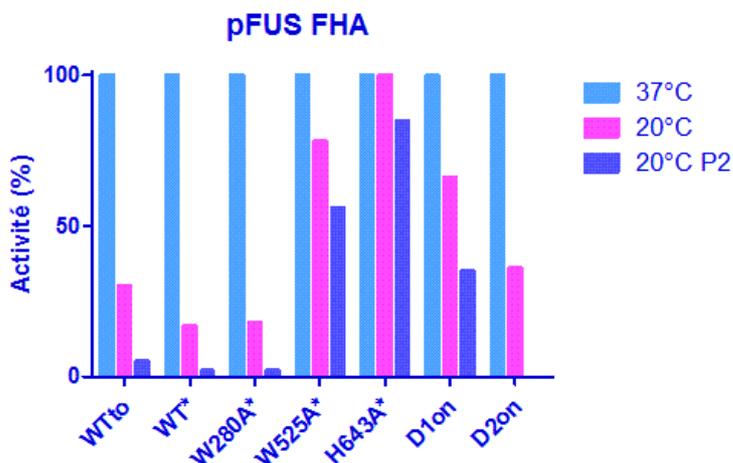


Figure 86 Activité β -galactosidase reflétant l'activité du promoteur de la FHA à 37°C ou 20°C. 20°C P2 représente l'activité d'une culture après un premier passage à 20°C. La valeur est absente pour le mutant D2on dont la culture a échoué pour cette condition. L'activité est représentée en pourcentage relatif de l'activité à 37°C.

On remarque à nouveau que les différents mutants non modulables par les modulateurs chimiques le sont plus difficilement par la température, D2on faisant encore exception. Par ailleurs, lors du second passage à 20°C, il n'y a pas eu de croissance de la bactérie. Son phénotype « sauvage » face à la modulation par la température avec le pFUS-S1 devrait être conservé dans cette situation, et le premier passage à 20°C indique un comportement semblable à celui de la bactérie sauvage.

Avec ce rapporteur, l'activité est maintenue en grande partie au deuxième passage à 20°C dans les mutants non modulables. Ainsi, ils ne semblent pas modulables par la température, mais un troisième passage à 20°C rend l'activité minimale ($\leq 5\%$) pour toutes les souches (non représenté). Cette diminution conséquente de l'activité après adaptation à 20°C est bien réversible à 37°C, comme précédemment, et ainsi **nous conserverons l'hypothèse d'une possible régulation liée au métabolisme**, vraisemblablement non liée à la perception directe de la température par BvgS.

Les différents mutants non modulables sont substitués dans des domaines différents et pourtant ils sont tous relativement insensibles à la température. On peut alors supposer qu'ils sont tous impliqués dans la perception et/ou la transmission du signal négatif. Cependant, le mécanisme et la zone de perception d'un signal négatif provenant d'une baisse de la température restent impossibles à définir avec ces expériences. Différents cas de figure peuvent se présenter.

Le mutant C est très particulier, en effet, dans ce mutant il ne doit plus provenir de messages du périplasma, tout du moins positifs, comme discuté précédemment (cf. VIII.B.2.). On peut donc supposer que dans ce mutant, l'activité de BvgS est maintenue par le domaine PAS, grâce à la mutation compensatrice dans l' « hélice de jonction H19 ». Le domaine PAS donne un message positif à la kinase mais n'est plus capable, non plus, d'intégrer de messages négatifs provenant des domaines en amont. Le domaine PAS étant fonctionnel, on peut croire que si la température était perçue par ce domaine, la modulation devrait pouvoir se faire dans un tel mutant. De même, les mutants des domaines en amont devraient être généralement modulables, vu que la perception par le domaine PAS ne doit pas être altérée, et vu sa proximité avec la kinase, il devrait pouvoir jouer son rôle inhibiteur. Ainsi, **on peut exclure le domaine PAS comme domaine de perception de la température**. L'incapacité à être normalement modulé par la température du mutant H₆₄₃A indique alors que le domaine PAS est nécessaire à la transmission de l'information négative générée par une baisse de température, vraisemblablement perçue en amont. On peut imaginer que, dans ce mutant, la structure plus lâche du domaine PAS (cf. VIII.A.1.) empêche le changement de conformation nécessaire au passage en conformation inactive de la kinase.

La température pourrait être perçue par le domaine VFT1, par exemple en altérant sa mobilité. La mobilité du domaine VFT1 serait le moteur du système, permettant un maintien de l'activité. Dans un tel cas, on peut supposer que la stabilité du domaine VFT1 dans un mutant D1on soit altérée et sa mobilité accrue, permettant un maintien de l'activité du système même à plus basse température. Ce message devrait être relayé jusqu'à la kinase au travers des autres domaines et ainsi les mutants W₅₂₅A, H₆₄₃A ou le mutant C, seraient

incapables de transmettre ce message négatif, et l'histidine-kinase resterait donc active. Le mutant hypersensible reste impossible à distinguer de la bactérie sauvage. Si ce mutant, W₂₈₀A, hypersensible à la modulation chimique, se montrait plus sensible qu'un BvgS sauvage à des températures intermédiaires, ceci soutiendrait un rôle du VFT1 dans la perception de la température.

Cependant, **on ne peut exclure que la température soit perçue au niveau membranaire.** Nous avons vu que la protéine DesK de *Bacillus subtilis* est capable de percevoir la température par ses segments transmembranaires (Cybulski et al., 2010), ce qui reste possible dans BvgS. Cependant, dans un tel cas de figure, l'insensibilité à la modulation par la température de mutants des domaines périplasmiques indiquerait une nécessité de transfert d'information depuis la membrane vers les domaines périplasmiques, puisque des mutations dans ces derniers affectent la réponse à la température. Dans le cas de BvgS sauvage, ces domaines devraient alors adapter leur conformation pour permettre le passage d'un message négatif. En effet, si la température était perçue au niveau membranaire et directement transmise vers la kinase, des mutations des domaines périplasmiques devraient assez peu affecter la sensibilité à la température. Ainsi donc, **les domaines périplasmiques sont importants pour la perception de la température.**

C. Conclusions

Nous avons donc pu déterminer que la perception de la température se faisait en amont du domaine PAS. La température pourrait impliquer les domaines périplasmiques, plus particulièrement en affectant la mobilité du VFT1, mais aussi le segment transmembranaire.

Il est envisageable que ce soit une somme de phénomènes qui permette la sensibilité à la température. Ce serait alors la somme de ces actions qui permettrait le passage en phase avirulente. Il est impossible de définir s'il s'agit de mécanismes distincts et combinatoires, d'un seul mécanisme impliquant la mobilité du VFT1, ou encore d'une perception membranaire qui nécessiterait la répercussion des modifications dans les domaines périplasmiques pour être convenablement intégrée.

Par ailleurs, **l'état métabolique de la bactérie semble déterminant dans l'expression de ses facteurs de virulence.** Comme discuté précédemment, à l'état sauvage, BvgS semble capable de percevoir directement la température. Cependant, les phénotypes des différents mutants insensibles à la modulation chimique dans les expériences de modulation par la température, pourrait indiquer un lien entre la production des facteurs de virulence et le métabolisme. Ceci pourrait être un mécanisme généraliste, mais nos données permettent d'envisager qu'une telle régulation reste liée à BvgS. En effet, son domaine PAS pourrait percevoir un ligand qui serait un petit métabolite. Sa présence serait nécessaire au maintien d'un signal positif par le domaine PAS et donc de l'activité kinase. Une fois cette molécule épuisée, le domaine PAS serait déstabilisé par son absence et empêcherait alors le maintien de l'activité kinase. Alternativement, c'est un métabolite spécifique de la croissance à basse température qui peut se fixer dans le domaine PAS et perturbe alors sa structure, le

contraignant dans une conformation non permissive pour l'activité kinase comme discuté en VIII.C.

Il reste donc impossible de déterminer les mécanismes de la perception de la température et la façon dont cette information négative est transmise à la kinase. Cependant, il semble évident que **les domaines périplasmiques sont importants pour la transmission des signaux négatifs** (modulateurs chimiques ou température) et le passage vers une conformation « inactive » de la protéine. Ainsi, ces domaines seraient particulièrement importants pour le maintien d'une conformation active et doivent être capables d'intégrer une information négative, par changement de conformation et/ou de mobilité pour permettre une inactivation de l'histidine-kinase. **Le domaine PAS serait alors le point de contrôle final dans l'intégration et la transmission de ces signaux périplasmiques**, par exemple en fonction de son état ligandé ou non (fig. 87). Ainsi, le domaine PAS servirait de relais et l'absence d'un métabolite particulier indiquerait une condition défavorable à la production des facteurs de virulence, ce qui permettrait une inactivation directe de la kinase, créant un lien direct entre le métabolisme de la bactérie et son état de virulence au travers d'un mécanisme d'interrupteur.

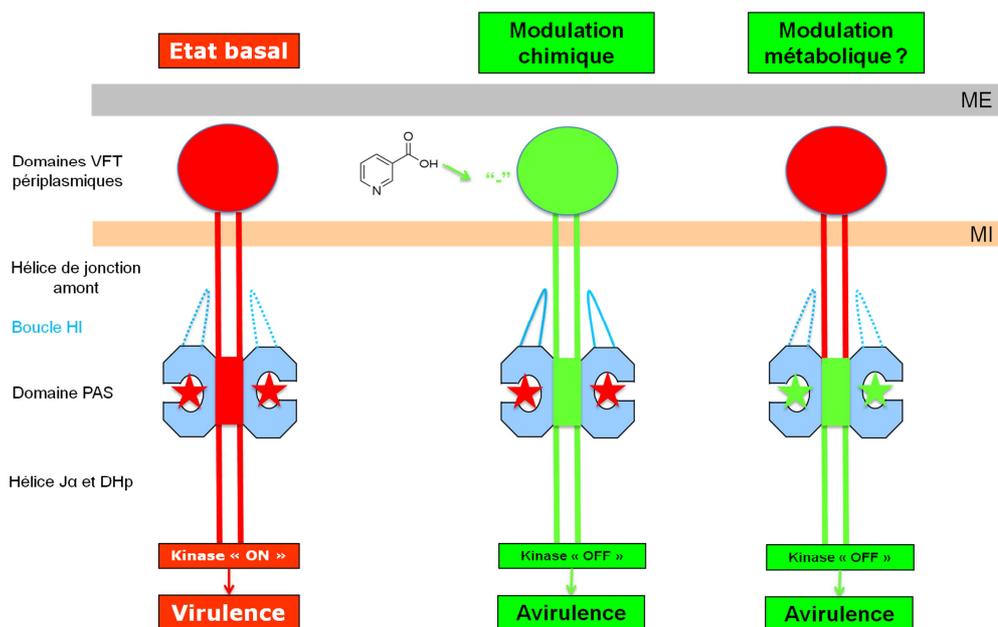


Figure 87 Modèle de l'implication du domaine PAS dans la régulation de l'activité kinase de BvgS. Les domaines périplasmiques sont figurés par un cercle et les différentes hélices par des barres. Le domaine PAS est en bleu et l'interface dimérique est représentée par un rectangle plein. Les domaines suivant le DHP ne sont pas représentés et seul l'état actif ou inactif de la kinase est mentionné. La couleur rouge indique une conformation « activatrice » des domaines et une couleur verte une conformation « inhibitrice ». L'étoile rouge représente un ligand activateur possible (ou l'absence de ligand inhibiteur) et une étoile verte indique l'absence de ligand (ou la présence d'un ligand inhibiteur). La boucle HI, en bleu, est représentée en trait plein, sinon le trait est discontinu. La modulation chimique correspond à la modulation par le nicotinate (représenté) mais pourrait s'appliquer de même au sulfate de magnésium, voire à la température. La modulation métabolique reste entièrement hypothétique. Les membranes interne (MI) et externe (ME) sont représentées pour refléter la compartimentation des domaines.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

X. Conclusions générales et perspectives

Les différentes expériences menées sur les domaines senseurs de BvgS et leurs jonctions nous auront permis de caractériser en partie les mécanismes de régulation de l'activité kinase de BvgS. Les données accumulées démontrent un fonctionnement dimérique, une caractéristique très classique des systèmes de transduction de signal. Cependant, certains aspects de ce fonctionnement semblent inédits et définiraient les bases des mécanismes de perception d'une famille de capteurs-kinases à VFT, dont BvgS est le prototype.

A. BvgS, un système complexe et original

L'obtention de la structure de la portion périplasmique complète de BvgS a révélé une nouvelle organisation architecturale d'un dimère de domaines VFT en tandem. Dans cette structure, les domaines VFT1 sont ouverts et les domaines VFT2 fermés et sont en contact étroit au travers de grandes surfaces, très importantes dans la communication inter-domaine et ainsi dans la transduction des signaux positifs et négatifs. Nous ne reviendrons pas sur le rôle des différentes interfaces et sur les probables contraintes structurales apportées au système, mais elles permettent, *in fine*, le maintien de l'hélice H19 dans une conformation donnée. Cette hélice se prolongerait dans la membrane et dans le cytoplasme jusqu'au domaine PAS, ainsi c'est la conformation de cette longue hélice de jonction des domaines périplasmiques au domaine PAS (hélice de jonction H19, figure 88) qui détermine le signal que le domaine PAS intégrera en vue de sa transmission à l'histidine-kinase au travers de l'hélice $J\alpha$.

La conformation du domaine PAS, particulièrement sa stabilité et celle de ses interfaces dimériques, semble primordiale dans l'intégration correcte des signaux périplasmiques. Jusqu'à présent, des mutants présentant une activité basale intermédiaire n'ont été obtenus que par des substitutions dans les domaines périplasmiques. On peut donc supposer qu'une conformation intermédiaire de ces domaines, par exemple en présence de concentrations intermédiaires de modulateurs, et ainsi de l'hélice de jonction H19, permet de définir une activité intermédiaire de l'histidine kinase. Cette conformation correspondrait à un état de l'histidine-kinase où la phosphorylation reste permise, mais avec une cinétique plus lente par exemple, en raison d'un alignement suboptimal des interfaces des domaines DHp. Ainsi le domaine PAS doit être capable d'intégrer ce signal intermédiaire. Ce domaine servirait donc plutôt de relais de l'information périplasmique, et pourrait alors aussi agir en tant qu'amplificateur du signal. Il pourrait par ailleurs servir d'interrupteur dans l'éventualité d'une modulation « métabolique » comme discuté précédemment (cf. IX.C.). Le message périplasmique est donc intégré par le domaine PAS au travers de l'hélice de jonction H19, pourvu qu'il soit suffisamment stable, et ce message influence son interface dimérique. La conformation de l'hélice $J\alpha$ résulterait de l'intégration des divers signaux au niveau du domaine PAS et serait représentative de l'activité de l'histidine-kinase immédiatement sous-jacente (figure 88). Le positionnement des interfaces dimériques entre ces hélices $J\alpha$ et, *in fine*, entre les hélices du domaine DHp, pourrait être une clé de l'activité du système comme proposé en VIII.B.1. L'état actif ou inactif représenterait alors le bon positionnement ou non de cette interface de dimérisation, un état intermédiaire pouvant refléter une conformation

intermédiaire ou une instabilité de cette interface, en correspondance avec l'état respectif des domaines VFT, des hélices de jonction H19 et des domaines PAS du dimère de BvgS.

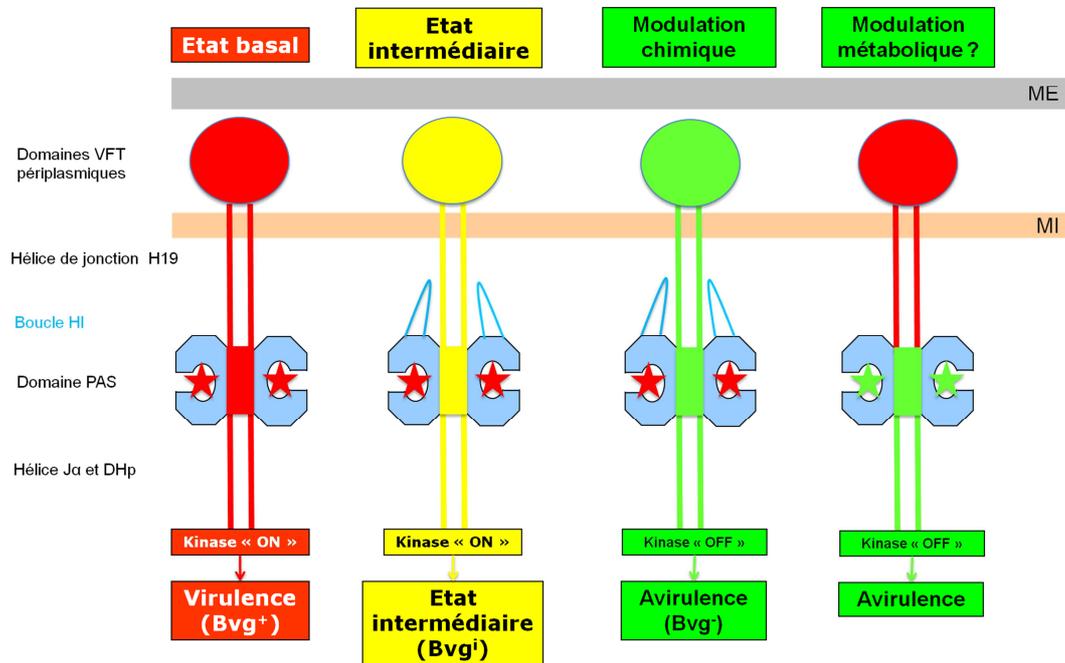


Figure 88 Modèle schématique global de l'intégration des divers signaux dans la régulation de l'activité kinase de BvgS. Le dimère des domaines périplasmiques est figuré par une boule et les différentes hélices par des barres. Le domaine PAS est en bleu et l'interface dimérique est représentée par un rectangle plein. La boucle HI (en bleu) n'est représentée que lorsqu'elle contribue à la signalisation. Les domaines suivant le DHp ne sont pas représentés et seuls les états actifs ou inactifs de la kinase sont mentionnés. La couleur rouge indique une conformation « active » des domaines, la couleur verte une conformation « inactive » (atteintes en présence de concentrations modulatrices de nicotinate particulièrement) et la couleur jaune une conformation intermédiaire (en présence de concentrations intermédiaires de modulateurs). L'étoile rouge dans la cavité du domaine PAS représente un ligand activateur possible (ou l'absence de ligand inhibiteur) et une étoile verte indique l'absence de ligand (ou la présence d'un ligand inhibiteur). La modulation chimique, représentée ici, correspond à divers degrés de modulation (état intermédiaire) par le nicotinate mais pourrait s'appliquer de même au sulfate de magnésium, voire à la température. La modulation métabolique reste hypothétique. Les membranes interne (MI) et externe (ME) sont représentées pour refléter la compartimentation des domaines.

Un modèle de la structure de BvgS, de sa portion N-terminale à son domaine histidine-kinase, a été créé à partir de la structure des domaines périplasmiques et sur base de la structure d'homologues. Bien qu'imparfait, ce modèle permet de mieux se rendre compte des tailles respectives des différents domaines, et plus particulièrement de la longueur des hélices de jonction, notamment H19, ainsi que de l'organisation centrale en domaine « coiled-coil » depuis cette hélice jusqu'au domaine histidine-kinase (figure 89). Un tel modèle, représenté avec une membrane schématique, démontre bien les grandes contraintes subies par le domaine VFT2, étroitement maintenu entre la membrane interne, à proximité de son lobe 2, et les domaines VFT1, dans la conformation dimérique de la portion périplasmique. Il est alors d'autant plus vraisemblable que les modifications structurales apportées par la perception de l'acide nicotinique au niveau de ce domaine, soient limitées, mais suffisantes pour entraîner une modification de la conformation et/ou de la mobilité du domaine VFT1, qui « amplifierait » ce signal négatif, ou atténuerait le message positif normalement transmis par VFT1. La répercussion de ces modifications sur la conformation de l'hélice de jonction H19

reste à étudier. Il est fort probable qu'un mécanisme de torsion / rotation de ces hélices intervienne dans la transduction du signal vers le domaine PAS, de même que pour les hélices de jonction $J\alpha$ depuis le domaine PAS vers l'histidine-kinase (au travers de son domaine DHp).

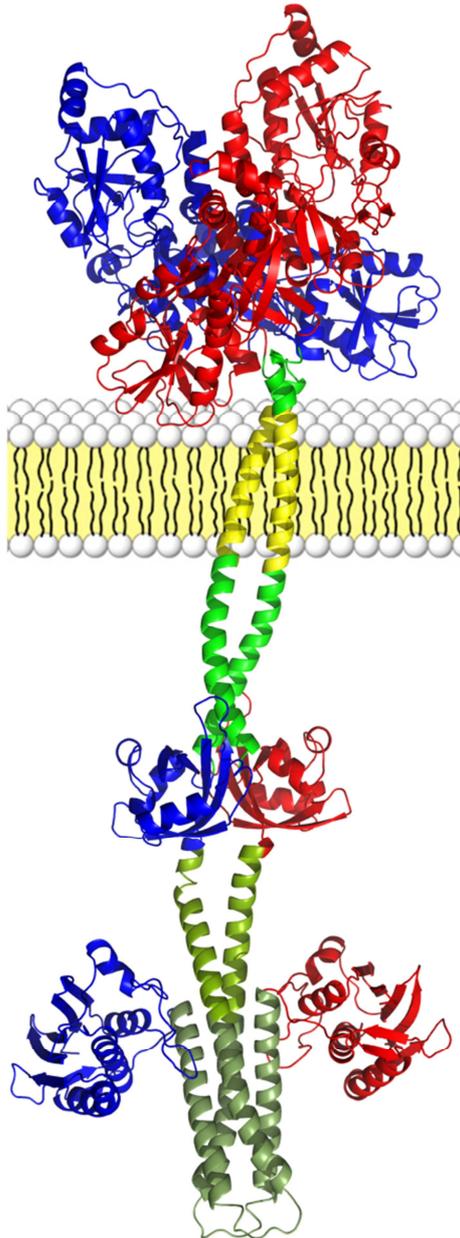


Figure 89 Modèle d'une portion de BvgS allant de sa portion N-terminale au domaine histidine-kinase représentée au sein d'une bicouche lipidique schématique. Les domaines VFT1, VFT2, PAS et le domaine catalytique de l'histidine-kinase sont représentés en bleu dans un monomère et en rouge dans l'autre monomère. Le segment transmembranaire est en jaune au sein de l'hélice de jonction H19 figurée en vert. L'hélice de jonction $J\alpha$ et le domaine DHp de l'histidine kinase sont représentés en nuance de vert. La membrane externe n'est pas représentée.

B. Perspectives

Bien que de nombreuses questions restent sans réponses, BvgS livre peu à peu ses secrets. La réalisation de différentes expériences prévues, et d'autres encore, permettront sans doute de lever le voile sur le fonctionnement de ce système particulier, et ainsi de mieux comprendre les mécanismes de transduction du signal au sein de la famille, ou d'une sous-famille, des capteurs-kinases à VFT.

Entre autres questions, celles qui paraissent les plus importantes sont celles de la conformation des hélices de jonctions H19 et J α , qui permettent la transduction du signal respectivement des domaines périplasmiques vers le domaine PAS puis du domaine PAS vers le domaine histidine-kinase. Comment s'agencent ces hélices pour permettre de moduler l'activité kinase de telle façon que trois états phénotypiques différents puissent être définis ? On pourrait supposer qu'il existe 3 états conformationnels distincts, un état « actif », un état « intermédiaire » et un état « inactif ». De façon alternative, il est possible que l'état intermédiaire représente un équilibre instable entre une conformation active et une conformation inactive, ne permettant ainsi qu'une activité réduite de l'histidine-kinase. Une étude de la formation différentielle de ponts disulfure entre des résidus spécifiques substitués en cystéine dans des conditions différentes de modulation pourrait permettre de définir la conformation de ces hélices. Une telle étude pourrait être menée sur une protéine recombinante produite chez *Escherichia coli* où BvgS semble fonctionnel (Miller et al., 1992).

Une approche de reconstitution d'un système dépourvu de domaine PAS, en modifiant la composition du domaine coiled-coil, recréé artificiellement entre les domaines périplasmiques et le domaine histidine-kinase, pourrait aussi nous renseigner sur la conformation prise par ce type de domaine, et donc sur la conformation du domaine DHp régulant l'activité histidine-kinase. Une telle approche pourrait être tentée à la fois chez *Bordetella pertussis* et chez *E. coli*.

Le domaine PAS de BvgS semble dépourvu de ligands, ce qui suggère que son rôle principal soit la transmission du signal généré par les domaines périplasmiques. Cependant l'hypothèse d'un ligand n'est pas encore exclue. La recherche d'un ligand potentiel par des expériences de Thermal Shift Assay sur une protéine recombinante de ce domaine pourrait permettre de découvrir un tel ligand.

Une toute autre approche serait d'échanger le domaine PAS de BvgS contre un domaine PAS capable de percevoir un paramètre bien défini, comme le domaine LOV photosensible de la protéine YtvA. Ainsi, on pourrait envisager la construction d'une protéine BvgS chimérique dont l'activité serait régulée par la lumière à l'instar de la construction YF1 décrite en partie V.C.3. (Möglich et al., 2009b). Si la capacité de modulation par les modulateurs chimiques perçus par les domaines périplasmiques était maintenue, l'obtention d'une telle construction permettrait aussi de mieux comprendre la transduction du signal des domaines périplasmiques vers le domaine PAS et la retransmission des signaux depuis celui-ci vers le domaine histidine-kinase. La capacité d'obtention de niveaux d'activité intermédiaire de BvgS ou

d'une phase Bvgⁱ d'une souche de *B. pertussis* portant un tel système BvgS hybride modulable, indiquerait aussi de manière formelle l'implication des domaines périplasmiques dans le comportement rhéostatique de BvgS, et une capacité de transmission de ce genre de contraintes « intermédiaires » par un autre domaine PAS. Ceci pourrait de plus indiquer que cette caractéristique de transmission de signaux « intermédiaire » est commune à la famille des domaines PAS.

Les modifications structurales générées par la perception de l'acide nicotinique au niveau du domaine VFT2 et de la portion périplasmique complète restent une énigme et leur identification serait un atout dans la compréhension de la transduction du signal. Des expériences de cristallographie en présence de différents modulateurs pourraient permettre de répondre à une telle question.

Par ailleurs, le domaine VFT2 semble très contraint dans la conformation dimérique de la portion périplasmique de BvgS. La membrane interne pourrait contribuer à ces contraintes en étant probablement très proche du domaine VFT2, particulièrement de son lobe 2. Il est possible que des contacts existent entre ces éléments et qu'ils fassent partie intégrante du mécanisme de régulation de l'activité de BvgS. Cette question pourrait être approchée par la substitution de résidus spécifiques en surface du lobe 2 de VFT2. Par exemple, plusieurs résidus arginine, acide glutamique et acide aspartique, sont présents et pourraient avoir un rôle dans une interaction de ce type.

Au-delà de la compréhension structurale des modifications permettant la régulation de l'activité kinase, approche relativement statique, la mobilité et la dynamique, des domaines périplasmiques particulièrement, semblent importantes pour leur capacité de transmission des signaux positifs et négatifs. Le concept d'instabilité des interfaces introduit plus tôt et permettant une activité intermédiaire n'a d'ailleurs de sens que dans un système dynamique. Des approches *in silico* par dynamique moléculaire à partir de structures cristallographiques, voire de modèles, et des approches *in vitro* par des techniques particulières, comme la RPE par exemple, apportant une vision dynamique de la protéine, devraient aussi permettre une meilleure compréhension des mécanismes de transduction du signal et de régulation de l'activité histidine-kinase.

La majorité de ces approches ont été proposées dans un projet ANR dont le financement a été accordé. On peut donc espérer que de nouvelles découvertes révéleront les mécanismes intimes de la transduction du signal au sein de BvgS et que ces mécanismes puissent être extrapolés à de nombreux autres systèmes, particulièrement de la famille des capteurs-kinases à VFT.

APPENDICE

BvgS of Pathogenic *Bordetellae* : A Paradigm for Sensor kinases with Venus Flytrap Perception Domains

(Jacob-Dubuisson et al., 2012)

Le mini-guide des mutants de BvgS
et de la signalisation négative induite par le nicotinate

Le mini-guide des mutants de BvgS et de la signalisation induite par le nicotinate

Ce mini-guide reprend schématiquement le phénotype de la majorité des mutants générés et caractérisés tout au long de ma thèse. Ils sont intégrés au modèle de signalisation bâti au travers des expériences présentées, afin d'offrir une visualisation schématique globale des informations acquises grâce à eux.

- **Les principes du guide**

Nos données indiqueraient que les domaines VFT vont contraindre la conformation des hélices de jonction H19 afin de transmettre les informations perçues à leur niveau jusqu'au domaine PAS au travers de la membrane. Ainsi, en première partie, ce guide représente schématiquement les domaines périplasmiques et le trajet des différents signaux jusqu'à leur intégration par l'hélice H19. Nous considérons alors que ce signal sera retransmis « fidèlement » (en incluant donc des différences d'intensité) au travers du domaine PAS vers l'histidine-kinase afin de réguler son activité. Le signal positif (« + ») proviendrait du domaine VFT1, de par sa conformation et/ou sa mobilité, et serait transmis vers VFT2 pour permettre le maintien de l'hélice H19 dans sa conformation active.

Dans la seconde partie, seule la transmission des « messages périplasmiques » depuis l'hélice H19 jusqu'à l'histidine-kinase, au travers du domaine PAS, est considérée. Les domaines VFT ne sont donc représentés que sous la forme d'une entité unique, fournissant un message positif ou négatif à l'hélice H19. Ici, nous considérons que le positionnement de l'hélice $J\alpha$ est le message final intégré par l'histidine-kinase au travers de son domaine DHp, et est donc directement représentatif de l'activité kinase.

L'état basal est représenté à gauche et l'état en présence de nicotinate à droite. Lorsque les mutants sont inactifs à l'état basal, ils restent inactifs dans la condition modulée, et on ne peut alors pas déterminer si l'interface ou le résidu en question serait impliquée dans la transmission « négative ».

- **Comment lire ce guide ?**

Les schémas de « la portion périplasmique » représentent les domaines VFT de BvgS avec leurs lobes séparés, ainsi que l'hélice H19 traversant la membrane interne (MI). Les linkers entre domaines VFT ne sont pas représentés, de même que la membrane externe. Le domaine VFT1 est représenté en nuances de bleu, et le domaine VFT2 en nuances de rose en état activateur ou en nuances de jaune à l'état modulé (inactivateur). La combinaison des couleurs rose et orange indique une conformation du VFT2 lié au nicotinate (ou une conformation s'en approchant) mais toujours activatrice. La combinaison des couleurs jaune et rose indique une conformation se rapprochant de l'état modulé (possiblement intermédiaire aux configurations représentées en nuance de rose ou en rose et jaune, ou alternative) mais toujours activatrice. Ces nuances reflètent l'implication directe du domaine VFT2 dans la perception du nicotinate et donc que ce domaine est l'initiateur de la modulation du système, en contrebalançant l'effet activateur du domaine VFT1. Les lobes 1 (L1) et 2 (L2) de chacun des domaines VFT ainsi que l'hélice H19 sont annotés dans un seul des monomères et le trait noir vertical représente l'axe de pseudo-symétrie.

Les flèches rouges unidirectionnelles représentent le trajet de l'information positive au travers des interfaces du dimère de la portion périplasmique (leur implication dans le transfert du message négatif reste non vérifiable). Les flèches vertes indiquent le transfert du message négatif au travers des interfaces du dimère, un trait épais indique alors le renforcement de cette interface. Une double

flèche rouge représente une contrainte non nécessaire au transfert du message positif mais conférant une certaine robustesse face à la modulation (W_{280}). Ces différents éléments ne sont représentés que lorsqu'ils contribuent à la définition de l'activité du système. Un trait noir épais représente la formation d'un pont disulfure entre les lobes des domaines VFT (en pointillé dans le modèle commun aux mutant D2on et $T_{355}C+D_{442}C$). L'acide nicotinique est représenté sous forme moléculaire, et ainsi une plus petite taille, ou un plus grand nombre de molécules, indique la présence de plus faibles, ou plus fortes, concentrations de nicotinate que celles nécessaires à la modulation de l'activité kinase de BvgS sauvage. Dans les différents mutants non modulables, une seule molécule est représentée bien qu'ils ne soient pas affectés par de fortes concentrations de nicotinate (la représentation de la modulation est identique dans les schémas de la portion cytoplasmique).

L'hélice H19 est représentée en rouge dans sa conformation activatrice et en vert dans la conformation non permissive pour l'activité kinase. Les couleurs jaune et orange représentent des activités intermédiaires, reflétant les niveaux d'activités mesurés, le jaune approchant une activité définissant une phase Bvg¹.

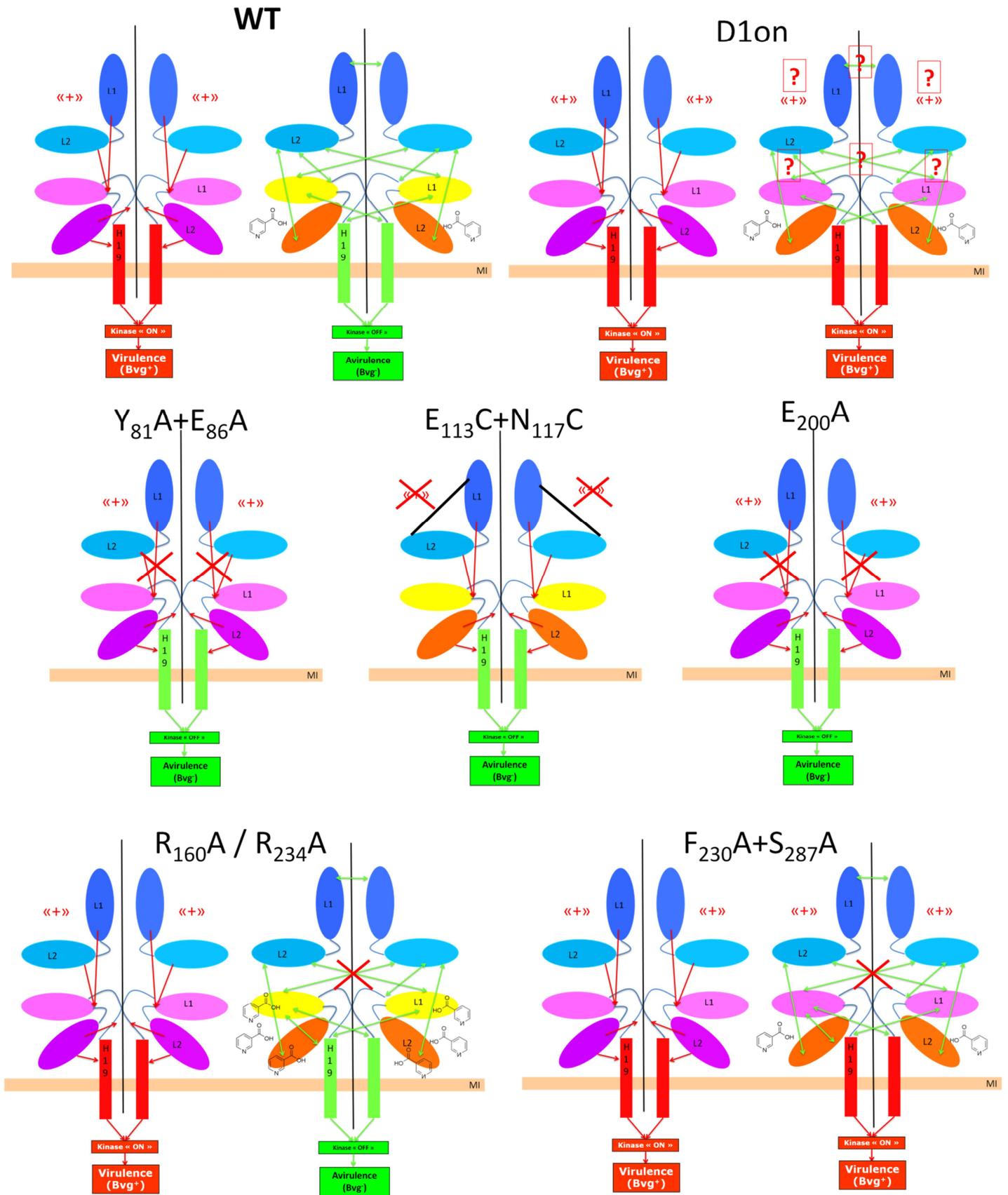
Les croix rouges et noires représentent les perturbations du système, et ainsi le type de signal qui n'est plus intégré. Les points d'interrogation représentent des zones probablement impliquées dans la modification phénotypique des mutants en question. Le point d'exclamation ($F_{317}A$), indique que la mutation perturbe probablement la conformation du domaine VFT2 en l'approchant de l'état fixé au nicotinate, ou en favorisant fortement la fixation du nicotinate (mieux perçu dans ce cas).

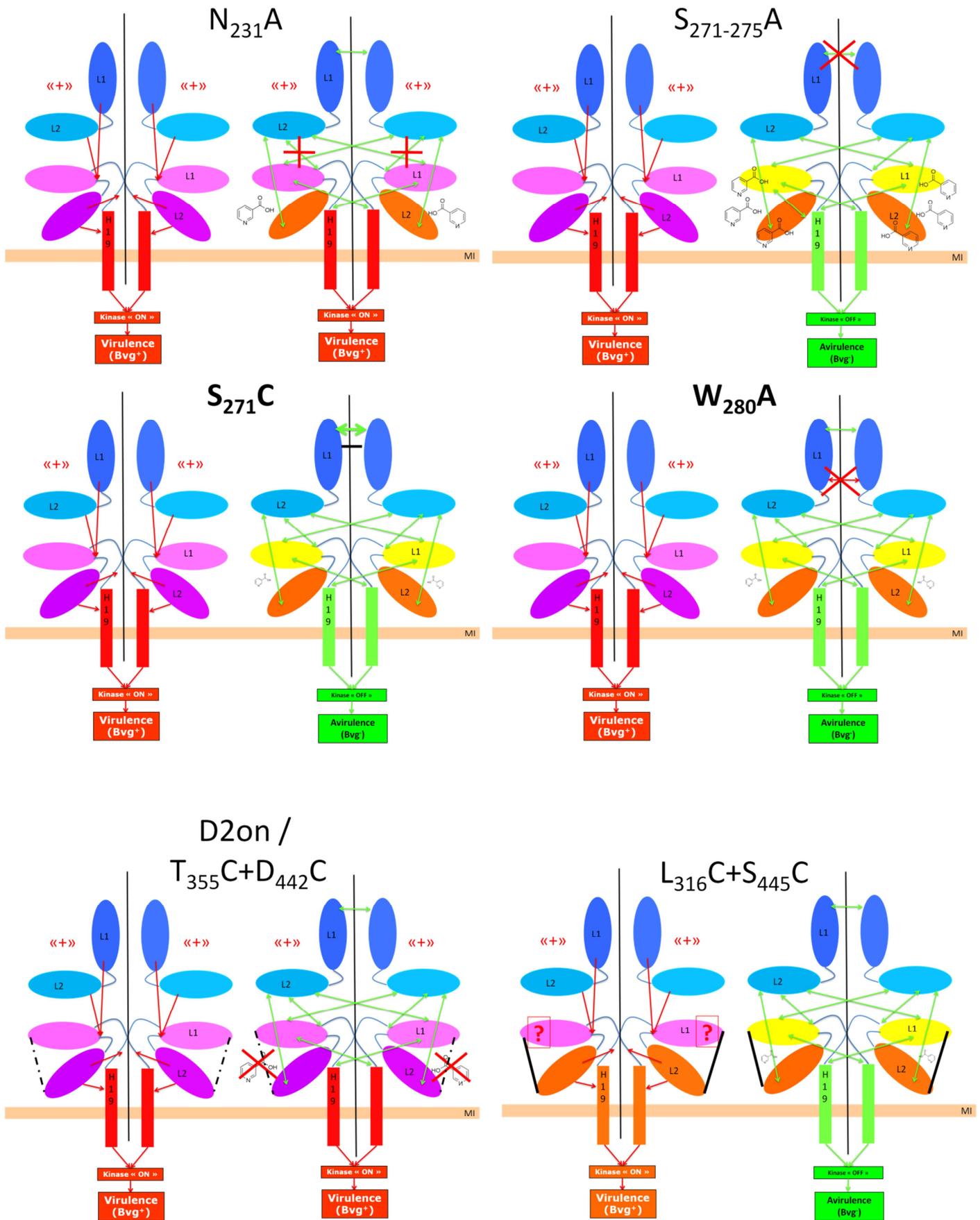
Les schémas de la portion cytoplasmique représentent du haut vers le bas (portions N- vers C-terminales) en un cercle le dimère des domaines VFT, suivi des hélices de jonction H19, enchâssées dans la membrane interne (MI). Le domaine PAS est représenté en bleu avec sa cavité et la boucle HI (en bleu aussi) dans les conditions où elle contribue à la signalisation (transfert des contraintes « négatives » depuis H19). L'interface de dimérisation du domaine PAS est représentée par un carré de couleur et finalement un rectangle représente l'hélice $J\alpha$ et donc la conformation du domaine DHp, ultime point de contrôle de l'activité kinase. L'enroulement d'hélices formé par ce domaine doit posséder des interfaces particulières dont le positionnement reflèterait l'activité kinase sous-jacente. Ces interfaces sont représentées en rouge dans un modèle circulaire simple en dernière figure, la couleur bleue représente ici la conformation activatrice des hélices, les autres couleurs correspondent au code déjà employé.

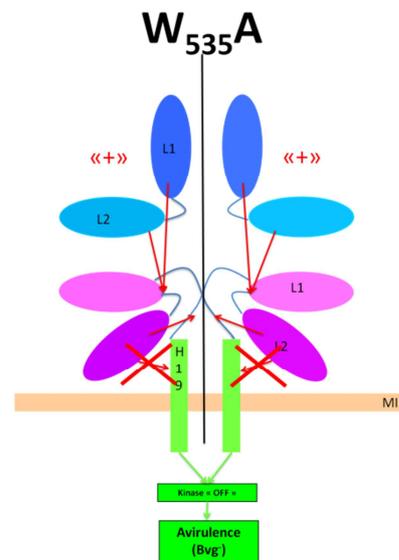
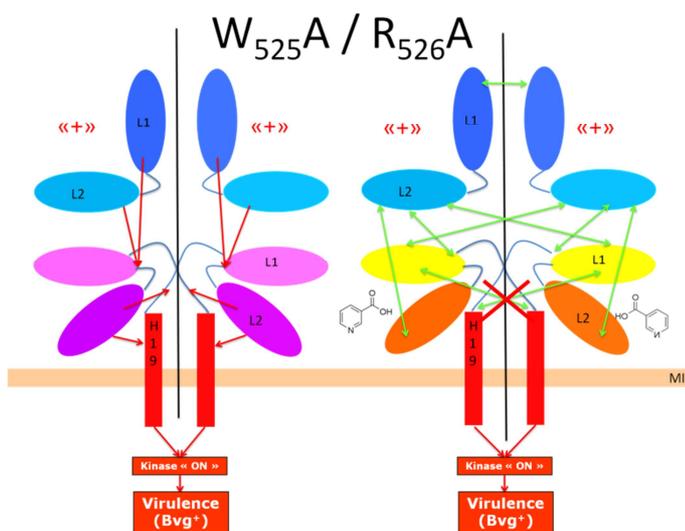
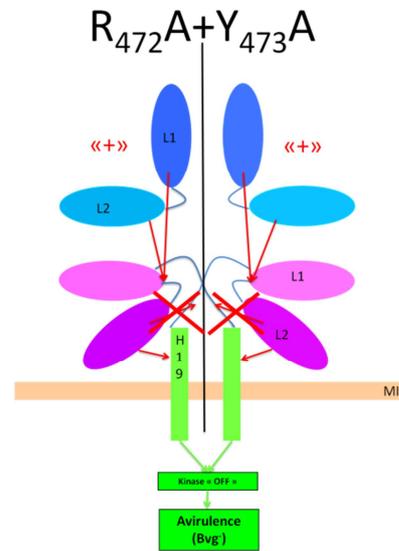
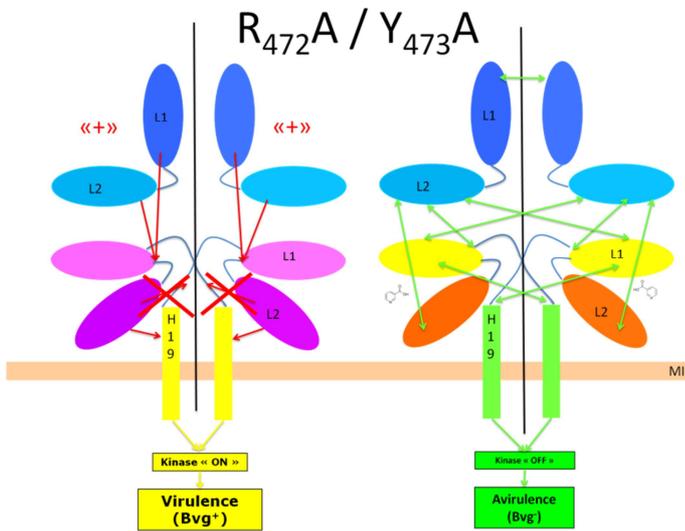
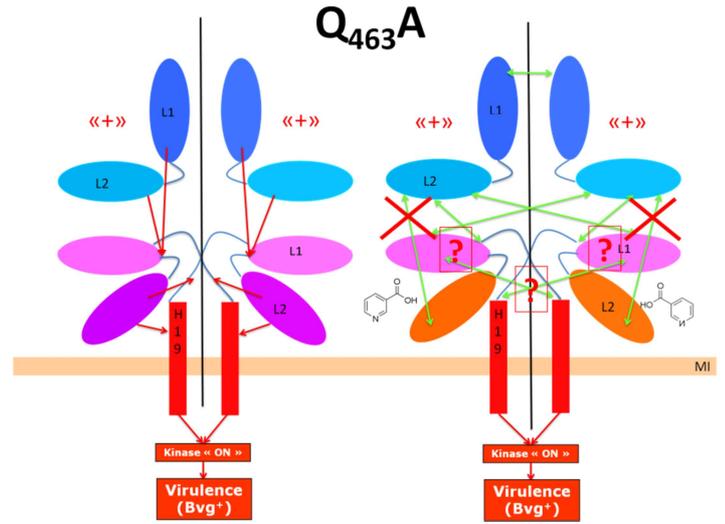
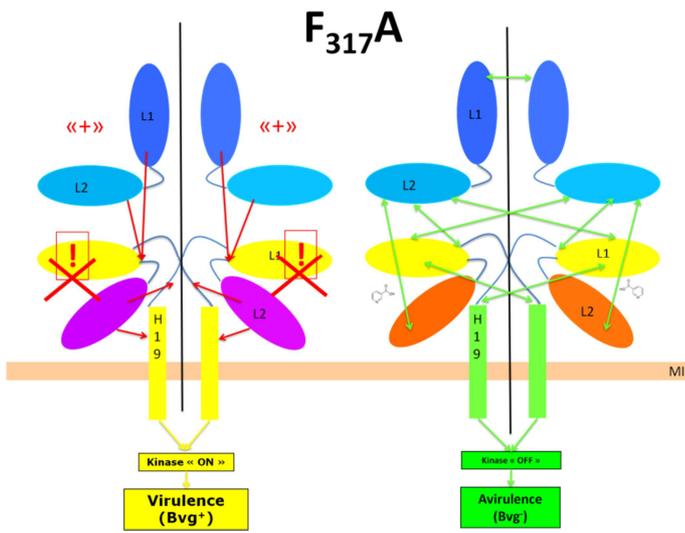
La couleur rouge indique une conformation permissive pour l'activité kinase (ou activatrice) du domaine en question, et la couleur verte une conformation non-permissive. La couleur dégradée des domaines VFT représente toute substitution induisant une conformation de l'hélice de jonction H19 non permissive pour l'activité kinase.

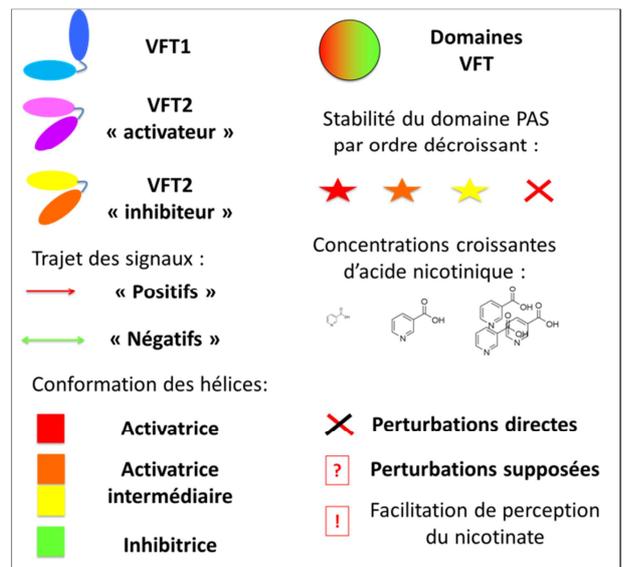
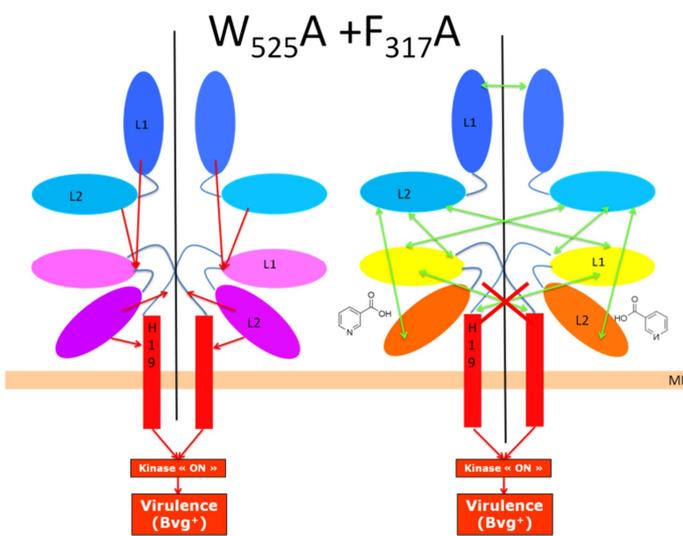
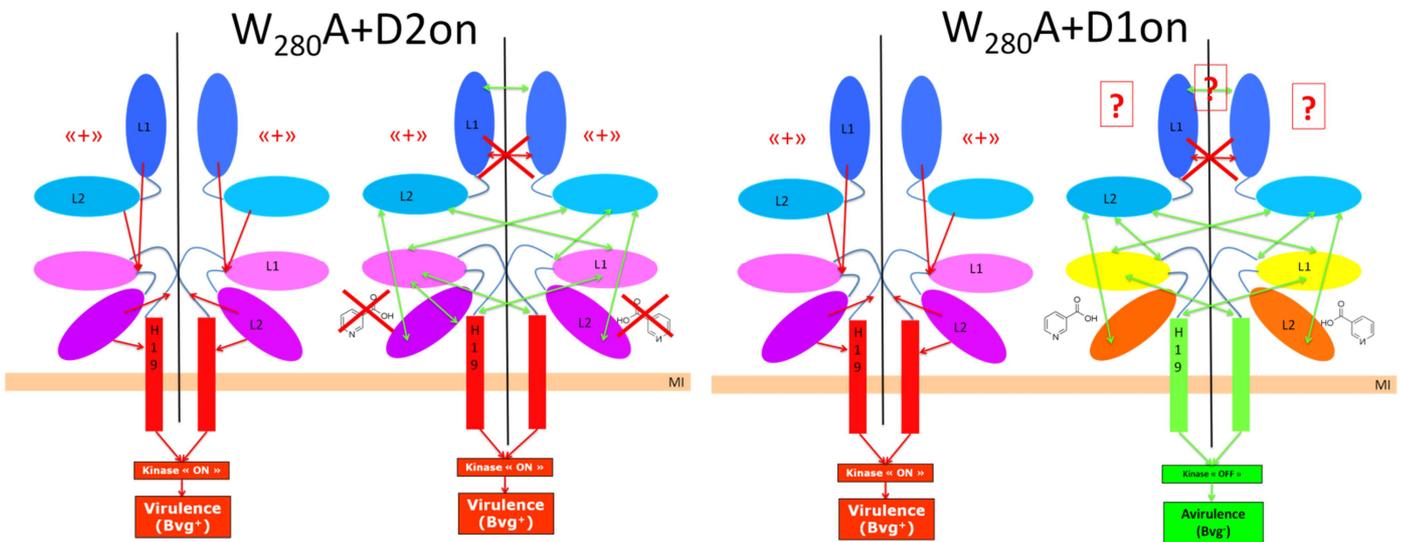
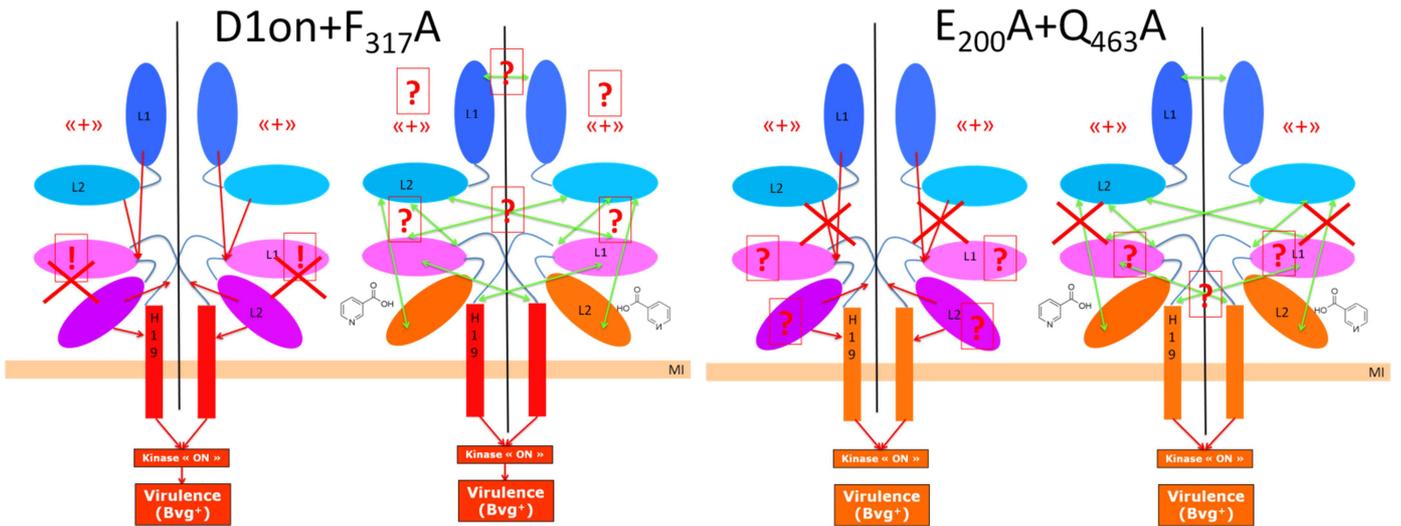
L'étoile rouge, au sein du domaine PAS, représente une conformation stable du domaine et particulièrement de sa cavité, et pourquoi pas la présence d'un ligand. Les étoiles orange et jaune, indiquent une diminution successive de la stabilité de la cavité toujours permissive pour l'activité kinase, mais d'abord permettant la modulation (orange) puis ne la permettant plus (jaune). L'absence d'étoile, alors remplacée par une croix, indique une déstabilisation majeure de la cavité du domaine PAS, et pourquoi pas l'absence d'un ligand, permettant une hypothétique régulation métabolique. Cette conformation du domaine PAS serait non permissive pour l'activité kinase. Les conformations intermédiaires ne sont pas représentées ici, mais elles nécessiteraient vraisemblablement les mêmes contraintes que la condition modulée (interactions H19/HI et stabilité du domaine PAS) pour être transmises.

La portion périplasmique









BIBLIOGRAPHIE

- Adaixo, R., Harley, C. a, Castro-Rodrigues, A.F., and Morais-Cabral, J.H. (2013). Structural properties of PAS domains from the KCNH potassium channels. *PLoS One* 8, e59265.
- Ahier, A., Rondard, P., Gougnard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., Donoghue, D.J., Gauthier, M., Pin, J., and Dissous, C. (2009). A New Family of Receptor Tyrosine Kinases with a Venus Flytrap Binding Domain in Insects and Other Invertebrates Activated by Aminoacids. *PLoS One* 4, e5651.
- Alvarez, A.F., and Georgellis, D. (2010). In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods in Enzymology* 471, 205–228.
- Ames, G.F., Liu, C.E., Joshi, a K., and Nikaido, K. (1996). Liganded and unliganded receptors interact with equal affinity with the membrane complex of periplasmic permeases, a subfamily of traffic ATPases. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 14264–14270.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2000). Cache – a signaling domain common to animal Ca²⁺- channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences* 0004, 535–537.
- Anantharaman, V., Balaji, S., and Aravind, L. (2006). The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biology Direct* 1, 25.
- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2000). New Virulence-Activated and Virulence-Repressed Genes Identified by Systematic Gene Inactivation and Generation of Transcriptional Fusions in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* 182, 5902–5905.
- Antoine, R., Willery, E., Lesjean, S., and Loch, C. (2003). Overrepresentation of a Gene Family Encoding Extracytoplasmic Solute Receptors in *Bordetella*. *Journal of Bacteriology* 185, 1470–1474.
- Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., and Loch, C. (2005). The Periplasmic Binding Protein of a Tripartite Tricarboxylate Transporter is Involved in Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* 351, 799–809.
- Arico, B., Millert, J.F., Royt, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., and Rappuoli, R. (1989). Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 6671–6675.
- Ashton, D.M., Sweet, G.D., Somers, J.M., and Kay, W.W. (1980). Citrate transport in *Salmonella typhimurium*: studies with 2-fluoro-L-erythro-citrate as a substrate. *Canadian Journal of Biochemistry* 58, 797–803.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M., and Stock, J.B. (2005). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays* 28, 9–22.
- Baraquet, C., Théraulaz, L., Guiral, M., Lafitte, D., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2006). TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers induction of the Tor respiratory system upon trimethylamine N-oxide electron-acceptor binding in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 38189–38199.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2006). Pore-Forming and Enzymatic Activities of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Synergize in Promoting Lysis of Monocytes. *Infection and Immunity* 74, 2207–2214.
- Beier, D., and Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology* 9, 143–152.
- Bell, C.H., Porter, S.L., Strawson, A., Stuart, D.I., and Armitage, J.P. (2010). Using structural information to change the phosphotransfer specificity of a two-component chemotaxis signalling complex. *PLoS Biology* 8, e1000306.
- Blanke, M.L., and Vandongen, A.M.J. (2008). Constitutive Activation of the N-Methyl-D-aspartate Receptor via Cleft-spanning Disulfide Bonds. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21519–21529.
- Bock, A., and Gross, R. (2002). The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *European Journal of Biochemistry* 269, 3479–3484.
- Bourret, R.B. (2010). Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion in Microbiology* 13, 142–149.
- Bucher, D., Grant, B.J., Markwick, P.R., and McCammon, J.A. (2011). Accessing a hidden conformation of the maltose binding protein using accelerated molecular dynamics. *PLoS Computational Biology* 7, e1002034.

- Caimano, M.J., Kenedy, M.R., Kairu, T., Desrosiers, D.C., Harman, M., Dunham-Ems, S., Akins, D.R., Pal, U., and Radolf, J.D. (2011). The hybrid histidine kinase Hk1 is part of a two-component system that is essential for survival of *Borrelia burgdorferi* in feeding *Ixodes scapularis* ticks. *Infection and Immunity* *79*, 3117–3130.
- Campbell, A.J., Watts, K.J., Johnson, M.S., and Taylor, B.L. (2010). Gain-of-function mutations cluster in distinct regions associated with the signalling pathway in the PAS domain of the aerotaxis receptor, Aer. *Molecular Microbiology* *77*, 575–586.
- Campbell, A.J., Watts, K.J., Johnson, M.S., and Taylor, B.L. (2011). Role of the F1 Region in the *Escherichia coli* Aerotaxis Receptor Aer. *Journal of Bacteriology* *193*, 358–366.
- Carrica, C., Fernandez, I., Martí, M.A., Paris, G., and Goldbaum, F.A. (2012). The NtrY / X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Molecular Microbiology* *85*, 39–50.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009). Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell* *139*, 1–12.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology* *20*, 763–771.
- Chakraborty, S., Li, M., Chatterjee, C., Sivaraman, J., Leung, K.Y., and Mok, Y. (2010). Temperature and Mg²⁺ Sensing by a Novel PhoP-PhoQ Two-component System for Regulation of Virulence in *Edwardsiella tarda*. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 38876–38888.
- Chang, C., Tesar, C., Gu, M., Babnigg, G., Joachimiak, A., Pokkuluri, P.R., Szurmant, H., and Schiffer, M. (2010). Extracytoplasmic PAS-like domains are common in signal transduction proteins. *Journal of Bacteriology* *192*, 1156–1159.
- Charbonnier, J.B., Belin, P., Moutiez, M., Stura, E. a, and Quéméneur, E. (1999). On the role of the cis-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Science* *8*, 96–105.
- Cheung, J., and Hendrickson, W. a (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 116–123.
- Cheung, J., Bingman, C. a, Reingold, M., Hendrickson, W. a, and Waldburger, C.D. (2008). Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *The Journal of Biological Chemistry* *283*, 13762–13770.
- Cheung, J., Matthew, L.-K., and Hendrickson, W.A. (2009). Crystal Structure of a Histidine Kinase Sensor Domain with Similarity to Periplasmic Binding Proteins. *Proteins* *77*, 235–241.
- Cho, U.S., Bader, M.W., Amaya, M.F., Daley, M.E., Klevit, R.E., Miller, S.I., and Xu, W. (2006). Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *Journal of Molecular Biology* *356*, 1193–1206.
- Chu, B.C.H., and Vogel, H.J. (2011). A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport. *Biological Chemistry* *392*, 39–52.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2007). Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* *317*, 957–961.
- Cookson, B.T., Cho, H.L., Herwaldt, L. a, and Goldman, W.E. (1989). Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *57*, 2223–2229.
- Coote, J.G. (1991). Antigenic switching and pathogenicity : environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology* *137*, 2493–2503.
- Cotter, P. a, and Jones, A.M. (2003). Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends in Microbiology* *11*, 367–373.
- Cotter, P.A., and Dirita, V.J. (2000). Bacterial Virulence Gene Regulation : An Evolutionary Perspective. *Annual Review of Microbiology* *54*, 519–565.
- Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology* *10*, 17–23.

- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2001). Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *The EMBO Journal* *20*, 5040–5048.
- Croinin, T.O., Grippe, V.K., and Merkel, T.J. (2005). Activation of the *vrg6* Promoter of *Bordetella pertussis* by *RisA*. *Electrophoresis* *187*, 1648–1658.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A., and Miller, J.F. (2006). Species- and Strain-Specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. *Journal of Bacteriology* *188*, 1775–1785.
- Cusanovich, M.A., and Meyer, T.E. (2003). Photoactive Yellow Protein : A Prototypic PAS Domain Sensory Protein and Development of a Common Signaling Mechanism. *Biochemistry* *42*, 4759–4770.
- Cybulski, L.E., Martín, M., Mansilla, M.C., Fernández, A., and de Mendoza, D. (2010). Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Current Biology* *20*, 1539–1544.
- Dago, A.E., Schug, A., Procaccini, A., Hoch, J. a, Weigt, M., and Szurmant, H. (2012). Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E1733–42.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *72*, 317–364.
- Deora, R. (2002). Differential Regulation of the *Bordetella bipA* Gene : Distinct Roles for Different *BvgA* Binding Sites. *Journal of Bacteriology* *184*, 6942–6951.
- Derzelle, S. (2004). *AstR-AstS*, a new two-component signal transduction system, mediates swarming, adaptation to stationary phase and phenotypic variation in *Photorhabdus luminescens*. *Microbiology* *150*, 897–910.
- Diensthuber, R.P., Bommer, M., Gleichmann, T., and Möglich, A. (2013). Full-Length Structure of a Sensor Histidine Kinase Pinpoints Coaxial Coiled Coils as Signal Transducers and Modulators. *Structure* *21*, 1–10.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* *51*, 7–61.
- Doebber, M., Bordignon, E., Klare, J.P., Holterhues, J., Martell, S., Mennes, N., Li, L., Engelhard, M., and Steinhoff, H.-J. (2008). Salt-driven equilibrium between two conformations in the HAMP domain from *Natronomonas pharaonis*: the language of signal transfer? *The Journal of Biological Chemistry* *283*, 28691–28701.
- Dunham, C.M., Dioum, E.M., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Scott, W.G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2003). A Distal Arginine in Oxygen-Sensing Heme-PAS Domains Is Essential to Ligand Binding, Signal Transduction, and Structure. *Biochemistry* *42*, 7701–7708.
- Dupré, E., Wohlkonig, A., Herrou, J., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2013). Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase *BvgS*: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiology* *13*, 172.
- Dutta, A., Shrivastava, I.H., Sukumaran, M., Greger, I.H., and Bahar, I. (2012). Comparative dynamics of NMDA- and AMPA-glutamate receptor N-terminal domains. *Structure* *20*, 1838–1849.
- Dutta, R., Qin, L., and Inouye, M. (1999). Histidine kinases : diversity of domain organization. *Molecular Microbiology* *34*, 633–640.
- Dwyer, M.A., and Hellinga, W.H. (2004). Periplasmic binding proteins : a versatile superfamily for protein engineering. *Current Opinion in Structural Biology* *14*, 495–504.
- Edwards, R.L., Jules, M., Sahr, T., Buchrieser, C., and Swanson, M.S. (2010). The *Legionella pneumophila* *LetA/LetS* two-component system exhibits rheostat-like behavior. *Infection and Immunity* *78*, 2571–2583.
- Eguchi, Y., and Okada, T. (2004). Signal Transduction Cascade between *EvgA/EvgS* and *PhoP/PhoQ* Two-Component Systems of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *186*, 3006–3014.
- Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A., and Utsumi, R. (2007). B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems *EvgS/EvgA* and *PhoQ/PhoP* in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 18712–18717.

- Eguchi, Y., Ishii, E., Yamane, M., and Utsumi, R. (2012). The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* *85*, 299–313.
- Eldering, G., and Kendrick, P. (1937). *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *Journal of Bacteriology* *35*, 561–572.
- El-Mashtoly, S.F., Nakashima, S., Tanaka, A., Shimizu, T., and Kitagawa, T. (2008). Roles of Arg-97 and Phe-113 in Regulation of Distal Ligand Binding to Heme in the Sensor Domain of Ec DOS Protein. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 19000–19010.
- Eswaramoorthy, P., and Fujita, M. (2010). Systematic domain deletion analysis of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* *192*, 1744–1748.
- Eswaramoorthy, P., Guo, T., and Fujita, M. (2009). In Vivo Domain-Based Functional Analysis of the Major Sporulation Sensor Kinase, KinA, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* *191*, 5358–5368.
- Fajer, P.G. (2000). *Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis* (John Wiley & Sons Ltd).
- Falke, J.J., and Erbse, A.H. (2009). The piston rises again. *Structure* *17*, 1149–1151.
- Felder, C.B., Graul, R.C., Lee, A.Y., Merkle, H., Sadee, W., and Chemistry, P. (1999). The Venus Flytrap of Periplasmic Binding Proteins: An Ancient Protein Module Present in Multiple Drug Receptors. *AAPS PharmSci* *1*, E2.
- Finn, T.M., and Stevens, L.A. (1995). Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Molecular Microbiology* *16*, 625–634.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., Kelly, D.J., Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., and Kelly, D.J. (1997). TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* *179*, 5482–5493.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C., and Samama, J. (2001). The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes and Infection* *3*, 417–424.
- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y., and Nishikawa, K. (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *Journal of Molecular Biology* *286*, 279–290.
- Furukawa, H., Singh, S.K., Mancusso, R., and Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* *438*, 185–192.
- Garrity, L.F., Schiel, S.L., Merrill, R., Jr, M.H.S., Ordal, G.W., Reizer, J., and Saier, M.H. (1998). Unique Regulation of Carbohydrate Chemotaxis in *Bacillus subtilis* by the Phosphotransferase System and the Methyl-Accepting Chemotaxis Protein McpC. *Journal of Bacteriology* *180*, 4475–4480.
- Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., and Gross, R. (2001). Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes and Infection* *3*, 61–72.
- Geuijen, C. a, Willems, R.J., Hoogerhout, P., Puijk, W.C., Meloen, R.H., and Mooi, F.R. (1998). Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *66*, 2256–2263.
- Gielen, M., Goff, A. Le, Stroebel, D., Johnson, J.W., Neyton, J., and Paoletti, P. (2008). Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* *57*, 80–93.
- Gilles-Gonzalez, M.-A., and Gonzalez, G. (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *Journal of Applied Physiology* *96*, 774–783.
- Gilles-Gonzalez, M.-A., and Gonzalez, G. (2005). Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *Journal of Inorganic Biochemistry* *99*, 1–22.
- Gilles-Gonzalez, M.-A., Caceres, A.I., Henrique, E., Sousa, S., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Gonzalez, C., and Machius, M. (2006). A Proximal Arginine R206 Participates in Switching of the *Bradyrhizobium japonicum* FixL Oxygen Sensor. *Journal of Molecular Biology* *360*, 80–89.

- Glekas, G.D., Foster, R.M., Cates, J.R., Estrella, J.A., Michael, J., Rao, C. V, and Ordal, G.W. (2009). A pas domain binds asparagine in the chemotaxis receptor mcpc in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 1870–1878.
- Goldberg, S.D., Clinthorne, G.D., Goulian, M., and DeGrado, W.F. (2010). Transmembrane polar interactions are required for signaling in the *Escherichia coli* sensor kinase PhoQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8141–8146.
- Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. a, and Chan, M.K. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15177–15182.
- Gougnard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Lescuyer, A., Browaeys, E., and Dissous, C. (2011). *Schistosoma mansoni*: Structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Experimental Parasitology* 132, 32–39.
- Goulian, M. (2010). Two-component signaling circuit structure and properties. *Current Opinion in Microbiology* 13, 184–189.
- Goyard, S., Bellalou, J., Mireau, H., and Ullmann, A. (1994). Mutations in the *Bordetella pertussis* bvgS Gene That Confer Altered Expression of the flab Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176, 5163–5166.
- Gregory, D.S. (2006). Pertussis: A Disease Affecting All Ages. *American Family Physician* 74, 420–426.
- Grigoryan, G., and Keating, A.E. (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 477–483.
- Gross, R., Guzman, C. a, Sebahia, M., dos Santos, V. a P.M., Pieper, D.H., Koebnik, R., Lechner, M., Bartels, D., Buhrmester, J., Choudhuri, J. V, et al. (2008). The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics* 9, 449.
- Gross, R., Keidel, K., and Schmitt, K. (2010). Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Medical Microbiology and Immunology* 199, 155–163.
- Guiso, N., Wirsing von König, C.-H., Forsyth, K., Tan, T., and Plotkin, S.A. (2011). The Global Pertussis Initiative: report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine* 29, 1115–1121.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., and Tang, W.-J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *The EMBO Journal* 24, 3190–3201.
- Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Locht, C., and Brennan, M.J. (1994). Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infection and Immunity* 62, 5010–5019.
- He, X.-L., Dukkipati, A., Wang, X., and Garcia, K.C. (2005). A new paradigm for hormone recognition and allosteric receptor activation revealed from structural studies of NPR-C. *Peptides* 26, 1035–1043.
- Henry, J.T., and Crosson, S. (2011). Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology* 65, 261–286.
- Herin, G.A., and Aizenman, E. (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *European Journal of Pharmacology* 500, 101–111.
- Herrou, J., Debie, A.-S., Willery, E., Renauld-Mongénie, G., Renauld-Mongénie, G., Locht, C., Mooi, F., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2009). Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* 4, e6996.
- Herrou, J., Bompard, C., Wintjens, R., Dupré, E., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R., and Jacob-Dubuisson, F. (2010). Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17351–17355.
- Hewlett, E.L. (1997). Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 16, 578–584.

- Hoch, J.A. (2001). Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction †. *Journal of Bacteriology* *183*, 4941–4949.
- Hsieh, Y.-J., and Wanner, B.L. (2010). Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 198–203.
- Hu, X., Zhao, J., DeGrado, W.F., and Binns, A.N. (2013). *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 678–683.
- Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F., and Cotter, P. a (2010). Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infection and Immunity* *78*, 2901–2909.
- Ito, S., Igarashi, J., and Shimizu, T. (2009). The FG loop of a heme-based gas sensor enzyme, Ec DOS, functions in heme binding, autoxidation and catalysis. *Journal of Inorganic Biochemistry* *103*, 1380–1385.
- Itou, J., Eguchi, Y., and Utsumi, R. (2009). Molecular Mechanism of Transcriptional Cascade Initiated by the EvgS/EvgA System in *Escherichia coli* K-12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *73*, 870–878.
- Jacob-Dubuisson, F., Wintjens, R., Herrou, J., Dupré, E., and Antoine, R. (2012). BvgS of Pathogenic *Bordetellae*: A Paradigm for Sensor kinases with Venus Flytrap Perception Domains. In *Two Component System in Bacteria*, R. Gross, and D. Beier, eds. (Caister Academic Press), pp. 57–83.
- Jones, A.M., Boucher, P.E., Williams, C.L., Stibitz, S., and Cotter, P.A. (2005). Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Molecular Microbiology* *58*, 700–713.
- Jungnitz, H., West, N.P., Walker, M.J., Chhatwal, G.S., and Guzmán, C. a (1998). A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infection and Immunity* *66*, 4640–4650.
- Kaiserli, E., Sullivan, S., Jones, M.A., Feeney, K.A., and Christie, J.M. (2009). Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of Arabidopsis Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light. *Plant Cell* *21*, 3226–3244.
- Karakas, E., Simorowski, N., and Furukawa, H. (2011). Subunit Arrangement and Phenylethanolamine Binding in GluN1/GluN2B NMDA Receptors. *Nature* *475*, 249–253.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, a, and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 5752–5756.
- Kaut, C.S., Duncan, M.D., Kim, J.Y., Maclaren, J.J., Cochran, K.T., and Julio, S.M. (2011). A novel sensor kinase is required for *Bordetella bronchiseptica* to colonize the lower respiratory tract. *Infection and Immunity* *79*, 3216–3228.
- Kenney, L.J. (2010). How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Current Opinion in Microbiology* *13*, 168–176.
- Kennis, J.T.M., and Crosson, S. (2007). *Microbiology*. A bacterial pathogen sees the light. *Science* *317*, 1041–1042.
- Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., and Moffat, K. (2007). Structure of the Redox Sensor Domain of *Azotobacter Vinelandii* NifL at Atomic Resolution: Signaling, Dimerization and Mechanism. *Biochemistry* *46*, 3614–3623.
- Kim, J.-R., and Cho, K.-H. (2006). The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in *E. coli* realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises. *Computational Biology and Chemistry* *30*, 438–444.
- King-Scott, J., Konarev, P. V, Panjikar, S., Jordanova, R., Svergun, D.I., and Tucker, P. a (2011). Structural characterization of the multidomain regulatory protein Rv1364c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure* *19*, 56–69.
- Klug, C.S., and Feix, J.B. (2008). Methods and applications of site-directed spin labeling EPR spectroscopy. *Methods in Cell Biology* *84*, 617–658.

- Knapp, S., and Mekalanos, J.J. (1988). Two trans-Acting Regulatory Genes (*vir* and *mod*) Control Antigenic Modulation in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* *170*, 5059–5066.
- Krauss, U., Minh, B.Q., Losi, A., Gärtner, W., Eggert, T., Von Haeseler, A., and Jaeger, K.-E. (2009). The distribution and phylogeny of light , oxygen , voltage (LOV) blue-light signaling proteins in the three kingdoms of life. *Journal of Bacteriology* *191*, 7234–7242.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., and Ramos, J.L. (2010). Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology* *64*, 539–559.
- Kristensen, A.S., Geballe, M.T., Snyder, J.P., and Traynelis, S.F. (2006). Glutamate receptors: variation in structure-function coupling. *Trends in Pharmacological Sciences* *27*, 65–69.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O’Toole, G.A. (2005). A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* *187*, 1441–1454.
- Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2005). A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular Microbiology* *55*, 368–380.
- Kumauchi, M., Kaledhonkar, S., Philip, A.F., Wycoff, J., Hara, M., Li, Y., Xie, A., and Hoff, W.D. (2010). A conserved Helical Capping Hydrogen Bond in PAS Domains Controls Signaling Kinetics in the Superfamily Prototype Photoactive Yellow Protein. *Journal of the American Chemical Society* *132*, 15820–15830.
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, a S., Boyd, D., and Lin, E.C. (2000). The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *Journal of Bacteriology* *182*, 2960–2966.
- Lacey, B.W. (1960). Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *The Journal of Hygiene* *58*, 57–93.
- Ladant, D., and Ullmann, A. (1993). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* *7*, 172–176.
- Lai, Y.-C., Lin, G.-T., Yang, S.-L., Chang, H.-Y., and Peng, H.-L. (2003). Identification and characterization of KvgAS, a two-component system in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *FEMS Microbiology Letters* *218*, 121–126.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* *41*, 121–145.
- Laub, M.T., Biondi, E.G., and Skerker, J.M. (2007). Phosphotransfer Profiling : Systematic Mapping of Two-Component Signal Transduction Pathways and Phosphorelays. *Methods in Enzymology* *423*, 531–548.
- Lawlor, M.S., Hsu, J., Rick, P.D., and Miller, V.L. (2005). Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Molecular Microbiology* *58*, 1054–1073.
- Lee, J., Natarajan, M., Nashine, V.C., Socolich, M., Vo, T., Russ, W.P., Benkovic, S.J., and Ranganathan, R. (2008). Surface Sites for Engineering Allosteric Control un Proteins. *Science* *322*, 438–442.
- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S., and Nester, E.W. (1996). The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the *VirA* protein. *Gene* *179*, 83–88.
- Lin, C.-T., and Peng, H.-L. (2006). Regulation of the homologous two-component systems KvgAS and KvhAS in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Biochemistry* *140*, 639–648.
- Little, R., Salinas, P., Slavny, P., Clarke, T. a, and Dixon, R. (2011). Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. *Molecular Microbiology* *82*, 222–235.
- Locher, K.P. (2004). Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology* *14*, 426–431.
- Locht, C., and Mielcarek, N. (2012). New pertussis vaccination approaches : en route to protect newborns ? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* *66*, 121–133.
- Locht, C., Antoine, R., and Jacob-Dubuisson, F. (2001). *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Current Opinion in Microbiology* *4*, 82–89.
- Locht, C., Coutte, L., and Mielcarek, N. (2011). The ins and outs of pertussis toxin. *The FEBS Journal* *278*, 4668–4682.

- Lowe, E.C., Baslé, A., Czjzek, M., Firbank, S.J., and Bolam, D.N. (2012). A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 7298–7303.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 13318–13323.
- Malpica, R., Sandoval, G.R.P., Rodríguez, C., Franco, B., and Georgellis, D. (2006). Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxidants & Redox Signaling* *8*, 781–795.
- Marina, A., Waldburger, C.D., and Hendrickson, W. a (2005). Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *The EMBO Journal* *24*, 4247–4259.
- Martinez de Tejada, G., Miller, J.F., and Cotter, P.A. (1996). Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Molecular Microbiology* *22*, 895–908.
- Martinez de Tejada, G., Cotter, P.A., Heininger, U., Camilli, A., Akerley, B.J., Mekalanos, J.J., and Miller, J.F. (1998). Neither the Bvg - Phase nor the vrg6 Locus of *Bordetella pertussis* Is Required for Respiratory Infection in Mice. *Microbiology* *66*, 2762–2768.
- Martinez-Wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W., and Camilli, A. (2008). The *Vibrio cholerae* Hybrid Sensor Kinase VieS Contributes to Motility and Biofilm Regulation by Altering the Cyclic Diguanylate Level. *Journal of Bacteriology* *190*, 6439–6447.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *70*, 910–938.
- Masuda, N., and Church, G.M. (2002). *Escherichia coli* Gene Expression Responsive to Levels of the Response Regulator EvgA *Escherichia coli* Gene Expression Responsive to Levels of the Response Regulator EvgA. *Journal of Bacteriology* *184*, 6225–6234.
- McIntosh, B.E., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C. a (2010). Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual Review of Physiology* *72*, 625–645.
- Melton, A.R., and Weiss, A.A. (1993). Characterization of Environmental Regulators of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *61*, 807–815.
- Merkel, T.J., and Stibitz, S. (1995). Identification of a Locus Required for the Regulation of bvg- Repressed Genes in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* *177*, 2727–2736.
- Meyer, T.E., Kyndt, J.A., Memmi, S., Moser, T., Colón-Acevedo, B., Devreese, B., and Van Beeumen, J.J. (2012). The growing family of photoactive yellow proteins and their presumed functional roles. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* *11*, 1495–1514.
- Mielcarek, N., Debie, A.-S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A. Ben, Creusy, C., Engle, J., Goldman, W.E., and Locht, C. (2006a). Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathogens* *2*, e65.
- Mielcarek, N., Debie, A.-S., Raze, D., Quatannens, J., Engle, J., Goldman, W.E., and Locht, C. (2006b). Attenuated *Bordetella pertussis*: new live vaccines for intranasal immunisation. *Vaccine* *24 Suppl 2*, S2–54–5.
- Miller, J.F., Roy, C.R., and Falkow, S. (1989). Analysis of *Bordetella pertussis* virulence gene regulation by use of transcriptional fusions in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *171*, 6345–6348.
- Miller, J.F., Johnson, S. a, Black, W.J., Beattie, D.T., Mekalanos, J.J., and Falkow, S. (1992). Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* bvgS gene. *Journal of Bacteriology* *174*, 970–979.
- Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000). Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology* *301*, 415–431.
- Mo, G., Zhou, H., Kawamura, T., and Dahlquist, F.W. (2012). Solution structure of a complex of the histidine auto kinase CheA with its substrate CheY. *Biochemistry* *51*, 3786–3798.

- Möglich, A., and Moffat, K. (2007). Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA. *Journal of Molecular Biology* 373, 112–126.
- Möglich, A., Ayers, R. a, and Moffat, K. (2009a). Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17, 1282–1294.
- Möglich, A., Ayers, R. a, and Moffat, K. (2009b). Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of Molecular Biology* 385, 1433–1444.
- Möglich, A., Ayers, R. a, and Moffat, K. (2010). Addition at the molecular level: signal integration in designed Per-ARNT-Sim receptor proteins. *Journal of Molecular Biology* 400, 477–486.
- Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W.W., Bader, M.W., De Smet, F., McClelland, M., Fang, F.C., De Moor, B., Vanderleyden, J., and Marchal, K. (2005). Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Evolution* 60, 462–474.
- Monson, E.K., Ditta, G.S., and Helinski, D.R. (1995). The Oxygen Sensor Protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 5243–5250.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., and Paoletti, P. (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *The EMBO Journal* 30, 3134–3146.
- Mooi, F.R. (2009). *Bordetella pertussis* Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1206–1213.
- Mooi, F.R., Jansen, W.H., Brunings, H., Gielen, H., van der Heide, H.G., Walvoort, H.C., and Guinee, P.A. (1992). Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microbial Pathogenesis* 12, 127–135.
- Moore, J.O., and Hendrickson, W. a (2009). Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure* 17, 1195–1204.
- Moore, J.O., and Hendrickson, W. a (2012). An asymmetry-to-symmetry switch in signal transmission by the histidine kinase receptor for TMAO. *Structure* 20, 729–741.
- Moreno Lopez, M. (1954). [The genus *Bordetella*]. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* 28, 247–260.
- Moutevelis, E., and Woolfson, D.N. (2009). A periodic table of coiled-coil protein structures. *Journal of Molecular Biology* 385, 726–732.
- Müller, A., Severi, E., Mulligan, C., Watts, A.G., Kelly, D.J., Wilson, K.S., Wilkinson, A.J., and Thomas, G.H. (2006). Conservation of structure and mechanism in primary and secondary transporters exemplified by SiaP, a sialic acid binding virulence factor from *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 22212–22222.
- Mulligan, C., Fischer, M., and Thomas, G.H. (2011). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 68–86.
- Nakamura, M.M., Liew, S.-Y., Cummings, C. a, Brinig, M.M., Dieterich, C., and Relman, D. a (2006). Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 74, 5537–5548.
- Ogura, Y. et al (2008). PAS / LOV proteins. *Plant Signaling & Behavior* 3, 966–968.
- Oh, B., Pandits, J., Kang, C., Nikaidoii, K., Gokcen, S., Amesll, G.F., and Kim, S. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/ Ornithine-binding Protein with and without. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11348–11355.
- Oh, B., Kang, C., De Bondt, H., Kim, S., Nikaidoii, K., Joshi, A.K., and Ames, G.F.-L. (1994). The Bacterial Periplasmic Histidine-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 269, 4135–4143.
- Ottemann, K.M., Thorgeirsson, T.E., Kolodziej, a F., Shin, Y.K., and Koshland, D.E. (1998). Direct measurement of small ligand-induced conformational changes in the aspartate chemoreceptor using EPR. *Biochemistry* 37, 7062–7069.

- Pandini, A., and Bonati, L. (2005). Conservation and specialization in PAS domain dynamics. *Protein Engineering, Design & Selection* *18*, 127–137.
- Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J.F., Sebahia, M., Bentley, S.D., et al. (2012). Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics* *13*, 545.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., et al. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* *35*, 32–40.
- Parkinson, J.S. (2010). Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annual Review of Microbiology* *64*, 101–122.
- Parry, D. a D., Fraser, R.D.B., and Squire, J.M. (2008). Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *Journal of Structural Biology* *163*, 258–269.
- Pellequer, J.-L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., and Getzoff, E.D. (1998). Photoactive yellow protein : A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 5884–5890.
- Perraud, a L., Kimmel, B., Weiss, V., and Gross, R. (1998). Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins. *Molecular Microbiology* *27*, 875–887.
- Perraud, A., Rippe, K., Bantsche, M., Glocker, M., Lucassen, M., Jung, K., Sebald, W., Weiss, V., and Gross, R. (2000). Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochimica et Biophysica Acta* *1478*, 341–354.
- Podgornaia, A.I., and Laub, M.T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* *16*, 156–162.
- Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (1993). Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *61*, 2780–2785.
- Prugnola, A., Aricò, B., Manetti, R., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (1995). Response of the bvg regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures and short-term temperature shifts. *Microbiology* *141*, 2529–2534.
- Pusztai, Z., and Joó, I. (1967). The role of the serologic type in experimental immunity against *B. Pertussis*. *Progress in Immunobiological Standardization* *3*, 309–314.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K., and Wright, S.D. (1990). Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* *61*, 1375–1382.
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.Ö., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (2000). PAS Domain Residues Involved in Signal Transduction by the Aer Redox Sensor of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* *36*, 806–816.
- Rogers, E.A., Terekhova, D., Zhang, H., Hovis, K.M., and Marconi, R.T. (2010). Rrp1, a cyclic-di-GMP-producing response regulator, is an important regulator of *Borrelia burgdorferi* core cellular functions. *Molecular Microbiology* *71*, 1551–1573.
- Rondard, P., Goudet, C., Kniazeff, J., Pin, J.-P., and Prézeau, L. (2011). The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology* *60*, 82–92.
- Scarlato, V., Prugnola, A., Aricó, B., and Rappuoli, R. (1990). Positive transcriptional feedback at the bvg locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 6753–6757.
- Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.-F., Ebert-Jung, a, Basché, T., Erker, W., and Unden, G. (2012). CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system in vivo. *Journal of Bacteriology* *194*, 636–645.

Schotte, F., Sun, H., Kaila, V.R.I., Kamikubo, H., Dashdorj, N., Henry, E.R., Graber, T.J., Henning, R., Wulff, M., Hummer, G., et al. (2012). Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 19256–19261.

Serra, D.O., Conover, M.S., Arnal, L., Sloan, G.P., Rodriguez, M.E., Yantorno, O.M., and Deora, R. (2011). FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* *6*, e28811.

Sharff, A.J., Rodseth, L.E., Spurlino, J.C., and Quijcho, F.A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* *31*, 10657–10663.

Shepard, P.D., Canavier, C.C., and Levitan, E.S. (2007). Ether-a-go-go-related gene potassium channels: what's all the buzz about? *Schizophrenia Bulletin* *33*, 1263–1269.

Silversmith, R.E. (2010). Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 177–183.

Sinha, R., and Heath, P.T. (2005). Pertussis. *Medicine* *33*, 101–102.

Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011). Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Molecular Microbiology* *79*, 1353–1366.

Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E. a, Ashenberg, O., Goulian, M., and Laub, M.T. (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* *133*, 1043–1054.

Slavny, P., Little, R., Salinas, P., Clarke, T.A., and Dixon, R. (2010). Quaternary structure changes in a second PerArnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Molecular Microbiology* *75*, 61–75.

Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* *462*, 745–756.

Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam, D.N., and Sonnenburg, J.L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* *141*, 1241–1252.

Stainer, D.W., and Scholte, M.J. (1970). A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology* *63*, 211–220.

Steffen, P., Goyard, S., and Ullmann, a (1996). Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *The EMBO Journal* *15*, 102–109.

Stenson, T.H., Allen, A.G., Jehan, A., Maskell, D., and Peppler, M.S. (2005). *Bordetella pertussis* *risA*, but Not *risS*, Is Required for Maximal Expression of Bvg-Repressed Genes. *Infection and Immunity* *73*, 5995–6004.

Stewart, R.C. (2010). Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 133–141.

Stibitz, S., and Yang, M.S. (1991). Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* *173*, 4288–4296.

Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D., and Falkow, S. (1989). Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* *338*, 266–269.

Stock, a M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* *69*, 183–215.

Strickland, D., Moffat, K., and Sosnick, T.R. (2008). Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 10709–10714.

Swartz, T.E., Tseng, T.-S., Frederickson, M. a, Paris, G., Comerci, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.-G., Mudgett, M.B., Splitter, G. a, Ugalde, R. a, et al. (2007). Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* *317*, 1090–1093.

- Swint-Kruse, L., and Matthews, K.S. (2009). Allostery in the LacI / GalR Family : Variations on a Theme. *Current Opinion in Microbiology* *12*, 129–137.
- Szurmant, H., and Hoch, J. a (2010). Interaction fidelity in two-component signaling. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 190–197.
- Tam, R., and Saier, M.H. (1993). Structural , Functional , and Evolutionary Relationships among Extracellular Solute-Binding Receptors of Bacteria. *Microbiology* *57*, 320–346.
- Tanaka, A., Takahashi, H., and Shimizu, T. (2007). Critical Role of the Heme Axial Ligand , Met 95 , in Locking Catalysis of the Phosphodiesterase from *Escherichia coli* (Ec DOS) toward Cyclic diGMP. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 21301–21307.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *63*, 479–506.
- Tetsch, L., and Jung, K. (2009). The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Molecular Microbiology* *73*, 982–991.
- Tomich, M., and Mohr, C.D. (2004). Genetic Characterization of a Multicomponent Signal Transduction System Controlling the Expression of Cable Pili in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of Bacteriology* *186*, 3826–3836.
- Townsend, G.E., Raghavan, V., Zwir, I., and Groisman, E. a. (2012). Intramolecular arrangement of sensor and regulator overcomes relaxed specificity in hybrid two-component systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E161–E169.
- Trakhanov, S., Vyas, N.K., Luecke, H., Kristensen, D.M., Ma, J., and Quioco, F. a (2005). Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* *44*, 6597–6608.
- Turcotte, M.L., Martin, D., Brodeur, B.R., and Pepller, M.S. (1997). Tn5-induced lipopolysaccharide mutations in *Bordetella pertussis* that affect outer membrane function. *Microbiology* *143*, 2381–2394.
- Uhl, M. a, and Miller, J.F. (1996a). Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *The EMBO Journal* *15*, 1028–1036.
- Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1994). Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 1163–1167.
- Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1996b). Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *The Journal of Biological Chemistry* *271*, 33176–33180.
- Ulrich, L.E., Koonin, E. V, and Zhulin, I.B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology* *13*, 52–56.
- Utsumi, R., Katayama, S., Taniguchi, M., Horie, T., Ikeda, M., Igaki, S., Nakagawa, H., Miwa, A., Tanabe, H., and Noda, M. (1994). Newly identified genes involved in the signal transduction of *Escherichia coli* K-12. *Gene* *140*, 73–77.
- Vergara-Irigaray, N., Cha, A., Rodri, J., Miller, J.F., Cotter, P.A., and Marti, G. (2005). Evaluation of the Role of the Bvg Intermediate Phase in *Bordetella pertussis* during Experimental Respiratory Infection. *Infection and Immunity* *73*, 748–760.
- Walker, K.A., and Miller, V.L. (2004). Regulation of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* by Regulation of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* by YsaE / SycB and YsrS / YsrR. *Journal of Bacteriology* *186*, 4056–4066.
- Walker, K.A., and Miller, V.L. (2009). Synchronous gene expression of the *Yersinia enterocolitica* Ysa type III secretion system and its effectors. *Journal of Bacteriology* *191*, 1816–1826.
- Walker, K.A., Obrist, M.W., Mildiner-Earley, S., and Miller, V.L. (2010). Identification of YsrT and evidence that YsrRST constitute a unique phosphorelay system in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology* *192*, 5887–5897.

- Wang, C., Sang, J., Wang, J., Su, M., Downey, J.S., Wu, Q., Wang, S., Cai, Y., Xu, X., Wu, J., et al. (2013). Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains. *PLoS Biology* *11*, e1001493.
- Weiss, a a, and Falkow, S. (1984). Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *43*, 263–269.
- Weiss, a a, Hewlett, E.L., Myers, G. a, and Falkow, S. (1983). Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* *42*, 33–41.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences* *26*, 369–376.
- Williams, C.L., and Cotter, P.A. (2007). Autoregulation Is Essential for Precise Temporal and Steady-State Regulation by the *Bordetella* BvgAS Phosphorelay. *Journal of Bacteriology* *189*, 1974–1982.
- Wilson, J.W. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal* *78*, 216–224.
- Winnen, B., Hvorup, R.N., and Saier, M.H. (2003). The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Research in Microbiology* *154*, 457–465.
- Witan, J., Monzel, C., Scheu, P.D., and Unden, G. (2012a). The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biological Chemistry* *393*, 1291–1297.
- Witan, J., Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P.A., Erker, W., and Unden, G. (2012b). Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular Microbiology* *85*, 846–861.
- Wuichet, K., Cantwell, B.J., and Zhulin, I.B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 219–225.
- Yan, D., Yamasaki, M., Straub, C., Watanabe, M., and Tomita, S. (2013). Homeostatic Control of Synaptic Transmission by Distinct Glutamate Receptors. *Neuron* *78*, 687–699.
- Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R.M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C., and Li, X. (2010). Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 4752–4757.
- Zhao, G., Xia, T., Fischer, R.S., and Jensens, R.A. (1992). Cyclohexadienyl Dehydratase from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* *267*, 2487–2493.
- Zhou, Y., Nan, B., Nan, J., Ma, Q., Panjikar, S., Liang, Y., Wang, Y., and Su, X. (2008). C4-Dicarboxylates Sensing Mechanism Revealed by the Crystal Structures of DctB Sensor Domain. *Journal of Molecular Biology* *383*, 49–61.
- Zoltowski, B.D., Vaccaro, B., and Crane, B.R. (2009). Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nature Chemical Biology* *5*, 827–834.