



HAL
open science

Etude de la régulation du système de sécrétion de type 3 et du système de sécrétion de type 6 chez *Pseudomonas aeruginosa* : Approches de chémogénomique, mutagénèse aléatoire et étude d'isolat clinique

Khady Sall

► **To cite this version:**

Khady Sall. Etude de la régulation du système de sécrétion de type 3 et du système de sécrétion de type 6 chez *Pseudomonas aeruginosa* : Approches de chémogénomique, mutagénèse aléatoire et étude d'isolat clinique. Microbiologie et Parasitologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV051 . tel-01555450

HAL Id: tel-01555450

<https://theses.hal.science/tel-01555450>

Submitted on 4 Jul 2017

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Khady Haby SALL** »

Thèse dirigée par **Mme Sylvie ELSÉN**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection**

dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de la régulation du SST3 et du SST6 chez *Pseudomonas aeruginosa* : Approches de chémogénomique, mutagenèse aléatoire et étude d'isolat clinique

Thèse soutenue publiquement le **28 novembre 2013**,
devant le jury composé de :

Monsieur Hans GEISELMANN

Professeur, Grenoble, Président

Madame Sylvie REVERCHON-PESCHEUX

Maître de conférences, Lyon, Rapporteur,

Madame Sophie DE BENTZMANN

Directeur de Recherche, Marseille, Rapporteur

Madame Sylvie ELSÉN

Chargé de Recherche, Grenoble, Directrice de thèse

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



Remerciements

Je tiens avant tout à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse pour leur aide précieuse au cours de ces trois années ainsi que les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de juger ces travaux.

En premier, je remercie bien évidemment ma directrice de thèse Sylvie Elsen. Merci à elle pour sa franchise, sa rigueur scientifique et ses merveilleuses gâches qui mettaient du baume au coeur. Merci d'avoir toujours remis en question mes résultats et de m'avoir montré à quel point avoir un esprit critique est important dans la Recherche. Merci pour les sauvetages de dernière minute qui ont plus d'une fois sauvé mes manipes

Je ne peux pas dissocier la directrice de notre équipe, Ina Attree, des remerciements que je fais à Sylvie tellement ce duo est inséparable ! Merci de m'avoir montré comment fonctionne la recherche à deux. Comment l'une vient au secours de l'autre quand il n'y a plus d'idées. Merci d'avoir su entretenir un climat de convivialité et de confiance entre tous les membres du labo.

Je remercie également Jean-Jacques Feige de m'avoir accueillie au sein du laboratoire BCI.

Je n'oublie pas non plus mes collaborations à Grenoble et à Marseille : Je remercie Marie-Odile Fauvarque et Caroline Barrette du CMBA pour leurs conseils et leur aide lors du criblage. Grâce à elles, le monde du criblage à haut-débit n'est plus si nébuleux !

Je tiens à remercier tous les marseillais pour leur accueil chaleureux pendant cette semaine dans leur labo et tout particulièrement Christophe Bordi pour sa patience et sa disponibilité pour me montrer tous les secrets de la mutagénèse aléatoire. Un grand merci aussi pour toutes les expériences réalisées dans ce labo malgré des emplois du temps très chargés !

Je remercie également toute l'équipe de choc PBRC passée et présente. Toutes les personnes qui ont fait de ma thèse une expérience humaine si riche ! Merci pour les moments de fous rires, les « tupperware-party », les discussions plus ou moins scientifiques, le tour des restos de Grenoble, leur soutien quand le moral n'est pas au beau fixe. Un énorme merci à Deux Drôles de Dames et à une fille du Couloir si spéciales sans qui ces trois ans n'auraient pas été les mêmes... Merci les filles !

Je remercie les membres de ma chorale Gospel qui m'ont permis de décompresser après des journées intenses au labo.

Je remercie toute ma famille de France, du Sénégal, de Suisse du Mali, des Etats-Unis, du Maroc et d'Italie pour leur soutien sans faille et leurs encouragements par des mails, sms, appels et autres conversations Skype qui m'ont permis de tenir malgré l'éloignement et de me dépasser. Je n'aurai rien pu faire sans vous !

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Table des illustrations.....	8
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	13
Introduction	14
I- Pseudomonas aeruginosa.....	15
1- Historique.....	15
2- Le génome mosaïque de <i>P. aeruginosa</i>	16
3- <i>P. aeruginosa</i> : un pathogène opportuniste préoccupant	17
4- La mucoviscidose : terrain propice à de multiples infections et à des modifications génomiques.....	19
a) Initiation de l'infection.....	21
b) Persistance dans les poumons	21
5- Le biofilm : un environnement polymicrobien inter et intra-espèces	22
II- Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	24
1- Les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion et la motilité.....	24
a) Le flagelle.....	25
b) Les pili de type IV	25
2- Les facteurs de virulence impliqués dans la formation de biofilm	26
a) Les exopolysaccharides (EPS)	26
- les exopolysaccharides Psl (Polysaccharides synthesis locus)	26
- les exopolysaccharides Pel.....	26
- les alginates	27

3-	L'ADN extracellulaire (« eDNA »)	27
4-	Les systèmes de sécrétion de toxines et d'effecteurs	28
a)	Le Système de Sécrétion de Type I (SST1)	29
b)	Le Système de Sécrétion de Type II (SST2)	29
c)	Le Système de Sécrétion de Type III (SST3).....	30
d)	Le Système de Sécrétion de Type V (SST5).....	32
e)	Le Système de Sécrétion de Type VI (SST6).....	33
III-	Régulation de la virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	35
1-	Le Quorum Sensing	35
2-	Les systèmes de régulation à deux composants	38
3-	La voie AMPc / Vfr	39
4-	di-GMPc.....	40
5-	Petits ARNs régulateurs	40
a)	Régulation par appariement de bases: exemple des ARNs anti-sens PrrF1 et anti-sens PrrF2.....	41
b)	Régulation de protéines se fixant aux ARNm : exemple de la protéine RsmA .	42
IV-	Transition vie planctonique / vie communautaire	44
1-	La voie Gac-Rsm	45
2-	RetS (Regulator of Exopolysaccharides and Type Three Secretion).....	46
3-	LadS (Lost of Adherence Sensor).....	48
4-	La voie HptB	48
5-	Les messagers secondaires di-GMPc/AMPc	50
6-	Les régulations additionnelles.....	51
V-	La Régulation du SST3 et des SST6	52
1-	La régulation du SST3	52
a)	Spécifique : la cascade de couplage sécrétion-synthèse.....	54
b)	La voie de signalisation AMPc/Vfr –dépendante (CVS pathway)	55
c)	Voies de régulations interconnectées autour du SST3	56

2-	La régulation des SST6	58
	Chez <i>P. aeruginosa</i> , les trois SST6 sont codés par des gènes organisés en plusieurs opérons regroupés respectivement sur les loci HSI-I, II et III (Mougous <i>et al.</i> , 2006) (Figure 22). Différentes régulations s'exercent sur ces loci, à différents niveaux.....	
	a) Niveau transcriptionnel :	59
	b) Niveau post-transcriptionnel	59
	c) Niveau post-traductionnel	59
	Objectifs de ma thèse	62
	Résultats	63
	Approches.....	64
	chémogénomiques	64
I-	Recherche de bio-activateurs	65
	1- CHOIX DES PROMOTEURS	66
	2- FUSIONS ET PLASMIDES	66
	3- SOUCHES	67
	4- GENES RAPPORTEURS	67
	5- MILIEU.....	69
II-	Criblage de la banque Prestwick®	69
	1- Mise au point.....	69
	a) Mesure de l'activité des fusions SST3	69
	b) Mesure de l'activité des fusions SST6	71
	c) Mesure de l'activité des fusions de la macroglobuline	75
	d) Adaptation du test en plaque 96 puits	77
	2- Sélection des molécules	82
	3- Caractérisation des molécules.....	84
	4- Conclusions.....	90
III-	Criblage de la banque Infarmatik®	91
	1- Amélioration du crible	92

2-	Hits primaires et secondaires	92
3-	Caractérisation de GL-0410	94
4-	Caractérisation de GL-1395 et analogues	95
IV-	Conclusions générales :	96
	Mutagénèse aléatoire	98
I-	Mutagénèse aléatoire	99
1-	Le transposon « mariner »	100
2-	Choix des souches	100
3-	Mise en œuvre	101
4-	Perspectives : caractérisation des clones	102
	Etude de la régulation d'un isolat clinique La souche CHA	104
I-	Etude de la régulation d'un isolat clinique : la souche CHA	105
1-	La souche CHA	107
2-	CHA : un isolat CF dépourvu de SST6-1	108
3-	Forte répression du SST6-1 par RsmA	109
4-	Des masters régulateurs sans effets sur la voie Gac/Rsm	111
5-	Délétion dans le gène <i>gacS</i>	112
6-	Rétablissement de la voie Gac/Rsm	113
7-	Absence de GacS dans CHA	114
8-	Impact phénotypique de la délétion dans <i>gacS</i> ou <i>ldhA</i> ou les 2 gènes	116
a)	Virulence SST3-dépendante	116
b)	Production d'exopolysaccharides	117
c)	Mobilité	118
d)	Pigmentation	120
e)	Isolats de type « SCV »	121
f)	Le régulateur global Vfr	123
9-	Conclusions-Perspectives	124

Conclusions Générales	129
Matériel et Méthodes.....	132
Matériel et méthodes	133
a) Microbiologie et biologie cellulaire	133
b) Techniques de Biologie Moléculaire.....	134
c) Fusions	136
d) Constructions génétiques.....	136
e) Biochimie	138
Tableau 10 : Souches utilisées dans cette étude	140
Tableau 11 : Plasmides utilisés dans cette étude	142
Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude	144
Références	147
Bibliographiques	147
Références bibliographiques	148
ANNEXES	172
Publications	175
Poster présenté	
Publications	
- Soumises	
- Acceptées	

Table des illustrations

Figure 1 Représentation circulaire des génomes des souches PAO1 et PA14.....	17
Figure 2 A/ Les principaux mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques.....	19
Figure 3 Persistance de différents pathogènes dans des poumons CF au cours du temps.	20
Figure 4 Dynamique d'un biofilm.....	23
Figure 5 Appendices extracellulaires et exopolysaccharides (EPS) à la surface de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figure 6 Les systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i>	28
Figure 7 Représentation schématique du SST3 situé dans l'enveloppe de <i>P. aeruginosa</i>	31
Figure 8 Représentation d'un bactériophage (A), du SST6-1 au repos (B) et « armé » (C) situé dans l'enveloppe de <i>P. aeruginosa</i> d'après	34
Figure 9 A / Représentation schématique de l'ancienne vision du fonctionnement du QS chez <i>P. aeruginosa</i>	37
Figure 10 Représentation schématique des systèmes à deux composants de <i>P. aeruginosa</i> .	39
Figure 11 Contrôle de l'activité et de la stabilité de l'ARNm par les petits ARNs.	41
Figure 12 Représentation schématique de la régulation du taux de fer intracellulaire chez <i>P. aeruginosa</i>	42
Figure 13 RsmA et RsmY	43
Figure 14 : Schéma de la régulation exercée sur les petits ARNs régulateurs au cours de la transition infection aiguë/infection chronique.....	45
Figure 15 Représentation schématique des protéines GacS-GacA de <i>P. aeruginosa</i>	46
Figure 16 Représentation schématique des domaines des histidines kinases LadS et RetS de <i>P. aeruginosa</i> d'après.....	47
Figure 17 La voie HptB.....	49
Figure 18 La voie de synthèse AMPc/di-GMPc.	51
Figure 19 Représentation schématique de l'organisation génétique du SST3.	53
Figure 20 Schéma récapitulatif de la régulation du SST3 modifié	54
Figure 21 Modèle de la cascade de couplage sécrétion/synthèse.....	55
Figure 22 Représentation schématique des trois loci HSI du SST6 de <i>P. aeruginosa</i>	58

Figure 23 Représentation schématique de l'appareil de sécrétion du SST6-1 et des protéines accessoires.....	61
Figure 24 Les différentes étapes du criblage à haut débit	66
Figure 25 Visualisation de l'induction du SST3 dans CHA et PAO1F.....	70
Figure 26 Forte activité de transcription du SST3 dans CHA et PAO1F.....	71
Figure 27 Mesure d'activité β -galactosidase des fusions transcriptionnelle et traductionnelle <i>pfha1-lacZ</i> dans les souches PAO1 et PAO1 Δ retS.....	72
Figure 28 Représentation schématique des deux types de fusions utilisées dans cette étude .	73
Figure 29 Mesure d'activité β -galactosidase de la fusion transcriptionnelle modifiée <i>pfha1 ΔRIII-lacZ</i> intégrée dans le chromosome des souches PAO1 et PAO1 Δ retS.....	74
Figure 30 RetS régule indirectement le HSI-III	74
Figure 31 Fort impact de la régulation post-transcriptionnelle sur la synthèse de la macroglobuline.....	75
Figure 32 Utilisation du β -glo pour le crible.....	78
Figure 33 Le crible est possible pour CHA.....	79
Figure 34 Le crible est possible pour le SST6-1 et la macroglobuline.	80
Figure 35 Aucun effet du DMSO sur la croissance et l'activité des souches.....	81
Figure 36 Représentation schématique de la plaque « test » et valeurs moyennes de l'activité basale de chaque test.	82
Figure 37 Bilan récapitulatif du criblage.....	83
Figure 38 Résultat obtenu avec le promoteur du SST3 sur PAO1F.....	84
Figure 39 Benserazide et Isoetharine semblent avoir un effet sur la GFP.	86
Figure 40 Benserazide et isoetharine ont un effet sur la <i>gfp</i> indépendamment du promoteur.. ..	87
Figure 41 Test dose-réponse (mesure d'activité β -galactosidase) par β -glo de la fusion transcriptionnelle modifiée <i>pfha1 ΔRIII-lacZ</i> intégrée dans le chromosome de PAO1 en présence de molécules aux concentrations indiquées.....	88
Figure 42 Le Tyloxapol a un faible effet activateur sur <i>pmagA</i>	90
Figure 43 GI-0410 et GL-1395 ont un effet sur PAO1F/ <i>pexoS-gfp</i> . Conditions induite (Ind) et non induite(NI) du SST3.	93
Figure 44 Test des composés GL-0410 et GL-1395 sur la souche CHA.....	94

Figure 45 GL-0410 semble agir sur la GFP.	94
Figure 46 GL-0410 a un effet sur la GFP indépendamment du promoteur testé.	95
Figure 47 l'analogue 5112754 n'a pas d'effet sur PAO1F/ <i>pexoS-gfp</i>	96
Figure 48 Représentation schématique de pBT20, le vecteur du transposon « mariner » C9..	100
Figure 49 PAO1F convient pour le criblage blanc/bleu.....	101
Figure 50 Principe de la PCR semi-arbitraire.	103
Figure 51 Différentes manifestations de l'adaptation CF	106
Figure 52 La mutation dans <i>mucA</i> conduisant à la protéine MucA _{A5G} est responsable du phénotype mucoïde de CHA.	108
Figure 53 La souche CHA ne synthétise pas Hcp1.	108
Figure 54 Défaut de traduction du SST6-1 dans CHA.....	109
Figure 55 Défaut d'expression des petits ARNs dans CHA.....	110
Figure 56 Inversion d'expression du SST6-1 et du SST3 dans un mutant CHA Δ <i>rsmA</i>	111
Figure 57 RetS et LadS n'ont pas d'effet sur l'expression du SST6-1 de CHA..	112
Figure 58 Une délétion de 426pb dans le génome de CHA affecte <i>gacS</i>	113
Figure 59 La complémentation par <i>gacS</i> de PAO1 rétablit l'expression des petits ARNs RsmY et RsmZ dans CHA.	113
Figure 60 La complémentation de CHA par le gène <i>gacS</i> de PAO1 rétablit l'effet de la mutation Δ <i>retS</i> sur l'expression du SST6-1 et du SST3	114
Figure 61 La délétion de l'extrémité 3' de <i>gacS</i> conduit à une absence de GacS* dans les membranes de CHA	115
Figure 62 La complémentation par <i>gacS</i> a un impact sur la cytotoxicité SST3- dépendante de CHA.	117
Figure 63 CHA ne forme pas de biofilm à l'interface air-liquide.).....	118
Figure 64 CHA possède les trois mobilités.	119
Figure 65 RsmA régule la production des pigments dans CHA.	120
Figure 66 CHA est capable de produire des SCV	123
Figure 67 Vfr n'a pas d'effet sur le SST3 dans CHA.....	124

Figure 68 Schéma récapitulatif de la régulation des facteurs de virulence dans la souche
CHA. 125

Liste des tableaux

Tableau 1 Différentes voie de régulation touchant les petits ARNs RsmZ et RsmY	52
Tableau 2 Principaux criblages de chimiothèques effectués récemment.....	67
Tableau 3 Principales caractéristiques des gènes rapporteurs.....	68
Tableau 4 Bilan des différentes fusions testées.....	76
Tableau 5 molécules retenues comme possibles activateurs du SST3.....	84
Tableau 6 molécules retenues comme possibles activateurs du SST6-1	87
Tableau 7 molécules retenues comme possibles activateurs et inhibiteurs de l'opéron <i>mag</i> .	89
Tableau 8 Changements opérés entre le criblage Prestwick et Infarmatik	92
Tableau 9 Analogues de GL-1395	95
Tableau 10 : Souches utilisées dans cette étude.....	140
Tableau 11 : Plasmides utilisés dans cette étude.....	142
Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude	144

Liste des abréviations

- EPS : exopolysaccharides
- Gfp : green fluorescent protein
- SST1-6 : Système de sécrétion de type I à VI
- ARNm : ARN messenger
- RBS : Ribosome binding site
- CF : Cystic Fibrosis
- MDR : Multi-Drug Resistant
- TLR : Toll-Like-Receptor
- QS : Quorum Sensing
- eDNA : ADN extracellulaire
- diGMPc : Di-Guanosine MonoPhosphate cyclique
- AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
- Hpt : Histidine phosphotransfert
- DO : Densité optique à 600 nm

Introduction

I- *Pseudomonas aeruginosa*

1- Historique

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négative ubiquiste de l'environnement qui a la propriété de coloniser un grand nombre de niches : eaux, sols, animaux, plantes, hommes. Ce microorganisme a été isolé en 1882 par le pharmacien et bactériologiste Carles Gessard qui, ayant observé une coloration bleue des plaies infectées, l'a dénommé « bacille pyocyanique » (coloration causée par un pigment produit par la bactérie : la pyocyanine). Il tient son nom moderne du terme latin *aeruginosa* signifiant « vert-de-gris » toujours en lien avec la coloration spécifique des plaies.

La souche de référence PAO1 (*P. aeruginosa* n° 01) a été isolée d'une blessure (causée par une brûlure) en Australie (Holloway, 1955). Au cours de la dernière décennie, *P. aeruginosa* est devenu un problème majeur de santé publique dans les hôpitaux. Chez les personnes immunodéprimées (grands brûlés, patients atteints de VIH, ...), ce pathogène opportuniste est capable de causer des infections aiguës sévères telles que des infections urinaires, cutanées et oculaires (kératite de porteurs de lentilles de contact), pneumonies, septicémies...(Carmeli et al., 1999, Jarvis. 2003, Obritsch et al., 2004). De plus, des infections pulmonaires sont communes chez les individus atteints de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), de pneumonie sous ventilation assistée (PVA), ou encore chez les malades atteints de mucoviscidose (Williams et al., 2010). Dans ces derniers, *P. aeruginosa* s'établit de manière durable dans leurs poumons provoquant une forte réaction inflammatoire chronique, ce qui entraîne une dégradation irrémédiable des tissus conduisant à une insuffisance respiratoire et à la mort des malades.

Les deux différents modes d'infections causées par *P. aeruginosa*, à savoir aiguë versus chronique, sont liés aux deux modes de vie de la bactérie. Dans le cas des infections aiguës, la bactérie est retrouvée sous une forme planctonique, mobile, agressive, se servant de toxines et d'enzymes dégradatives telles que des phospholipases, des métalloprotéases, des élastases... Tandis que lorsqu'elle se développe sous forme de biofilm en communauté sessile, la bactérie induit des infections chroniques où la majorité des dégâts dans les tissus sont infligés par le propre système immunitaire de l'hôte.

2- Le génome mosaïque de *P. aeruginosa*

Le premier génome de *P. aeruginosa* séquencé est celui de la souche PAO1 en 2000 (Stover *et al.*, 2000). Il est composé de 6,3 Mb et renferme 5570 gènes prédits. C'est l'un des génomes connus les plus larges parmi les bactéries Gram négatives. De plus, il contiendrait le plus grand pourcentage de gènes régulateurs prédits de tous les génomes bactériens (8,4% soit plus de 500 gènes dévolus à sa seule régulation (Stover *et al.*, 2000; Reva and Tummeler. 2004). A ce jour, de nombreux génomes de souches de *P. aeruginosa* ont été séquencés. Treize génomes (dont 9 séquencés entièrement) sont accessibles en ligne sur le site du Pseudomonas Genome Database (www.pseudomonas.com), et leur taille varie de 5,5 à 7 Mb.

La comparaison de la souche de référence PAO1 et de différents isolats cliniques a révélé « deux génomes » dans le génome : un « génome-cœur » conservé par toutes les souches de *P. aeruginosa* (représentant 90% de la totalité des gènes) et un « génome-accessoire » spécifique à chaque souche, déterminant souvent la virulence de la bactérie (Romling *et al.*, 1995). Ces régions non conservées sont dispersées tout le long du « génome-cœur » et constituent des régions de plasticité génomique (region of genomic plasticity ou RGP) encore appelées « îlots de pathogénicité » (Kung *et al.*, 2010).

Ainsi, dans les îlots de pathogénicité, sont retrouvés fréquemment :

- des ICEs (éléments conjugatifs et intégratifs),
- des îlots de remplacement,
- des éléments prophages et « phage-like »,
- des transposons, des intégrons ou des séquences d'insertion (IS)

Ceci illustre le fait que la majorité du génome-accessoire provient d'éléments ADN mobiles qui ont été souvent acquis par transfert horizontal et conservés par la bactérie. Certains de ces éléments ont perdu leur capacité à transposer à la suite d'une seconde mutation mais d'autres l'ont conservée et peuvent toujours s'exciser du génome tels que PAPI-1 et pKLC102. On reconnaît ces éléments car ils présentent un contenu en GC plus bas que celui du génome-cœur qui est d'environ 66,6%, des codons différents et une composition tétranucléotidique anormale, c'est-à-dire une différence dans les 8-14 mers répétés et propres à chaque organisme (Reva and Tummeler. 2004 ; Davenport *et al.*, 2009).

Une illustration de la plasticité du génome de *P. aeruginosa* est la comparaison entre PAO1 et la souche clinique PA14 hautement virulente (2^e génome séquencé, 6,5 Mb et 5892 gènes prédits (Lee *et al.*, 2006) (Figure 1). 54 régions génomiques (contenant au moins un

ORF) sont spécifiques à PAO1 tandis que 58 régions sont propres à PA14, comme par exemple la région PAPI-2 (He *et al.*, 2004) codant pour une des toxines de *P. aeruginosa* ExoU (une phospholipase dont la présence constitue un très mauvais pronostic pour les patients) (Figure 1).

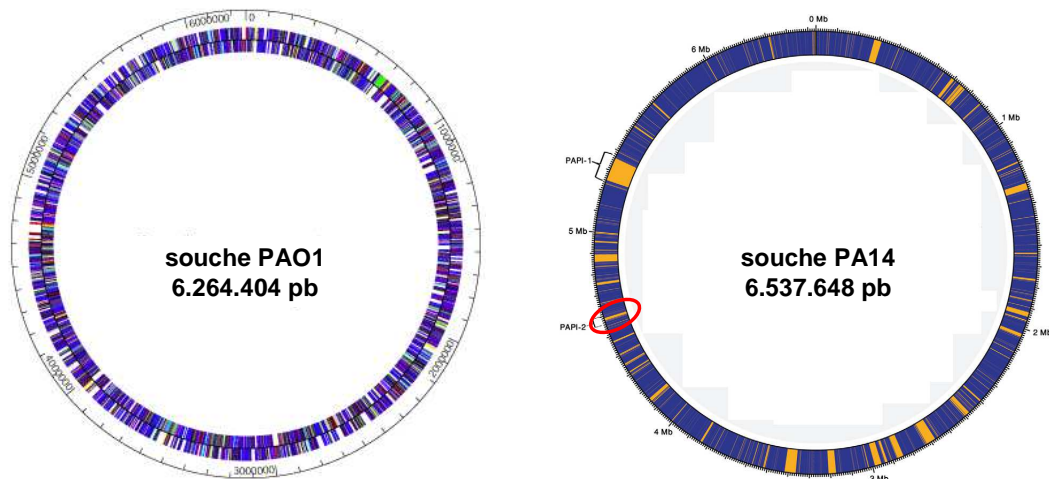


Figure 1 Représentation circulaire des génomes des souches PAO1 et PA14. Les régions bleues du génome de PA14 sont les zones conservées et celles en jaunes indiquent les « îlots de pathogénicité ». La zone encadrée en rouge est celle de l'îlot de pathogénicité PAPI-2 (d'après Pseudomonas genome database et (Wurtzel *et al.*, 2012))

Cette plasticité s'illustre donc par des événements d'acquisition de nouvel ADN étranger mais aussi par de petites ou larges délétions, des mutations de simples nucléotides et des inversions chromosomiques. Tous ces réarrangements peuvent conduire à l'activation de gènes en dormance ou à l'inactivation de gènes exprimés du chromosome. Cette abondance de gènes en dormance potentiellement activables donne un avantage significatif à *P. aeruginosa* pour s'adapter le mieux possible à des changements environnementaux.

3- *P. aeruginosa*: un pathogène opportuniste préoccupant

P. aeruginosa est un problème de santé publique puisqu'elle est responsable de 40% des pneumonies et est la cause principale des infections respiratoires (Lyczak *et al.*, 2000). De plus, ce pathogène opportuniste présente une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques usuels, tels que les aminoglycosides, les fluoroquinolones et les β -lactamines, due à sa très faible perméabilité membranaire (12 à 100 fois moins permissive que celle d'*Escherichia coli*) (Hancock. 1998). En effet, sa porine principale OprF a une limite d'exclusion très basse et refoule donc une grande majorité de molécules antibiotiques. *P.*

aeruginosa possède également une β -lactamase AmpC ainsi que de nombreuses pompes d'efflux très efficaces contre les antibiotiques (MexXY/OprM, MexAB/OprM ...).

Mais en plus de cette résistance intrinsèque, la force de ce pathogène réside dans sa capacité à acquérir une résistance adaptative par transfert horizontal d'éléments génétiques et aussi par des événements de mutation. Elle peut ainsi assimiler des plasmides, transposons, phages présentant de multiples cassettes de résistance, se rendant elle-même multi-résistante. Cette résistance adaptative se manifeste par exemple par un renforcement de la surproduction des pompes d'efflux, une pénétration réduite d'antibiotiques ou l'altération des cibles des antibiotiques (Figure 2A). Par exemple, il y a prolifération alarmante de souches cliniques contenant des plasmides codant pour des β -lactamases à spectre étendu et des métallo- β -lactamases qui désamorcent les carbapénèmes (Bush and Macielag. 2010). Ces phénomènes de résistance adaptative sont induits sous la pression sélective d'un antibiotique ou d'un stress particulier. Les hôpitaux sont donc malheureusement un terrain favorable à l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques (MDR pour multi-drug resistant).

Certains isolats cliniques possèdent cette très forte résistance aux antibiotiques et font partie d'un nouveau groupe de pathogènes responsables de la majorité des infections nosocomiales à l'hôpital. Il s'agit d'*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* et des espèces *Enterobacter* (Boucher *et al.*, 2013). Ils forment le groupe « ESKAPE » (nom issu de leur initiale) mettant en exergue leur capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte et leur multi-résistance aux antibiotiques.

Le dernier rempart antibiotique dans les hôpitaux, les carbapénèmes, sont de moins en moins efficaces contre ces souches multirésistantes (apparition de carbapénémases). En dernier recours, les cliniciens sont contraints de réutiliser d'anciennes molécules hautement toxiques y compris pour l'hôte, comme la colistine, qui avaient été abandonnées (Falagas and Kasiakou. 2005).

La recherche de nouvelles molécules antibiotiques pour lutter contre ces « super-pathogènes » est devenue une priorité pour tous. Malheureusement le nombre d'antibiotiques validés ne fait que diminuer depuis les années 80 (Figure 2B) et ces molécules sont de moins en moins efficaces contre le groupe « ESKAPE ». Ainsi la IDSA (Infectious Diseases Society of America) a lancé en 2010 un programme intitulé « 10 x'20 Initiative » : ce programme a pour but la découverte de 10 nouveaux composés antibiotiques. Il s'agit d'un programme global de Recherche et Développement d'antibactériens avérés et sans innocuité à l'horizon 2020 (Boucher *et al.*, 2013).

En parallèle, face au problème de ces souches MDR, il est primordial de mieux étudier les facteurs de virulence de ces bactéries et de développer des stratégies « anti-infectieuses », ciblant des facteurs de virulence ou des régulateurs globaux. Cela limiterait la pression de sélection et empêcherait l'installation de souches résistantes.

Ainsi, des inhibiteurs d'un des systèmes majeurs dans la virulence aiguë des bactéries Gram négatives, le système de sécrétion de type III (SST3), ont été récemment découverts. Il s'agit des Salicylidene Acylhydrazides, probables chélateurs du fer, qui bloquent la sécrétion des effecteurs de ce système (Kauppi *et al.*, 2003). Ces molécules sont efficaces sur les SST3 de *Yersinia*, *Chlamydia*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella*. Entre 2002 et 2011, de nombreux programmes de criblages ont été réalisés et ont conduit à la découverte d'une quinzaine de composés dirigés contre le SST3 des bactéries Gram négatives (Duncan *et al.*, 2012).

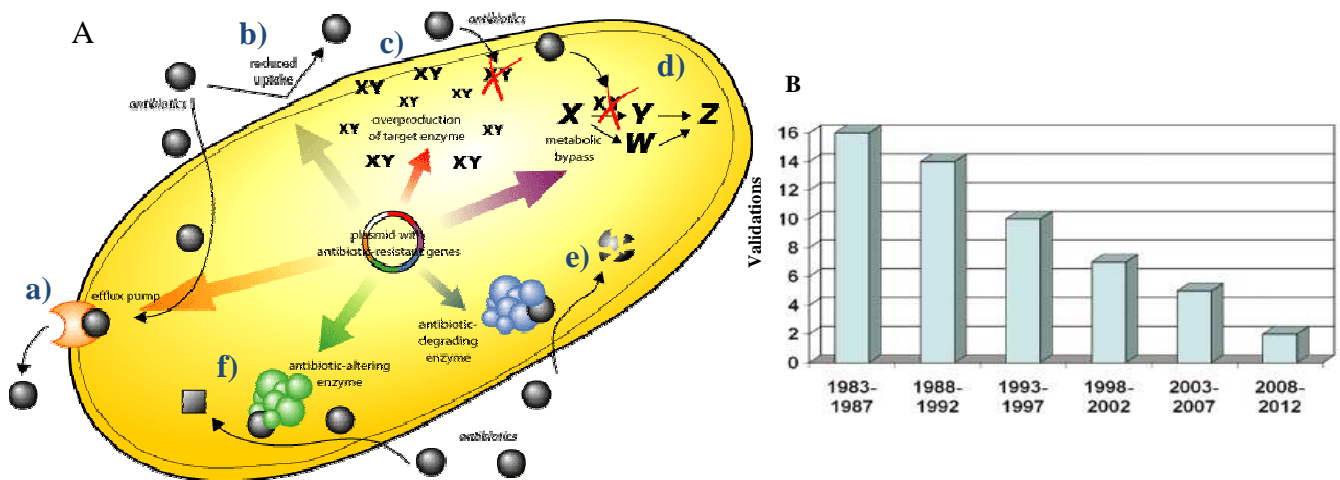


Figure 2 A/ Les principaux mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques (S.Wilcox, 2004) : a) surproduction de pompes à efflux, b) perméabilité membranaire contrôlée, c) surproduction de la cible de l'antibiotique, d) création de court-circuits métaboliques, e) dégradation de l'antibiotique et f) inactivation de l'antibiotique. B/ Nouveaux agents antibactériens systémiques approuvés par la FDA (US Food and Drug Administration) par période de 5 ans jusqu'en 2012 (Boucher *et al.*, 2013).

4- La mucoviscidose : terrain propice à de multiples infections et à des modifications génomiques

La mucoviscidose, ou « cystic fibrosis » (CF), est une maladie génétique récessive ayant une fréquence oscillant entre de 1/8000 et 1/10000 naissances parmi les populations caucasiennes. Par contre, elle touche très peu les populations asiatiques et africaines. Cette

maladie résulte d'une mutation au niveau du gène codant pour le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui est un canal à ion chlorure AMPc-dépendant (Boucher. 2004). Plus de 1500 mutations potentielles ont été recensées sur le gène *cftr* qui est localisé sur le chromosome 7. Le canal muté n'est plus capable de transporter les ions chlorure à l'extérieur des cellules épithéliales, abaissant le niveau de fluide ciliaire et empêchant la clairance mucociliaire des microorganismes inhalés. Cette absence de fluidité va conduire à une accumulation de mucus, terrain propice à l'installation des bactéries opportunistes, telles que *P. aeruginosa*, qui vont déclencher une réaction inflammatoire de l'hôte (dégagement d'espèces réactives de l'oxygène, ROS) dans le but d'éliminer les bactéries (Folkesson *et al.*, 2012). Au cours du temps, cette libération de ROS va provoquer une destruction des tissus pulmonaires et une diminution critique de la capacité respiratoire conduisant à la mort du patient. Les individus non traités meurent très jeunes de cette insuffisance respiratoire. Actuellement, grâce aux traitements antibiotiques intensifs, l'espérance de vie des malades oscille entre 35 et 48 ans (Hoiby *et al.*, 2011).

La première infection à *P. aeruginosa* se produit le plus souvent dans les voies aériennes supérieures pendant l'enfance du patient. Puis il y a évolution et adaptation des bactéries (voir plus loin) qui iront s'établir dans les poumons. Bien que pathogène majoritaire des infections CF, *P. aeruginosa* n'est pas la seule bactérie à être détectée dans les poumons. Il y a très tôt co-infection avec d'autres pathogènes opportunistes : des bactéries (*S. aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cenocepacia*, *A. baumannii*, *Haemophilus influenzae*,...) mais aussi des champignons (*Candida albicans* et des espèces *Aspergillus*) (Delhaes *et al.*, 2012 ; Harrison. 2007) (Figure 3).

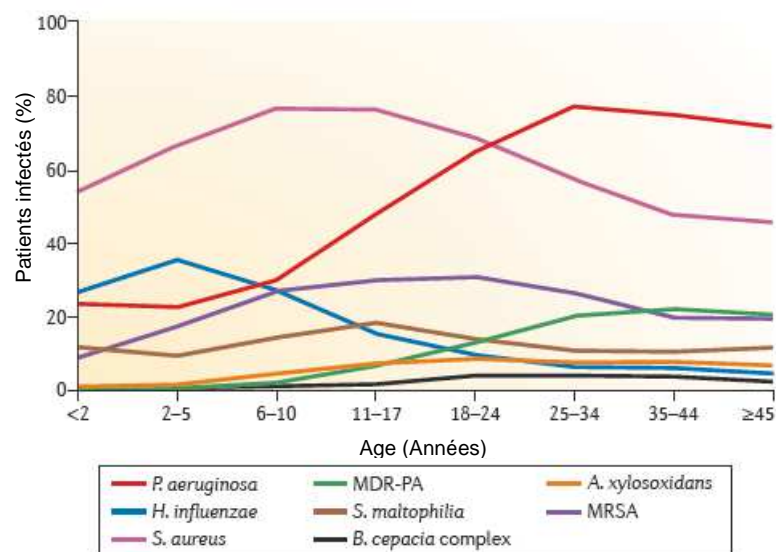


Figure 3 Persistance de différents pathogènes dans des poumons CF au cours du temps. Nous pouvons noter la prévalence de *P. aeruginosa* comparée aux autres pathogènes opportunistes (Folkesson *et al.*, 2012).

a) Initiation de l'infection

Pour s'établir dans une niche, *P. aeruginosa* doit avant tout déstabiliser l'organisation cellulaire établie. Elle va donc provoquer une réaction inflammatoire grâce à ses appendices extracellulaires qui sont reconnus par les TLR5, 2 et 4 des leucocytes, ce qui va activer la voie NF- κ B (McIsaac *et al.*, 2012 ; Amiel *et al.*, 2010). Cette voie est celle correspondant à un stress cellulaire et est responsable de l'activation de la réponse immunitaire.

Les rhamnolipides bactériens (surfactants sécrétés) sont impliqués dans la destruction des micro-cils (Read *et al.*, 1992). Par le biais d'enzymes et de toxines telles que l'exotoxine A, les effecteurs du SST3, la pyocyanine, la bactérie va détériorer la couche épithéliale pulmonaire, rompre la polarité cellulaire, induire des dégâts et surtout empêcher son endocytose et sa clairance. Ceci va lui permettre de s'établir dans les meilleures conditions (Engel and Eran. 2011).

b) Persistance dans les poumons

Le poumon CF est un environnement hostile pour les bactéries même établies puisqu'il présente une forte hypoxie, un stress antibiotique, un stress osmotique dû au mucus mais aussi un stress oxydant lié à une réponse inflammatoire du système immunitaire (principalement les leucocytes polymorphonucléaires) (Armstrong *et al.*, 1995). La bactérie doit donc composer avec tous ces nouveaux éléments si elle veut survivre dans les poumons CF et elle opère une profonde transition dans le profil d'expression de ses gènes. Ainsi le contact avec le mucus est responsable d'un changement d'expression de nombreux gènes de la bactérie comme cela a été montré avec une analyse par RNA-seq (Cattoir *et al.*, 2013), et la bactérie va notamment activer les gènes impliqués dans sa protection contre le stress oxydant. De plus, la reprogrammation de la bactérie est en partie gouvernée par le facteur sigma AlgU (σ^{22}) activé lors d'un stress ressenti au niveau de l'enveloppe par la protéine périplasmique MucB. Le signal est transmis à MucA, l'anti-facteur sigma membranaire d'AlgU, qui libère alors AlgU, ce qui conduit à la fois à une régulation négative du métabolisme central, de la motilité, de la virulence, et à une régulation positive des gènes altérant la perméabilité membranaire, les efflux et les alginates (Anderson *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2004).

En réponse au stress oxydatif, à la dessiccation et aux antibiotiques, les bactéries se développent en biofilms protecteurs (cf partie biofilm). De plus, au sein de ce biofilm,

certaines bactéries se mettent à surproduire des alginate, qui sont des exopolysaccharides les recouvrant et leur conférant un phénotype « mucoïde ». Ce revêtement a deux avantages : il offre une protection contre les produits de l'inflammation en empêchant l'activation du complément et en diminuant la phagocytose par les macrophages et neutrophiles tout en compliquant la pénétration des antibiotiques (Cabral *et al.*, 1987 ; Meshulam *et al.*, 1982). Cette transition en phénotype mucoïde est la plupart du temps la conséquence d'une mutation dans le gène *mucA* qui ne peut plus séquestrer le facteur sigma AlgU (*Cf chapitre CHA*).

La libération de ROS peut entraîner la mutation de *mutS* codant pour l'un des éléments d'un système de réparation des cassures d'ADN double brin (Oliver *et al.*, 2000, Oliver *et al.*, 2002). Ce « mauvais » fonctionnement de l'appareil de réparation conduit à la multiplication de mutants et conduit à un phénotype « hyper mutateur » puisque 30 à 60% de mutants *mutS* peuvent être retrouvés dans une population CF (Ciofu *et al.*, 2005 ; Lujan *et al.*, 2011).

Au cours du temps, la bactérie va accumuler de nombreuses mutations au niveau de régulateurs clés de la virulence : *lasR*, *exxA*, *mucA*, *rpoS* (Smith *et al.*, 2006). La cohabitation de différents phénotypes répondant différemment aux traitements antibiotiques explique le fait qu'il soit très difficile, voire impossible, d'éliminer cette bactérie une fois installée dans les poumons. Les fluoroquinolones et la tétracycline ne sont efficaces que sur les couches supérieures du biofilm (Pamp *et al.*, 2008). Ils ne tuent que les bactéries métaboliquement actives, tandis que la colistine élimine seulement les bactéries se divisant très peu (couches profondes du biofilm) (Pamp *et al.*, 2008). C'est d'ailleurs la persistance de *P. aeruginosa* conduisant à un dégagement de ROS par les cellules de l'immunité qui cause la destruction progressive des tissus pulmonaires et provoque la mort de l'hôte.

La vie de la bactérie dans les poumons CF peut être considérée comme une vie « au repos ». Elle perd ses attributs agressifs tels que la mobilité, les systèmes de sécrétion d'infection aiguë, pour adopter un style de vie communautaire immobile, en biofilm (Nguyen and Singh. 2006).

5- Le biofilm : un environnement polymicrobien inter et intra-espèces

Mode de vie principal des bactéries, le biofilm est une communauté structurée dans laquelle les bactéries se regroupent et s'engluent dans une matrice constituée principalement d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire et de protéines (Flemming and Wingender.

2010). Toutefois, la composition n'est pas immuable puisqu'il existe des biofilms sans exopolysaccharides (de Bentzmann *et al.*, 2012). Des biofilms sont retrouvés dans différentes niches environnementales comme les sources chaudes et les cheminées hydrothermales, les rivières, les rochers, mais aussi sur des dispositifs industriels et médicaux (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Son établissement se fait en plusieurs étapes (Figure 4). La première est une étape d'attachement pendant laquelle des bactéries mobiles viennent adhérer au support et perdent leur appendices extracellulaires. Puis s'ensuit une initiation du biofilm avec surproduction d'exopolysaccharides et constitution de microcolonies. Par la suite, une formation de structures en 3 dimensions en forme de champignons s'opère : c'est la maturation du biofilm. Pour finir, le biofilm s'ouvre et disperse dans le milieu de nouvelles bactéries flagellées qui vont pouvoir recommencer le cycle en s'établissant ailleurs.

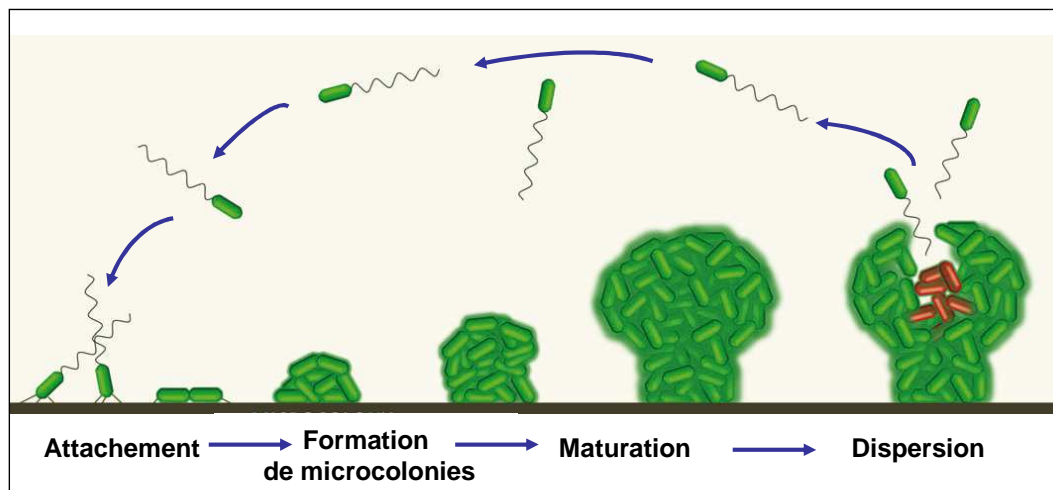


Figure 4 Dynamique d'un biofilm (d'après (Mikkelsen *et al.*, 2011))

Cette structure particulière présente un gradient d'oxygène, de nutriments,... conduisant à l'existence de plusieurs sous-populations, chacune adaptée à sa strate et réagissant différemment aux traitements antibiotiques (Rani *et al.*, 2007). En plus de cette variété au sein de la même souche, il peut aussi exister une cohabitation inter-espèces. Dans le cas des infections CF, des biofilms partagés par *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* ont été retrouvés, avec possibilité d'une interaction synergétique entre les bactéries car la biomasse de *P. aeruginosa* a même été trouvée augmentée (Bragonzi *et al.*, 2012).

II- Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Pour initier une infection ou s'installer durablement chez l'hôte, *P. aeruginosa* dispose d'un éventail de facteurs de virulence. Je vais décrire ici les facteurs les plus pertinents pour la suite de mon étude.

1- Les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion et la motilité

Lors de la phase d'attachement à une surface biotique ou abiotique, la bactérie doit d'abord se rapprocher de sa cellule cible et établir un contact avec elle. Pour effectuer cela, la bactérie dispose de facteurs de mobilité et d'adhésion que sont le flagelle et les pili de type IV (Bucior *et al.*, 2012) (Figure 5).

La bactérie possède d'autres adhésines appelées fimbriae qui sont produites au travers de la voie Cup pour Chaperone Usher Pathway. Cette voie a été découverte pour la première fois dans une souche PAK dépourvue de pili de type IV et incapable de produire des biofilms (Vallet *et al.*, 2001). Cinq voies de synthèse des fimbriae ont été identifiées : CupA, CupB, CupC, CupD et CupE. Les fimbriae sont impliquées dans l'adhésion (CupA) et la formation de biofilm (CupB et CupC) (Figure 5). Les fimbriae constituées de la protéine CupE1 à la surface de la membrane bactérienne jouent un rôle prépondérant lors de la formation de micro et macrocolonies dans les biofilms ; mais également pendant l'établissement de biofilms en structures 3D (dites en « champignons ») (Giraud *et al.*, 2011).

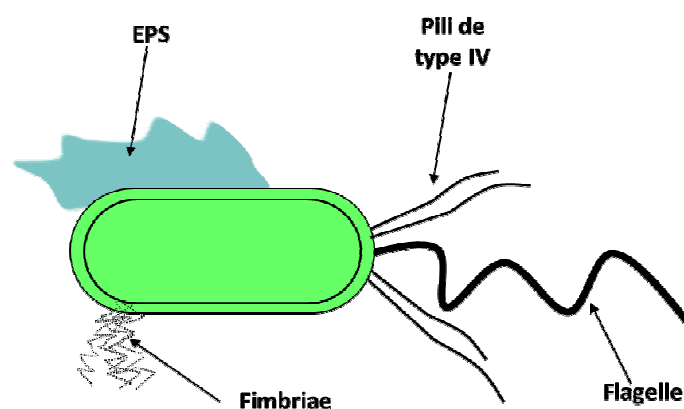


Figure 5 Appendices extracellulaires et exopolysaccharides (EPS) à la surface de *P. aeruginosa*

a) Le flagelle

Le flagelle est un appendice extracellulaire unique et polaire composé d'un corps basal ou moteur rotatif (Berg and Anderson. 1973 ; Silverman and Simon. 1974), d'un crochet flexible et d'un filament rigide (DePamphilis and Adler. 1971b, DePamphilis and Adler. 1971a) constitué de polymères de flagelline codée par *fliC* (Figure 6). L'ultrastructure du corps basal du flagelle est très similaire à celle de l'appareil de sécrétion du SST3 de *P. aeruginosa* (Blocker *et al.*, 2003). Ces deux machineries présentent une forte conservation de leur structure et il existe une régulation négative croisée directe entre la mobilité flagellaire et un SST3 actif (Soscia *et al.*, 2007).

Le flagelle permet à la bactérie de se déplacer dans un milieu aqueux par « swimming » mais également sur des surfaces semi-solides (réduction des tensions par la bactérie en sécrétant des biosurfactants). L'un des rôles du flagelle est sa contribution à la mise en place du biofilm bactérien. De plus, le flagelle est impliqué dans la virulence aiguë de la bactérie : en effet, un mutant $\Delta fliC$ présente une virulence amoindrie (délai dans la mortalité) dans un modèle de pneumonie chez la souris.

La flagelline est reconnue par le système immunitaire grâce au TLR5 ce qui déclenche la voie de signalisation NF-KappaB et conduit à une réponse immunitaire (Balloy *et al.*, 2007) ; (Bardoel *et al.*, 2011). Il a été montré que le flagelle est nécessaire et suffisant pour la fixation des bactéries aux protéoglycane à héparane sulfate et pour leur internalisation par le domaine basolatéral de la cellule épithéliale polarisée (Bucior *et al.*, 2012). L'internalisation permettrait à la bactérie de pénétrer la couche de cellules épithéliales, d'atteindre la circulation sanguine et de disséminer dans les organes distaux et /ou elle représenterait un mécanisme de défense de l'hôte contribuant à la clairance de la bactérie (Engel and Eran. 2011) ;(Pier. 2000). Il est donc primordial dans un premier temps pour la bactérie qui veut s'établir dans l'hôte d'exprimer cet antigène facilement reconnaissable par le système immunitaire et, dans un deuxième temps, de le réprimer pour faciliter son établissement.

b) Les pili de type IV

Ce sont des appendices extracellulaires polaires constitués de polymères de piline codée par *pilA* et responsables du twitching (Bradley. 1980) (Figure 5). Ce mode de déplacement particulier repose sur l'assemblage et le désassemblage des pili de type IV ce qui

permet à la bactérie de se mouvoir sur une surface solide. Il existe deux pili de type IV : ceux de types a impliqués dans la mobilité (homogènes et largement répandus) et ceux de type b responsable de l'adhésion (plus hétérogènes).

Avant la phase d'attachement, la bactérie va se rapprocher du support grâce à son flagelle et va pouvoir adhérer au support. Il y aura donc formation d'une couche de bactéries sur la surface. Les pili de type IV interviennent par la suite dans la formation de microcolonies (O'Toole and Kolter. 1998).

Les pili de type IV sont nécessaires et suffisants pour la fixation de la bactérie aux N-glycanes et pour son internalisation par le pôle apical de la cellule épithéliale polarisée (Bucior *et al.*, 2012). En plus, des mutants $\Delta pilT$ (sans ATPase) s'organisent en biofilms épais et sont incapables de former des biofilms différenciés (Chiang and Burrows. 2003). Le rôle de ces pili a également été montré dans la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, un mutant $\Delta pilT$ ou $\Delta pilU$, dépourvu d'ATPases rétractiles, présente une virulence anormale dans un modèle d'infection de la cornée (Alarcon *et al.*, 2009).

2- Les facteurs de virulence impliqués dans la formation de biofilm

En plus de ses appendices extracellulaires, la bactérie *P. aeruginosa* a besoin pour l'établissement de son biofilm de produire des exopolysaccharides (Figure 5), des protéines et de l'ADN extracellulaire.

a) Les exopolysaccharides (EPS)

- les exopolysaccharides Psl (Polysaccharides synthesis locus)

Riches en mannose et en galactose, les Psl sont impliqués dans l'initiation du biofilm puisqu'ils constituent un échafaudage liant les bactéries entre elles mais également au support. De plus, ils interviennent aussi dans la maturation du biofilm en maintenant son architecture. En microscopie sur une structure 3D, les Psl sont observés à la périphérie du biofilm (Luyan *et al.*, 2009). Produits pendant la croissance planctonique, ils contribuent à l'attachement aux surfaces et sont responsables de la formation de microcolonies. Ils constituent également la première ligne de défense contre les antibiotiques (Billings *et al.*, 2013).

- les exopolysaccharides Pel

Polymères de type cellulose, riches en glucose, la nature de leur structure est pour l'instant indéterminée (Coulon *et al.*, 2010). Ils sont critiques dans la formation de pellicules à l'interface air-liquide (Friedman and Kolter. 2004) et sont impliqués dans la formation de biofilm statique. Leur surproduction conduit à des colonies au phénotype « ridé ».

- les alginates

Ce sont des polysaccharides composés d'acides mannuronique et guluronique principalement produits par les algues brunes. Seulement deux genres bactériens en produisent également : *Pseudomonas* et *Azotobacter*. *P. aeruginosa* les surproduit dans les poumons des patients CF lors d'infections chroniques (Narbad *et al.*, 1990). Ils constituent la première barrière contre les traitements antibiotiques et les mécanismes de défense immunitaire (Cabral *et al.*, 1987). La production des alginates représente le marqueur indéniable d'une infection chronique et est assimilée à une forte persistance et un mauvais pronostic vital (Hoiby. 1977; Pedersen *et al.*, 1992).

3- L'ADN extracellulaire (« eDNA »)

En plus des exopolysaccharides, l'ADN extracellulaire est un composant essentiel du biofilm. Il provient de la lyse d'une sous-population de bactéries et est impliqué dans les interactions cellule-cellule du biofilm (Gloag *et al.*, 2013). L'ADN extracellulaire contribue lui aussi à maintenir l'architecture du biofilm. En plus d'une activité antimicrobienne, il possède également une activité chélatrice de cations, tout comme les EPS (Mulcahy *et al.*, 2008). Dans la visualisation d'un biofilm en forme de champignon, cet ADN est majoritairement retrouvé dans la « tige » (Allesen-Holm *et al.*, 2006).

Le mécanisme conduisant à la lyse d'une partie de la population bactérienne n'est pas clairement défini. Cependant, certains processus ont été décrits :

- la présence d'une petite molécule volatile, la 2-amino acétophénone (2-AA), diviserait de manière stochastique les bactéries en deux sous-populations : celles touchées par la 2-AA subissent de nombreuses mutations des régulateurs et s'orientent vers une infection chronique, et celles qui sont insensibles à la 2-AA vont lyser (Kesarwani *et al.*, 2011).
- la pyocyanine est un facteur de virulence produit par la bactérie qui présente des propriétés redox. Elle favoriserait la libération d'ADN extracellulaire par lyse cellulaire due à la génération de peroxyde d'hydrogène (Das and Manefield. 2013).

- Récemment au dernier congrès « Pseudomonas 2013 », Lynn Turnbull a montré qu'au sein d'un biofilm, des bactéries pouvaient s'arrondir et exploser libérant ainsi leur ADN. Ce phénomène se produit à une fréquence de 1/400 à 1/1000 bactéries, par un mécanisme encore non expliqué.

4- Les systèmes de sécrétion de toxines et d'effecteurs

Dans le but de libérer des effecteurs ou encore de l'ADN à l'extérieur de leur enveloppe, les bactéries Gram négative ont élaboré des nanomachineries d'export appelées systèmes de sécrétion. Ils sont très répandus au sein des différents génomes analysés et sont classés du SST1 au SST6 (Figure 6). Cependant, *P. aeruginosa* ne possède pas de SST4.

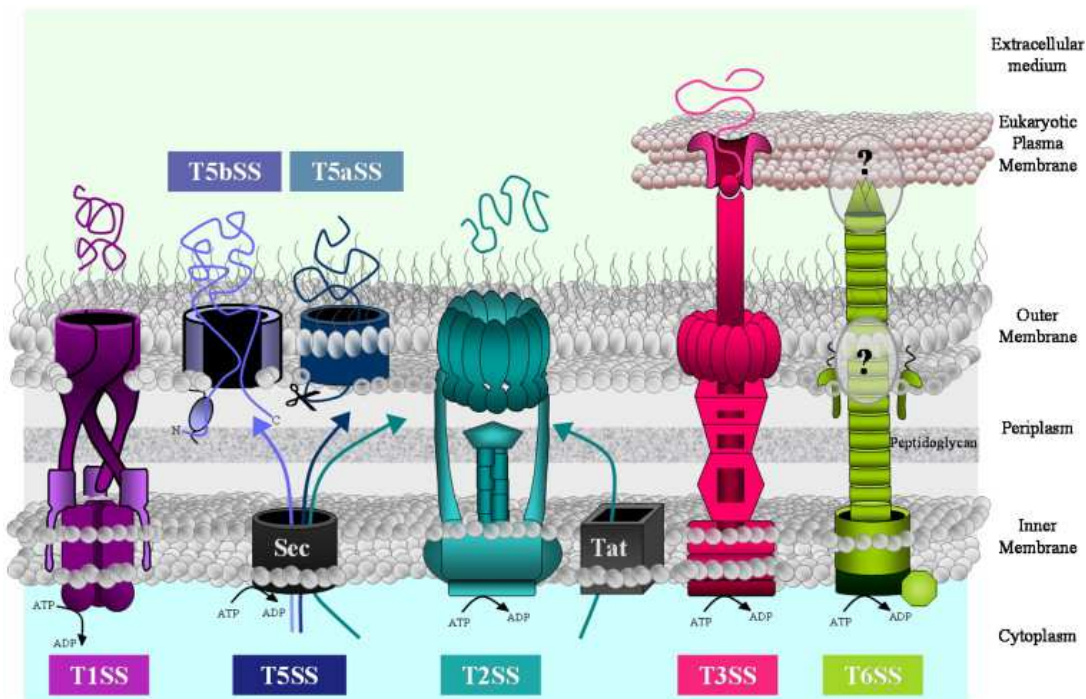


Figure 6 Les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*. Sec et Tat : sécrétion générale. Les systèmes de sécrétion libérant leurs substrats dans le milieu extracellulaire : SST1, SST2 et SST5. Les systèmes de sécrétion injectant les toxines dans la cellule-cible : SST3 et SST6 d'après (Bleves et al., 2010)

P. aeruginosa possède en plus de ses SST, une voie de sécrétion générale (GSP) permettant le passage du cytoplasme au périplasma de :

- molécules dépliées via le système Sec (Papanikou *et al.*, 2007)
- molécules repliées via le système Tat (Twin Arginine Tandem) (Sargent. 2007)

Une fois dans le périplasma, ces molécules sont prises en charge par leur système de sécrétion approprié, SST2 ou SST5.

a) Le Système de Sécrétion de Type I (SST1)

Ce système est composé de trois éléments : une protéine de la membrane interne ayant un motif de fixation à l'ATP (« ATP-Binding Cassette ou ABC protein »), une périplasmique et une située dans la membrane externe. La sécrétion se fait en une étape : les produits passent directement du cytosol dans le milieu extracellulaire (Figure 6). Le SST1 de référence est le système HlyA d'*E. coli* qui comprend les protéines HlyB (motif de fixation à l'ATP), la protéine HlyD (membrane interne) et TolC (membrane externe) (Mackman *et al.*, 1985).

P. aeruginosa exprime deux SST1 et les gènes codant pour le premier système AprDEF sont tous regroupés dans un même cluster. Les principaux effecteurs sécrétés sont la protéase alcaline AprA (Guzzo *et al.*, 1990) et AprX, protéine de fonction inconnue (Duong *et al.*, 2001).

AprA clive les monomères de flagelline empêchant ainsi leur reconnaissance par le TLR5 (Bardoel *et al.*, 2011). Elle dégrade également les protéines du complément C1q, C2 et C3 ainsi que l'interféron γ (Laarman *et al.*, 2012; Hong and Ghebrehiwet. 1992; Parmely *et al.*, 1990). La disparition des protéines du complément est associée à un blocage de la phagocytose et à l'arrêt de la lyse bactérienne par les neutrophiles (Laarman *et al.*, 2012). Cette protéase alcaline est donc une enzyme essentielle à l'établissement de la bactérie dans les poumons.

Le deuxième SST1, le système HasDEF, intervient dans l'incorporation du Fer (Letoffe *et al.*, 1998). Il comprend une protéine HasAp, sécrétée par le SST1. La protéine HasAp va se fixer à l'hème de l'hémoglobine. Le complexe hème-HasAp est ensuite adressé à un récepteur membranaire HapR, qui sera chargé de l'internalisation de l'hème dans la bactérie (Letoffe *et al.*, 1999). Il y a très peu de fer disponible au sein de l'hôte ; la sécrétion d'un hémophore tel que HasAp est primordiale à la bactérie pour incorporer du fer aux stades précoces de l'infection : ce SST1 est exprimé dans le cas d'une infection aiguë.

b) Le Système de Sécrétion de Type II (SST2)

Dans le cas du SST2, la sécrétion se fait en 2 étapes : le passage des effecteurs du cytosol au périplasma est assuré par le GSP puis le SST2 se charge du transfert des protéines du périplasma au milieu extracellulaire (Figure 6). Ainsi des mutants de ce système voient leurs effecteurs s'accumuler dans le périplasma.

Il existe trois SST2 chez *P. aeruginosa* : le premier est codé par les gènes *xcp* constituant un cluster de 11 gènes (*xcpP-Z*) (Filloux. 2004). Cependant, un 12^e gène localisé ailleurs dans le chromosome est essentiel au bon fonctionnement du SST2. Il s'agit de *xcpA/pilD* également nécessaire à la piliation de type IV (Nunn and Lory. 1991). Il assure la sécrétion d'une douzaine de substrats comprenant des élastases, des lipases, des phospholipases, une phosphatase alcaline, l'exotoxine A, toutes primordiales lors d'infections aiguës. Ce système est régulé par le quorum sensing (QS, forme de communication bactérienne basée sur la densité d'une population) (Chapon-Herve *et al.*, 1997).

Le deuxième SST2 est codé par les 11 gènes *hxcP-Z* homologues à *xcpP-Z*. Contrairement au SST2 Xcp, on ne lui connaît qu'un seul substrat: la phosphatase alcaline LapA. De plus, ce système n'est fonctionnel que lorsque le niveau de phosphate est limité dans le milieu (Ball *et al.*, 2002).

Un troisième SST2, a été identifié récemment dans la souche clinique PA7 et lui est spécifique (Roy *et al.*, 2010).

c) Le Système de Sécrétion de Type III (SST3)

Découvert en 1996 chez *P. aeruginosa* (Yahr *et al.*, 1996), le SST3 est le facteur de virulence majeur responsable de l'effet cytotoxique de cette bactérie et des infections aiguës qu'elles provoquent (Hauser *et al.*, 2002 ; Hauser. 2009). Il est entièrement dévolu aux cellules eucaryotes (amibes, insectes, zebra-fish, mammifères) : il permet d'injecter directement des toxines dans le cytoplasme des cellules-cibles (Cornelis. 2010). Cet appareil de sécrétion est appelé « injectisome » car les toutes premières images montraient une structure se rapprochant d'une aiguille (Kubori *et al.*, 1998).

L'appareil de sécrétion du système, représenté Figure 7, est composé d'une vingtaine de protéines nommées Pop (Pseudomonas outer protein), Psc (Pseudomonas secretion component) ou Pcr (Pseudomonas low calcium response) formant :

- le corps basal, ou sécréton, formé de deux anneaux ancrés dans les membranes internes et externes de la bactérie.
- l'aiguille constituée de la protéine PscF, longue d'environ 500 Å et large de 70 Å, avec un diamètre interne de 25 Å (Cordes *et al.*, 2003). Elle est indispensable à l'injection (Blocker *et al.*, 2008).
- le translocon, inséré dans la membrane de la cellule-cible, composé de trois protéines : PopB, PopD et PcrV. Ce système d'ancrage est essentiel au bon

fonctionnement du SST3. PopB et PopD forment le pore membranaire de 20 à 30 Å tandis que PcrV semble favoriser leur insertion dans la membrane de la cellule-cible (Dacheux *et al.*, 2001, Schoehn *et al.*, 2003, Goure *et al.*, 2004) .

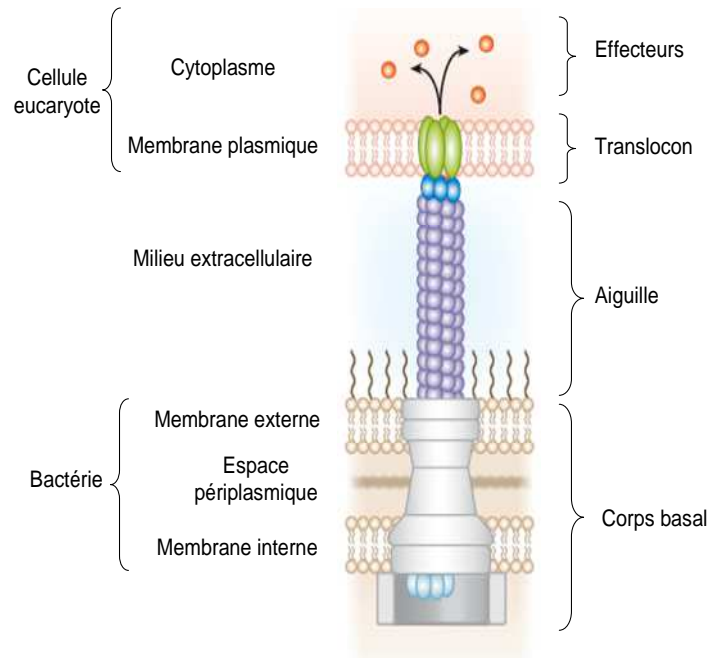


Figure 7 Représentation schématique du SST3 situé dans l'enveloppe de *P. aeruginosa* (d'après (Hayes *et al.*, 2010)).

L'adressage direct des protéines au SST3 nécessite un signal de sécrétion. De nombreuses études ont fait part d'un signal codé soit dans l'ARNm (séquences en 5' de certains effecteurs sont responsable de l'adressage), soit dans la séquence peptidique (les résidus 1-25 formant un signal de sécrétion N-terminal très variable dans sa séquence) (McDermott *et al.*, 2011) . De plus, les séquences-signal des substrats précoces tels que ceux de l'aiguille diffèrent de celles des substrats tardifs comme les effecteurs. Il y a très peu de données concernant l'adressage direct à l'appareil de sécrétion du SST3 des substrats précoces.

Une spécificité du SST3 est la présence de protéines nommées chaperonnes. Ces protéines forment des complexes avec un effecteur (chaperonnes de classe I), avec les protéines du translocon (chaperonnes de classe II) et également avec les protéines de l'aiguille (chaperonne de classe III) (Thomas *et al.*, 2012). Elles sont essentielles à leur stabilité, leur sécrétion, leur bon repliement ainsi que leur dissociation. Ainsi, PopB et PopD sont complexées avec la même chaperonne PcrH (Schoehn *et al.*, 2003) tandis que SpcS est associée soit à ExoS, soit à ExoT (Yahr *et al.*, 1995, Shen *et al.*, 2008) et SpcU à ExoU (Finck-Barbancon *et al.*, 1998).

Les toxines de *P. aeruginosa* injectées par le SST3 sont au nombre de 4 : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. ExoS et ExoT possèdent un domaine activateur de GTPase (GAP) et un autre

ayant une activité Adénosine Diphosphate ribosyl transférase (ADPRT) (Garrity-Ryan *et al.*, 2004). ExoT ADP-ribosyle le domaine SH2 des protéines cytosoliques Crk de l'hôte, impliquées dans l'adhésion focale et la phagocytose (Sun and Barbieri. 2003), tandis que ExoS ADP-ribosyle de multiples membres eucaryotes de la famille Ras tels que RhoA, Rac1 et Cdc42 (Henriksson *et al.*, 2002). ExoS et ExoT inhibent la phagocytose en perturbant le réarrangement du cytosquelette d'actine, les adhésines focales et les cascades de transduction du signal essentielles à la fonction phagocytaire (Barbieri and Sun. 2004). ExoU est une phospholipase causant de sérieux dégâts membranaires et une lyse cellulaire (Phillips *et al.*, 2003),(Sato *et al.*, 2003). ExoY est une adénylate cyclase responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire (Yahr *et al.*, 1998).

Toutefois, généralement dans le cytoplasme de la cellule cible ne sont retrouvées à chaque fois que trois toxines (ExoS, T, Y ou ExoU, T, Y), les deux toxines ExoS et ExoU s'excluent mutuellement (Berthelot *et al.*, 2003 ; Wolfgang *et al.*, 2003b ; Kulasekara *et al.*, 2006). Une étude sur 100 isolats a révélé que 72% des souches possédaient uniquement le gène codant pour ExoS et 28% celui codant pour ExoU (Feltman *et al.*, 2001). Chez les isolats CF, les souches exprimant ExoU sont beaucoup moins fréquentes.

Le SST3 est un système activé par contact avec la cellule-cible dont la régulation sera détaillée plus loin.

d) Le Système de Sécrétion de Type V (SST5)

C'est le système le plus simple parmi tous ceux que possède la bactérie et il en existe deux sous-types. Le premier est appelé autotransporteur ou SST5a et requiert pour son fonctionnement un seul polypeptide possédant un domaine transporteur en tonneau β et un domaine protéase (Figure 6).

Quatre SST5a ont été identifiés chez *P. aeruginosa* dont l'estérase EstA. Son domaine N-terminal, qui possède une activité lipolytique, est sécrété par son domaine en tonneau β C-terminal inséré dans la membrane externe (Wilhelm *et al.*, 1999 ; Akoh *et al.*, 2004).

Le deuxième type de SST5, un peu plus élaboré, est appelé système de sécrétion à deux partenaires (« Two partner secretion system » ou TPS) ou SST5b (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001, Mazar and Cotter. 2007). Dans ce système, le domaine en tonneau β et le domaine passager (à transporter) sont portés par deux protéines distinctes, respectivement TpsB et TpsA (Figure 6). Il a été identifié 6 TPS chez *P. aeruginosa*, dont le TPS constitué de CdrA/CdrB : CdrA est une adhésine putative, favorisant la formation du biofilm et l'auto-

agrégation bactérienne dans des cultures liquides (Borlee *et al.*, 2010). Dernièrement, notre laboratoire a pu identifier un nouveau TPS codé par un isolat clinique de *P. aeruginosa*. Il est composé du transporteur ExlB et de l'exolysine ExlA qui serait responsable de la forte virulence de cette souche (Elsen *et al.*, in press).

e) Le Système de Sécrétion de Type VI (SST6)

Récemment, un autre système complexe permettant l'injection de toxines dans le cytoplasme d'une cellule cible a été découvert chez *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006): le SST6. Il est retrouvé chez la plupart des bactéries Gram négative pathogènes ou non, en simple ou plusieurs exemplaires (Boyer *et al.*, 2009). Il est constitué d'au moins 13 protéines formant l'appareil de sécrétion, éventuellement accompagnées de protéines accessoires. L'appareil de sécrétion présente une structure particulière puisqu'il s'agit d'un bactériophage à l'envers (Kanamaru, 2009) (Figure 8). En effet, les deux protéines majeures de l'appareil de sécrétion, Hcp et VgrG, présentent des homologies avec des composants des phages. Ainsi, Hcp (hemolysin co-regulated protein), qui forme des anneaux hexamériques, a des homologies structurales avec la protéine gpV du phage λ et elle est supposée former le tube de sécrétion (Ballister *et al.*, 2008, (Mougous *et al.*, 2006 ; Pell *et al.*, 2009). Le trimère VgrG, outil supposé de perforation membranaire, se situe à la pointe du tube et présente lui des similarités avec les protéines gp5-gp25 du phage T4 (Leiman *et al.*, 2009). Le SST6 comprend aussi, chez *P. aeruginosa*, deux protéines TssB et TssA (de type VipA/VipB), qui vont former un fourreau autour du tube Hcp et vont constituer une unité contractile permettant l'éjection de Hcp-VgrG hors de la bactérie pour cibler la membrane de la cellule cible (Basler *et al.*, 2012; Bonemann *et al.*, 2009) (Figure 8).

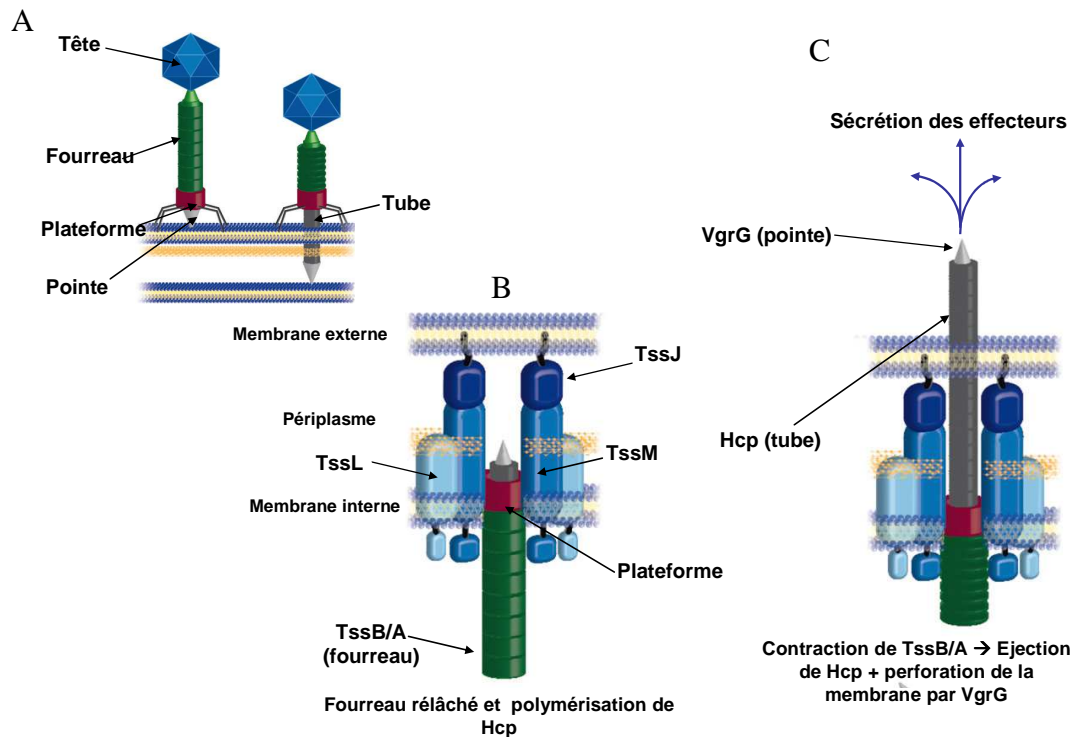


Figure 8 Représentation d'un bactériophage (A), du SST6-1 au repos (B) et « armé » (C) situé dans l'enveloppe de *P. aeruginosa* d'après (Kapitein and Mogk. 2013)

A l'origine, ce système était considéré comme ciblant les cellules eucaryotes similairement au SST3. La protéine VgrG de *V. cholerae* est dite « évoluée » car elle possède un domaine ACD (actin cross-linking domain) lui permettant de désorganiser le cytosquelette de la cellule eucaryote (Pukatzi *et al.*, 2007). VgrG d'*Aeromonas hydrophila* a une activité d'ADP-ribosylation de l'actine (Suarez *et al.*, 2010). Mais depuis la découverte d'effecteurs antibactériens (Hood *et al.*, 2010), le rôle du SST6 a été révisé pour devenir également un système impliqué dans les compétitions inter-bactériennes. Ainsi, quatre sortes de SST6 ont été recensés :

- ceux dirigés contre les cellules eucaryotes
- ceux impliqués dans la compétition inter-bactérienne
- ceux visant à la fois des cibles eucaryotes et procaryotes.
- ceux impliqués dans d'autres processus tel que la formation de biofilm (de Pace *et al.*, 2011)

Chez *P. aeruginosa*, trois SST6 ont été identifiés, appelés SST6-1, SST6-2 et SST6-3. Ils sont respectivement codés par des gènes regroupés sur trois loci nommés Hcp Secretion Island (HSI)-I, II et III (Mougous *et al.*, 2006).

Hcp1 a été détectée dans les expectorations (« sputum ») de patients atteints de mucoviscidose, indiquant que le locus HSI-I est exprimé lors des infections chroniques de *P. aeruginosa*. Ce système est impliqué dans la compétition inter-bactérienne. En effet, il a été prouvé que le SST6-1 délivrait trois toxines, Tse1 et Tse3 dans le périplasme et Tse2 dans le cytoplasme de la bactérie-cible (Hood *et al.*, 2010). Tse1 est une amidase peptidoglycane et Tse3 une muramidase ; elles dégradent toutes deux le peptidoglycane. Tse2 est une toxine cytoplasmique entraînant la quiescence de la bactérie-cible par un mécanisme inconnu à ce jour (Russell *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* ne peut pas « s'auto-intoxiquer » dans une population bactérienne puisqu'elle possède les anti-toxines Tsi1, Tsi2 et Tsi3 neutralisant respectivement les effets des toxines en s'associant à elles.

SST6-2 et SST6-3 jouent un rôle dans la virulence aiguë de la bactérie : une étude a montré une diminution significative de la virulence chez des mutants Δ HSI-II et Δ HSI-III comparés au sauvage à la fois dans un modèle d'infection d'*Arabidopsis thaliana* et un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris (Lesic *et al.*, 2009). Toutefois, la frontière cible eucaryote / procaryote n'est pas figée puisque récemment, de nouveaux effecteurs du HSI-II ont été révélés : il s'agit de phospholipases anti-bactériennes (Russell *et al.*, 2013). Le HSI-II semble donc lui aussi intervenir dans les compétitions entre bactéries.

La régulation de ces trois SST6 sera décrite plus loin.

III- Régulation de la virulence chez *P. aeruginosa*

L'activation de tous ses facteurs de virulence étant coûteuse en énergie, *P. aeruginosa* a développé de nombreux systèmes de régulation permettant l'expression adéquate et coordonnée de ces facteurs.

1- Le Quorum Sensing

Le quorum sensing (QS) est une forme de communication bactérienne basée sur l'estimation d'une densité bactérienne en fonction de la production de petites molécules diffusibles dans le milieu appelées auto-inducteurs (Stevens *et al.*, 2012). Une fois dépassé un certain seuil de concentration, ces molécules induisent la transcription de gènes cibles impliqués dans la production de protéases extracellulaires, de chélateurs de fer, de pompes à efflux, la formation de biofilm et la motilité. *P. aeruginosa* possède trois types de QS : les systèmes *las* et *rhl* basés sur des N-acyl homosérines lactones (AHL) et le système PQS libérant des alkyle quinolones (AQ) (Figure 9A).

Les QS de type AHL couvrent à eux deux la régulation d'environ 10% du génome (Schuster and Greenberg. 2006). Les gènes *lasI* et *rhlI* codent respectivement pour une N-3 oxododecanoyl homosérine lactone (3-oxo-C12-AHL) synthase et une N-butyrylhomosérine lactone (C4-AHL) synthase, responsables de la production de AHLs. Les AHLs ainsi produits vont se fixer sur leurs facteurs de transcription de la famille LuxR respectif, LasR et RhlR qui vont dimériser, se fixer à l'ADN et activer leurs gènes cibles (Juhas *et al.*, 2005, Schuster and Greenberg. 2006).

Le deuxième type de QS permet la synthèse de deux composés : le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) et son précurseur, 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) (Diggle *et al.*, 2007). Ils entraînent la fixation du facteur de transcription PqsR (ou MvfR) sur l'opéron *pqsABCDE* ce qui induit sa transcription et l'expression de tout le régulon PqsR (ou MvfR).

Les trois systèmes de QS sont interconnectés puisqu'il existe une hiérarchie parmi eux : au sommet *las* régule positivement *rhl* et *pqs* tandis que *rhl* régule négativement *pqs* (Latifi *et al.*, 1996, Pesci *et al.*, 1997). Lors d'une infection chronique, le gène *lasR* est l'un des premiers à subir des mutations (Hogardt *et al.*, 2007). Ainsi, un mutant *lasR* voit son QS fortement diminué et tous les régulons du QS réprimés (Figure 9). La proportion des isolats QS-déficients ou cheaters (mutants *lasR*) augmente durant la colonisation contrairement à ceux du système *rhl*. Les mutants *lasR* envahissent la population et deviennent prédominants puisqu'ils bénéficient des « biens publiques » sans les produire (Wilder *et al.*, 2009 ; Kohler *et al.*, 2010). Pourtant de nombreuses études ont fait état de souches impliquées dans des infections chroniques possédant un système *las* défectueux mais présentant l'expression de facteurs de virulence régulés par *rhl* et *pqs*, ce qui va à l'encontre de la hiérarchie établie. Un système de QS alternatif nouvellement découvert pourrait expliquer cette expression en absence de *las* (Dandekar and Greenberg. 2013). En milieu pauvre en phosphate (comme lors des infections chroniques), sous l'action de PhoB (régulateur de réponse impliqué dans la détection de taux de phosphate), AmbB, une peptide synthétase non ribosomale, parvient à activer les systèmes *rhl* et *pqs* indépendamment de *las* (Lee *et al* 2013). Elle interagit avec les protéines codées par l'opéron *ambBCDE*, ce qui contribue à la production d'un signal 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldéhyde (IQS). Ce signal IQS interagit avec un facteur inconnu pour activer RhlR et PqsR. Ainsi par cette voie parallèle, les régulons de *rhl* et *pqs* restent actifs (Figure 9B).

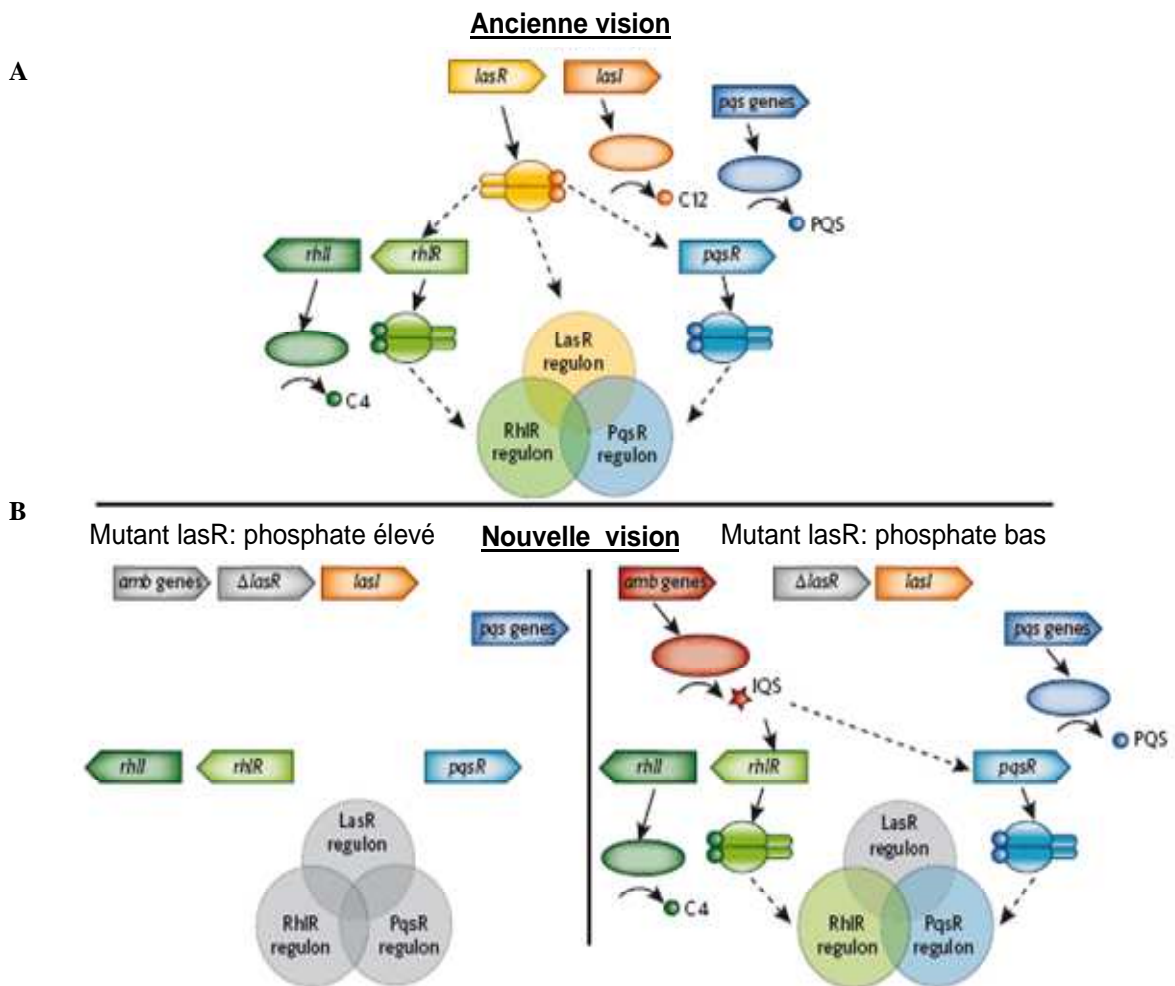


Figure 9 A / Représentation schématique de l'ancienne vision du fonctionnement du QS chez *P. aeruginosa*. Elle part d'un circuit constitué de programmes génétiques interconnectés comprenant trois facteurs de transcription majeurs : LasR, RhIR et PqsR. LasR se situe au sommet de ce circuit hiérarchique et, à une concentration adéquate de son signal C12, LasR active la transcription de nombreux gènes (régulon LasR). Ce régulon comprend aussi RhIR et PqsR, qui en réponse à leurs signaux respectifs, C4 et PQS, activent des régulons se superposant à celui de LasR. Ainsi, des mutants *lasR* ne peuvent plus activer les gènes appartenant aux trois régulons. B/ Représentation schématique de la nouvelle vision du fonctionnement du QS chez *P. aeruginosa* (d'après (Dandekar and Greenberg, 2013)). Cette nouvelle pensée fait intervenir les gènes *amb*, régulés par LasR et logiquement inactifs dans un mutant *lasR*, lorsque *P. aeruginosa* croît en conditions normales de laboratoire (conditions élevées en phosphate) : le schéma de gauche décrit cette situation. Le schéma de droite décrit la condition en limitation de phosphate : l'opéron *ambBCDE* est activé par un effecteur alternatif PhoB (pas représenté) et IQS est produit. IQS interagit avec un facteur inconnu pour activer la signalisation RhIR et PqsR. Cela court-circuite la dépendance à LasR. Dans cette figure, les systèmes actifs sont en couleur, ceux inactifs sont en gris. Les lignes pleines indiquent une synthèse et celles en pointillés une régulation positive. C4 : N-butyrylhomosérine lactone ; C12 : N-3 oxododecanoyl homosérine lactone ; PQS : 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone

Etant donné que la majorité des gènes contrôlés par le QS sont exprimés en phase stationnaire, il est logique de retrouver une modulation de 40% de ces gènes par RpoS (sigma facteur de la phase stationnaire) (Whiteley et al., 2000; Schuster et al., 2004).

2- Les systèmes de régulation à deux composants

Les systèmes à deux composants constituent un mécanisme de transduction et d'intégration du signal comprenant dans sa plus simple représentation un senseur histidine kinase et son régulateur de réponse associé, les deux partenaires communiquant par transfert de phosphate (Stock *et al.*, 2000). Ce système de communication permet à la bactérie d'être constamment informée sur les changements de son environnement: température, pH, composition ionique, présence de nutriments ou de substances toxiques. Elle peut ainsi adapter l'expression de ses gènes au mieux avec les conditions du moment.

Dans la majorité des cas, le senseur est membranaire et le régulateur cytoplasmique mais il existe des senseurs cytoplasmiques. Le senseur histidine kinase s'articule en différents domaines (Figure 10) : un domaine N-terminal senseur qui détecte un signal et un domaine C-terminal transmetteur cytoplasmique (Stock *et al.*, 2000). Les régulateurs de réponse possèdent un domaine receveur N-terminal conservé suivi d'un domaine effecteur C-terminal ; quand ce sont des facteurs de transcription, ce domaine effecteur possède un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN (Stock *et al.*, 2000). Après détection d'un signal, le senseur s'auto-phosphoryle sur le résidu histidine conservé de son domaine transmetteur (Gao and Stock. 2009). Puis, le groupement phosphate est transféré sur le résidu aspartate conservé du domaine receveur du régulateur de réponse, ce qui active le domaine associé.

En fonction de leur structuration, trois sortes de senseurs kinases sont retrouvés: les senseurs kinases classiques, non-orthodoxes et hybrides. Ces deux derniers possédant des domaines supplémentaires (Figure 10). Comparé au schéma classique, les histidines kinases hybrides possèdent un domaine C-terminal receveur (résidu aspartate) supplémentaire et interagissent avec des modules « Hpt » (histidine phosphotransfert) indépendants. Ce domaine Hpt est fusionné au domaine receveur chez les senseurs kinases de type non-orthodoxe.

Chez *P. aeruginosa*, 89 régulateurs de réponse et 55 senseurs kinases dites classiques ont été identifiés (Rodrigue *et al.*, 2000). Cette bactérie possède en plus 14 senseurs kinases hybrides et un atypique (RetS, voir plus loin), 5 senseurs kinases non-orthodoxes et trois modules Hpt indépendants : HptA, HptB et HptC. La présence de domaines supplémentaires sur les protéines augmente le nombre de transfert de phosphate, qui alterne toujours « His-Asp », ce qui permet plus de modulation du signal à travers ces phosphorelais et conduit à une régulation d'autant plus fine.

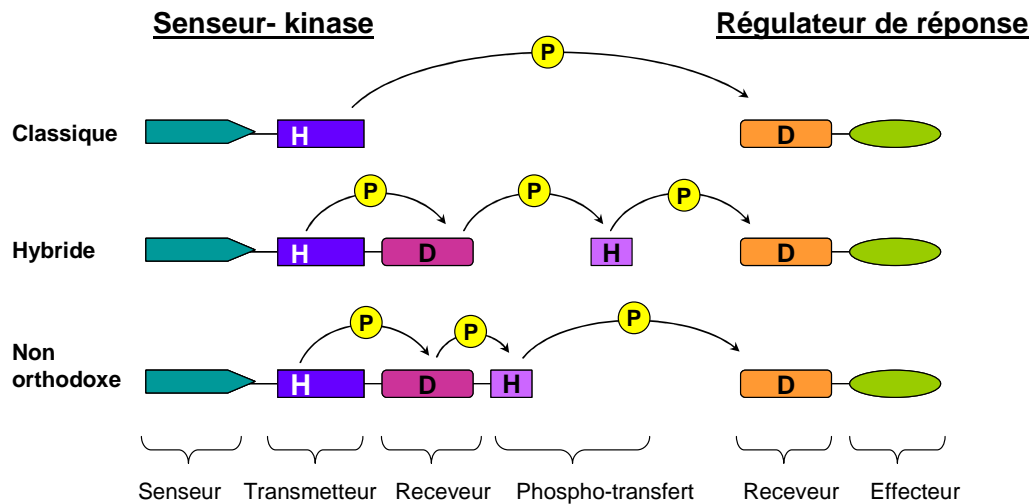


Figure 10 Représentation schématique des systèmes à deux composants de *P. aeruginosa* (d'après (Mikkelsen et al., 2011)). (H mauve) : module HptB

3- La voie AMPc / Vfr

Le messenger secondaire Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc) résulte de l'activité d'enzymes appelées adénylate-cyclases au sein de la bactérie. *P. aeruginosa* possède trois adénylates cyclases : CyaA, CyaB et l'effecteur du SST3 ExoY (inactive dans le cytoplasme en absence de son co-facteur eucaryote) (Stover *et al.*, 2000 ; Wolfgang *et al.*, 2003a ; Yahr *et al.*, 1998). Cependant, CyaB semble être l'enzyme produisant la majorité de l'AMPc intracellulaire. Ce messenger secondaire est un effecteur allostérique du facteur de transcription Vfr, qui fait partie de la famille des CRP (ou cAMP receptor proteins) et qui régule de nombreux facteurs de virulence aiguë (West *et al.*, 1994).

En effet, Vfr régule positivement environ 200 gènes importants lors d'infections aiguës comme ceux impliqués dans l'activation du SST3, SST2, les gènes *las* et *rhl* du QS, ainsi que les gènes jouant sur la formation des pili de type IV (West *et al.*, 1994 ; Beatson *et al.*, 2002 ; Wolfgang *et al.*, 2003a). Mais Vfr réprime les gènes impliqués dans la formation du flagelle comme *fleQ*, (Dasgupta *et al.*, 2002).

Un « vfr-binding-site » consensus a été trouvé; Vfr active directement l'expression des gènes *regA*, *toxA*, *lasR*, *pilM/ponA* (Kanack *et al.*, 2006)

L'homéostasie de l'AMPc est assurée par la phosphodiesterase-AMPc CpdA dont la synthèse est activée par Vfr lorsque le taux d'AMPc est trop élevé ; il y a un rétrocontrôle négatif (Fuchs *et al.*, 2010). Le niveau d'AMPc intracellulaire est affecté par les signaux

environnementaux, les conditions de culture faibles en calcium ou d'osmolarité forte (Wolfgang *et al.*, 2003a, Rietsch and Mekalanos. 2006).

4- di-GMPc

Le Di-Guanosine MonoPhosphate cyclique fait partie des molécules-signal essentielles à la bactérie. Sa présence est le résultat d'une balance entre deux activités enzymatiques : d'une part les diguanylate cyclases avec leur domaine GGDEF le synthétisent et d'autre part des phosphodiesterases possédant un domaine EAL ou HD-GYP le dégradent (Paul *et al.*, 2004 ; Tischler and Camilli. 2004; Christen *et al.*, 2005 ; Ryan *et al.*, 2006). La concentration intracellulaire en di-GMPc influe sur de nombreux aspects de la bactérie : formation du biofilm, motilité, sécrétion, cytotoxicité et adaptation à des stress environnementaux (voir partie transition vie planctonique/vie communautaire).

5- Petits ARNs régulateurs

P. aeruginosa doit être capable d'intégrer très rapidement les changements environnementaux et tout aussi rapidement de réguler ses gènes. La manière la plus rapide et la moins coûteuse en énergie est d'utiliser les petits ARNs. Très récemment, une étude de « RNA-seq » a permis d'identifier plus de 380 ARNs cis-antisens et 165 petits ARNs chez *P. aeruginosa* (Wurtzel *et al.*, 2012). Ce chiffre n'est pas surprenant pour une bactérie capable de s'adapter dans des environnements variés. Leur fonction, pour une grande majorité, n'est pas définie. Cependant, un certain nombre doit correspondre à des ARNs régulateurs. Dans les ARNs cis-antisens, il y en a qui sont de petite taille comme les petits ARNs (100 à 300 nt) mais la majorité a une taille allant de 700 à 3500 nt (Georg and Hess. 2011).

Les petits ARNs régulateurs ont une taille allant de 100 à 470 nt et sont chargés de la régulation au sein de la bactérie selon deux modes d'action. Ils peuvent intervenir par appariement de bases avec l'ARNm d'intérêt et sont alors appelés des « ARNs trans-antisens » (petit ARN provenant d'un autre endroit du chromosome et se fixant sur le site de fixation au ribosome) ou « cis-antisens » (petit ARN provenant du brin d'ADN anti-sens) en fonction de leur zone de fixation sur l'ARNm (Figure 11).

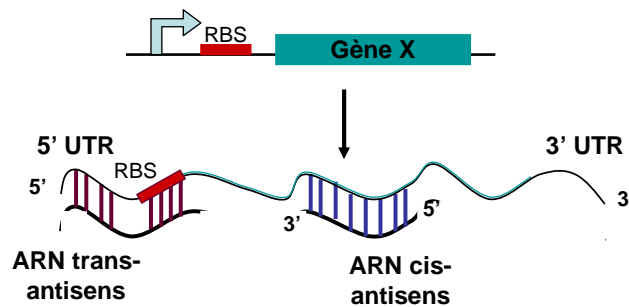


Figure 11 Contrôle de l'activité et de la stabilité de l'ARNm par les petits ARNs. d'après (Gripenland *et al.*, 2010)

Le deuxième mode d'action concerne de petits ARNs interagissant avec des protéines régulatrices se fixant à des ARNm à proximité ou sur leur site de fixation au ribosome (« Ribosome Binding Site », RBS).

a) Régulation par appariement de bases: exemple des ARNs anti-sens PrrF1 et anti-sens PrrF2

Le contrôle de la concentration intracellulaire en Fer est crucial pour la bactérie. En effet, le fer est un élément essentiel à sa survie mais son taux doit être maîtrisé. Ainsi la bactérie synthétise et sécrète des sidérophores (pyoverdine et pyochéline) quand le niveau de fer est bas et un régulateur du fer appelé Fur (ferric uptake regulator) quand son niveau est trop élevé.

Quand la concentration en fer est trop basse, il y a transcription de deux petits ARNs : PrrF1 (115 nt) et PrrF2 (113 nt) (Wilderman *et al.*, 2004). Ces derniers, une fois appariés à leurs ARNm cibles, empêchent la traduction de protéines régulant le taux en fer. En condition ferrique élevée, le régulateur Fur complexé au fer empêche la transcription des deux petits ARNs PrrF1 et PrrF2 ; la synthèse des protéines permettant le contrôle du niveau de fer (bactéioferritine) et de sa toxicité (superoxyde dismutase) est donc possible (Figure 12).

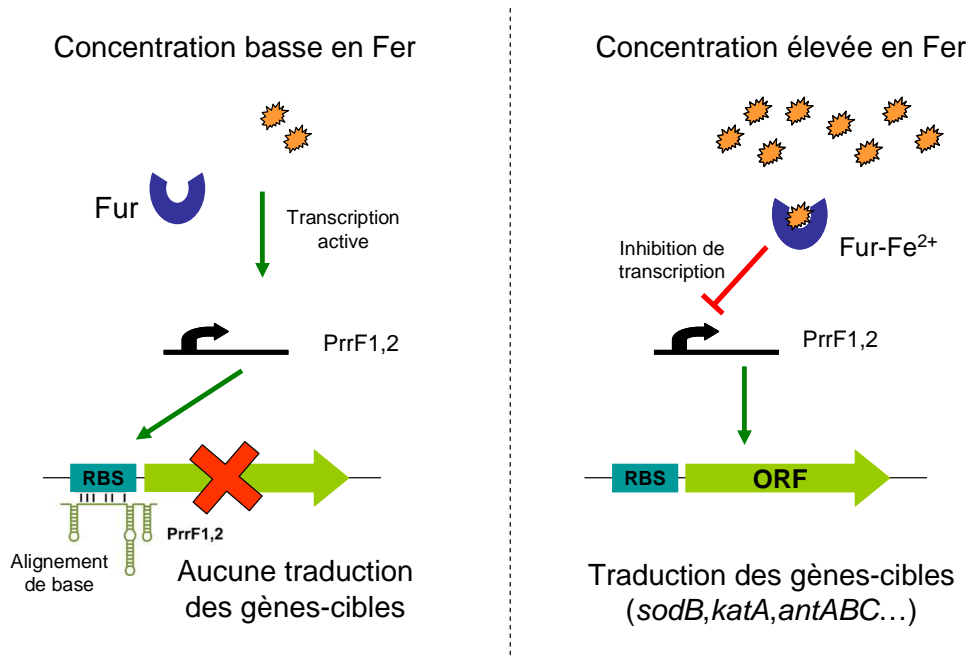


Figure 12 Représentation schématique de la régulation du taux de fer intracellulaire chez *P. aeruginosa* (d'après (Sonnleitner and Haas. 2011)).

b) Régulation de protéines se fixant aux ARNm : exemple de la protéine RsmA

Cette régulation fait intervenir deux acteurs : une protéine se fixant à des ARNm cibles et un petit ARN régulateur qui séquestre la protéine régulatrice.

Les petits ARNs régulateurs présentent des motifs de reconnaissance particuliers dans les boucles de leur structure secondaire : ANGGA (55%) et AGGA (45%) pour *P. aeruginosa* (préférentiellement AGGA (67%) plutôt que ANGGA (33%) pour *E. coli*) (Babitzke and Romeo. 2007). Ce sont des séquences identiques aux sites de fixation présents sur l'ARNm reconnu par la protéine régulatrice. C'est donc un leurre pour cette protéine qui va préférentiellement se fixer au petit ARN plutôt qu'à l'ARNm qu'elle régule et va se retrouver ainsi séquestrée.

Chez *P. aeruginosa*, une des protéines régulatrices est appelée RsmA (Regulator of Secondary Metabolism A). Elle fait partie de la famille des protéines de type CsrA se fixant à des ARNm cibles. CsrA (Carbon Storage Regulator A) est l'homologue de RsmA chez *E. coli* ; elles présentent entre elles 96 % d'identité (Heeb *et al.*, 2002 ; Valverde *et al.*, 2003) ; Kay *et al.*, 2005). Un mutant $\Delta csrA$ peut même être complété par une copie de *rsmA* apportée en *trans*. RsmA reconnaît la séquence spécifique « ^{A/U}CANGGANG^{U/A} » présente dans la région 5'UTR recouvrant ou adjacente au RBS de l'ARNm-cible et vient s'y fixer

(Lapouge *et al.*, 2008) (Figure 13A). Cette fixation a pour conséquence l'inaccessibilité du RBS pour le ribosome, son incapacité à être recruté, l'abandon de la traduction voire même une instabilité des ARNm (Schubert *et al.*, 2007).

RsmA régule négativement par cette voie les facteurs associés à une virulence chronique tels que T6SS-1, EPS, tandis qu'elle a une action positive sur le SST3, les pili de type IV (Brencic and Lory. 2009, Burrowes *et al.*, 2006). Le mécanisme de régulation positive par RsmA n'a pas été encore éclairci mais il pourrait s'agir d'un effet indirect, par inhibition d'un inhibiteur. Pour le SST3, il a été proposé un phénomène de protection de l'ARNm d'*exsA* contre une dégradation par la RNaseE (S. Lory, non publié).

Chez *P. aeruginosa*, les petits ARNs régulateurs RsmY (118 nt, sept motifs GGA) et RsmZ (127 nt, huit motifs GGA) sont chargés de titrer RsmA (Figure 13B). Des expériences de retard sur gel ont révélé la formation de 4 complexes entre RsmA et chacun des petits ARNs (Valverde *et al.*, 2004 ; Heeb *et al.*, 2006).

La régulation se complexifie davantage puisqu'une nouvelle protéine régulatrice vient d'être découverte chez *P. aeruginosa*: il s'agit de RsmN/RsmF (Morris *et al.*, 2013 ; Marden *et al.*, 2013). C'est une protéine se fixant à l'ARN dont la synthèse est sous le contrôle de RsmA. Il existe donc bien une hiérarchie dans la régulation post-transcriptionnelle chez *P. aeruginosa* (Marden *et al.*, 2013). RsmN/F et RsmA présentent 34% d'homologie entre elles et ont une structure différente : de plus elles possèdent des régulons distincts mais des cibles communes.

Chez *Pseudomonas fluorescens*, deux protéines se fixant à l'ARNm, RsmA et son homologue RsmE, sont titrées par trois petits ARNs RsmX, RsmY et RsmZ (Heeb *et al.*, 2002 ; Valverde *et al.*, 2003 ; Kay *et al.*, 2005). Ces deux protéines répriment les gènes de métabolites secondaires comme ceux responsables de la production d'antifongiques.

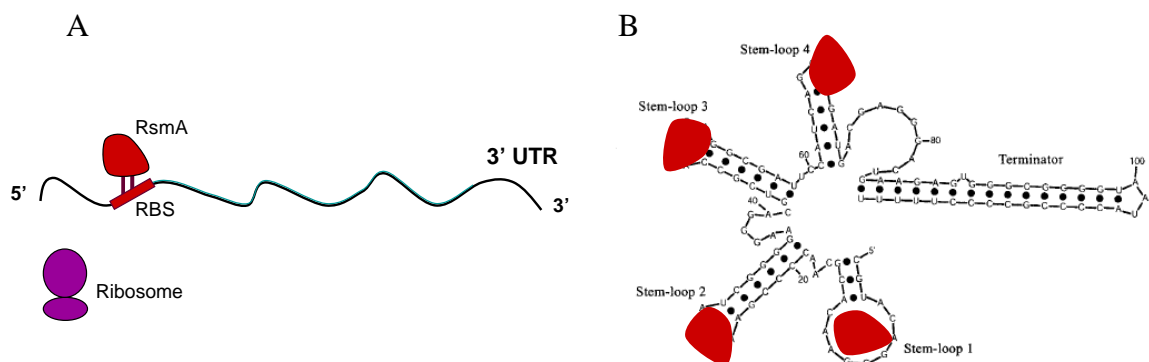


Figure 13 RsmA et RsmY : A/ En se fixant sur le RBS (site de fixation du ribosome), RsmA empêche la traduction de l'ARNm. B/ Structure de RsmZ avec ses 4 boucles de fixation à RsmA (Heeb *et al.*, 2006).

IV- Transition vie planctonique / vie communautaire

Comme je l'ai déjà mentionné, *P. aeruginosa* possède deux modes de vie distincts, associés à l'expression de facteurs de virulence donnés.

Dans le mode de vie planctonique, la bactérie présente plutôt un phénotype virulent exprimant les facteurs responsables d'infections aiguës. Avec un SST2 et un SST3 actifs, la bactérie libère des enzymes dégradatives et des toxines dans le milieu extérieur ainsi que dans la cellule cible (pyocyanine, élastase, phospholipase, ExoS, ExoT, ...).

Par contre, en conditions moins favorables ou de stress, comme celles trouvées dans les poumons d'un patient CF, la bactérie doit se mettre « en veille » c'est-à-dire « effacer » tout ce qui pourrait révéler sa présence au système immunitaire de l'hôte : il y a passage au mode de vie communautaire en biofilm. Les bactéries perdent leur flagelle, se fixent à un support, s'agglutinent et surproduisent des exopolysaccharides qui vont former une gangue protectrice. De plus, comme cet environnement comporte plusieurs espèces bactériennes, *P. aeruginosa* va activer son SST6-1 impliqué dans la compétition interbactérienne (Hood *et al.*, 2010).

Ce changement drastique de comportement est rendu possible grâce à une fine régulation des facteurs de virulence de la bactérie. Elle s'exerce à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Pour ce faire, des signaux environnementaux (encore inconnus à ce jour) doivent être détectés, transduits et intégrés dans la bactérie. Les voies clé de cette intégration impliquent :

- des systèmes à deux-composants dont un pivot, GacS/GacA, influencé par deux senseurs membranaires RetS et LadS, et jouant un rôle-clé dans la régulation post-transcriptionnelle (Figure 14).
- les messagers secondaires, di-GMPc et AMPc (avec la voie AMPc/Vfr), contribuent également au relais des signaux. Leur assimilation se traduit par l'expression ciblée de facteurs appropriés (Figure 14).

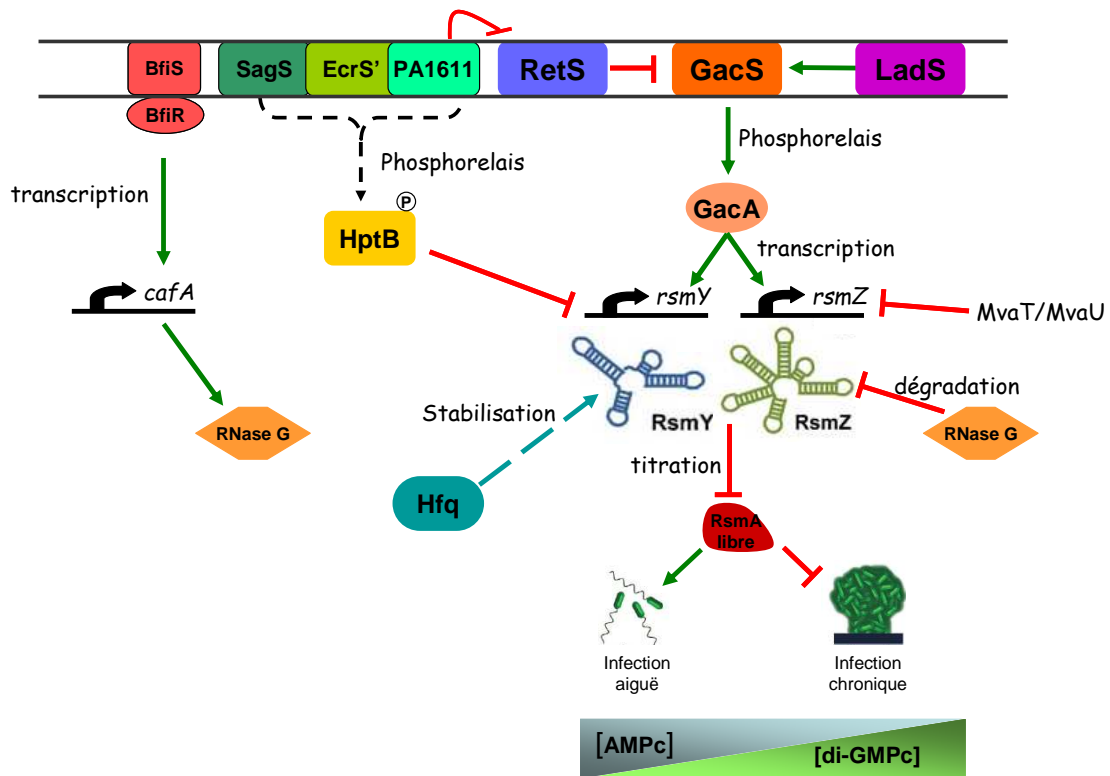


Figure 14 : Schéma de la régulation exercée sur les petits ARNs régulateurs au cours de la transition infection aiguë/infection chronique (Schéma récapitulatif d'après (Bordi *et al.*, 2010, Petrova and Sauer, 2011, Hsu *et al.*, 2008, Bhuwan *et al.*, 2012, Kong *et al.*, 2013)

1- La voie Gac-Rsm

Les systèmes à deux-composants de la famille BarA/UvrY (chez *E. coli*) sont retrouvés dans de nombreuses γ -protéobactéries (Lapouge *et al.*, 2008). Les noms de ces différents éléments varient en fonction de la bactérie étudiée mais leur rôle est toujours d'assurer la transcription de un à cinq petits ARNs régulateurs chargés de titrer une ou deux protéine(s) conservée(s) de la famille CsrA se fixant à des ARNs messagers cibles. C'est le nombre de cibles et donc la portée de la régulation qui varient entre les différentes bactéries. Par exemple, *P. fluorescens*, qui colonise les racines de plantes, possède ce système à deux composants qui est responsable de la production de molécules antifongiques servant de protection à la plante-hôte ; on parle ici de bio-contrôle exercé par la bactérie (Laville *et al.*, 1998).

Chez *P. aeruginosa*, le système à deux-composants GacS/GacA est l'élément clé de la transition infection aiguë/infection chronique, contrôlant l'expression d'environ 400 gènes

(Goodman *et al.*, 2004). GacS (Global Activation of antibiotics and Cyanoside Synthesis) est un senseur kinase non-orthodoxe inséré dans la membrane interne de la bactérie. Après réception d'un signal inconnu, GacS s'auto-phosphoryle sur le résidu His-294 du domaine transmetteur, le phosphate est transféré à l'Asp-717 de son domaine receveur puis à l'His-863 de son domaine Hpt. Enfin, le phosphate est transféré sur l'Asp-54 de GacA, son régulateur de réponse associé (Zuber *et al.*, 2003). GacA est un facteur de transcription possédant donc un domaine receveur et un domaine de liaison à l'ADN (Figure 15).

Une fois activé par phosphorylation, GacA est responsable de la transcription de deux petits ARNs régulateurs : RsmY et RsmZ. Ces deux ARNs régulateurs séquestrent la protéine RsmA. Cette protéine empêche aussi la traduction des ARNm du SST6-1, les exopolysaccharides Pel et Psl (Irie *et al.*, 2010 ; Brenic and Lory. 2009), les sidérophores (Moscoso *et al.*, 2011 ; Frangipani *et al.*, 2013). De plus, elle favorise indirectement la motilité et le SST3.

Pour le moment, la nature des signaux détectés par GacS chez *P. aeruginosa* est inconnue. Par contre, son homologue chez *E. coli*, BarA, réagit positivement au formate et à l'acétate (Chavez *et al.*, 2010). Chez *P. fluorescens*, l'activation se fait par des molécules produites par la bactérie quand elle atteint une forte densité de population (Heeb *et al.*, 2002).

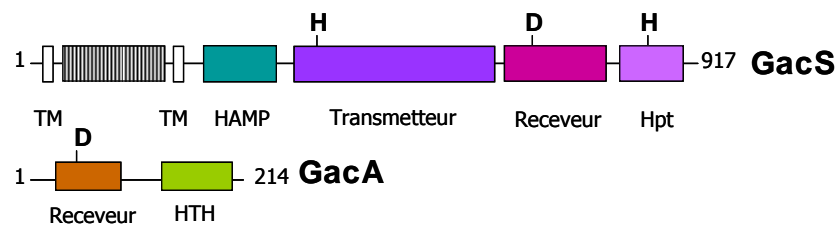


Figure 15 Représentation schématique des protéines GacS-GacA de *P. aeruginosa*. TM : transmembranaire, HAMP : domaine linker, HTH : hélice-tour-hélice

2- RetS (Regulator of Exopolysaccharides and Type Three Secretion)

La protéine RetS (ou RtsM) a été découverte par deux équipes au même moment. La première effectuait le criblage d'une banque de mutants et a observé que la mutation de son gène entraînait un phénotype de biofilm particulier (Goodman *et al.*, 2004); la deuxième équipe a constaté qu'un mutant $\Delta rtsM$ avait un défaut dans la production et la sécrétion d'effecteurs du SST3 (Laskowski *et al.*, 2004).

RetS est un régulateur global puisqu'il contrôle de manière indirecte l'expression de près de 400 gènes (Goodman *et al.*, 2004). Ce senseur de 946 acides aminés (aa) a été montré

comme régulant positivement le SST3 et négativement la production d'exopolysaccharides (Pel, Psl). Un mutant $\Delta retS$ est ainsi non cytotoxique, s'agrandit énormément et produit plus de biofilm (Goodman *et al.*, 2004). Ce mutant est clairement orienté dans un mode d'expression de facteurs de virulence contribuant à l'infection chronique.

RetS est un senseur kinase hybride particulier présentant un domaine receveur 7-TMR-DISMED2 (Diverse Intracellular Signalling Module Extracellular 2) constitué d'un large domaine périplasmique, sept domaines transmembranaires, un domaine transmetteur et deux domaines receveur (Figure 16).

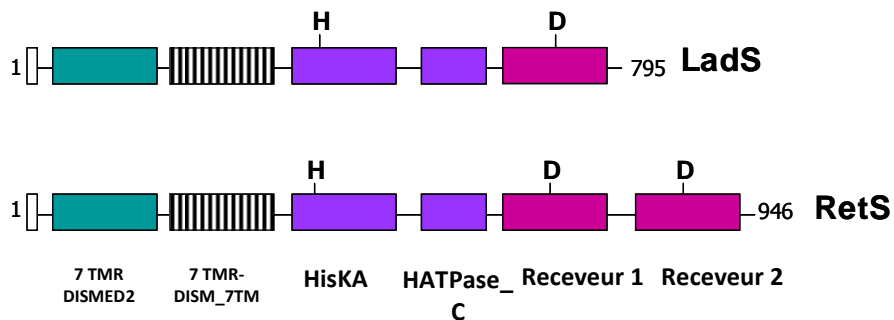


Figure 16 Représentation schématique des domaines des histidines kinases LadS et RetS de *P. aeruginosa* d'après (Ventre *et al.*, 2006). 7 TMR-DISMED2 : domaine périplasmique, 7 TMR-DISM_7TM : 7 domaines transmembranaires, HisKA + HATPase_c : domaine transmetteur.

La structure du domaine périplasmique de RetS a été résolue par deux équipes. Les deux études ont montré que ce domaine présentait des similarités avec les Carbohydrates Binding Domains (CBM) (Vincent *et al.*, 2010). Mais une des deux équipes a observé un seul domaine de repliement (un monomère (Jing *et al.*, 2010)) quand l'autre a vu une formation en « tétramère » (Vincent *et al.*, 2010). Le ligand pourrait être un dérivé d'hydrate de carbone (sucre) venant soit de la cellule cible, soit de la bactérie elle-même.

Pour le moment, il n'y a toujours pas un consensus sur le besoin ou non de RetS d'être phosphorylé pour être activé. En effet, l'expression du SST3 peut être restaurée dans un mutant $\Delta retS$ au moyen d'un gène *retS* ne possédant pas la séquence nucléotidique codant pour l'histidine conservée du domaine transmetteur. Mais, alors que le site phospho-accepteur du premier domaine receveur semble inhiber l'activité de RetS, celui du deuxième domaine est essentiel à l'activité du senseur (Laskowski and Kazmierczak. 2006). C'est certainement par ce deuxième domaine qu'HptB (module de transfert de phosphate indépendant) contrôlerait positivement RetS, capable de participer à des phosphorelais (Hsu *et al.*, 2008).

Paradoxalement, dans son étude de 2009, l'équipe de S. Lory a pu montrer *in vitro*, et surtout *in vivo* par pull-down, une interaction directe des domaines cytoplasmiques de RetS et GacS (Goodman *et al.*, 2009). Le mode de fonctionnement de ce senseur est très inhabituel puisqu'en formant un hétérodimère avec GacS, RetS empêche son autophosphorylation et donc la transcription des petits ARNs, sans besoin d'être phosphorylé. RsmA est donc libre dans le milieu et peut empêcher l'expression de facteurs de virulence chronique en se fixant sur des séquences GGA recouvrant la zone de fixation au ribosome (Lapouge *et al.*, 2007).

Très récemment, des études ont montré que le senseur kinase hybride PA1611 pourrait se lier à RetS favorisant ainsi l'autophosphorylation de GacS et l'activation du mode « biofilm » (Bhuwan *et al.*, 2012 ; Kong *et al.*, 2013).

3- LadS (Lost of Adherence Sensor)

Ce senseur a été nommé LadS car un mutant $\Delta ladS$ est extrêmement cytotoxique, ne produit plus de biofilm, n'adhère plus aux cellules eucaryotes et est donc complètement « lisse » (Ventre *et al.*, 2006). A l'inverse de RetS, LadS (795 aa) est un senseur kinase hybride qui favorise la phosphorylation de GacS à travers un phospho-relais (Roux *et al.*, soumis) conduisant à la transcription de RsmY et RsmZ et à la traduction des ARNm cibles de RsmA. Une récente étude vient de montrer que le domaine Hpt isolé du senseur kinase non-orthodoxe GacS pouvait être suffisant pour son interaction avec LadS. Par cette interaction, la voie LadS était de nouveau fonctionnelle dans un mutant $\Delta gacS$ (Roux *et al.*, soumis) (Figure 16). LadS a donc un effet contraire à celui de RetS et leur régulon se superpose : il partage pour moitié les mêmes gènes cibles que RetS (Ventre *et al.*, 2006).

Tout comme RetS et GacS, les signaux détectés par LadS sont encore inconnus. Cette protéine possède tout comme RetS un domaine périplasmique senseur 7 TMR-DISMED2, mais les deux domaines ne partagent que 35% d'identité de séquence, ce qui signifierait que leur ligand serait apparenté mais pas identique.

4- La voie HptB

En plus des régulateurs globaux RetS et LadS, *P. aeruginosa* possède d'autres senseurs membranaires récemment découverts exerçant une régulation partielle sur RsmY et RsmZ : PA1611, PA1976 et PA2824. En effet, ils sont tous capables d'induire la voie HptB nouvellement découverte qui régule négativement la transcription de RsmY et intervient lors

de l'établissement du biofilm (Bordi *et al.*, 2010 ; Hsu *et al.*, 2008) (Figure 17). Le senseur EcrS' (PA1976) (Mern *et al.*, 2010) est impliqué dans l'oxydation de l'éthanol, tandis que SagS (PA2824) joue un rôle lors de l'attachement du biofilm.

HptB (PA3345) est un module de transfert de phosphate indépendant qui, lorsqu'il est phosphorylé, active le régulateur de réponse PA3346. Ce-dernier comporte un domaine receveur et un domaine phosphatase et régule positivement les gènes associés au flagelle (Bhuwan *et al.*, 2012). Deux cas de figure sont possibles :

-Lorsque HptB n'est pas phosphorylé, il inhibe PA3346 qui ne peut plus déphosphoryler PA3347, un anti-anti-facteur sigma. Le facteur sigma putatif est donc toujours séquestré par son anti-facteur.

-Lorsque HptB est phosphorylé, le phosphate est transféré à PA3346, ce qui augmente son activité phosphatase. Elle est alors libre de déphosphoryler l'anti-anti facteur σ putatif, PA3347. PA3347 déphosphorylé peut se lier à un anti-facteur sigma putatif, permettant la libération d'un facteur σ non caractérisé. Ce facteur σ pourrait avoir un effet positif sur l'expression de RsmY. En surexprimant RsmY (voie PA3346-47), il y a augmentation de la production des exopolysaccharides Pel et suppression du SST3 mais pas d'activation du SST6 (Bordi *et al.*, 2010).

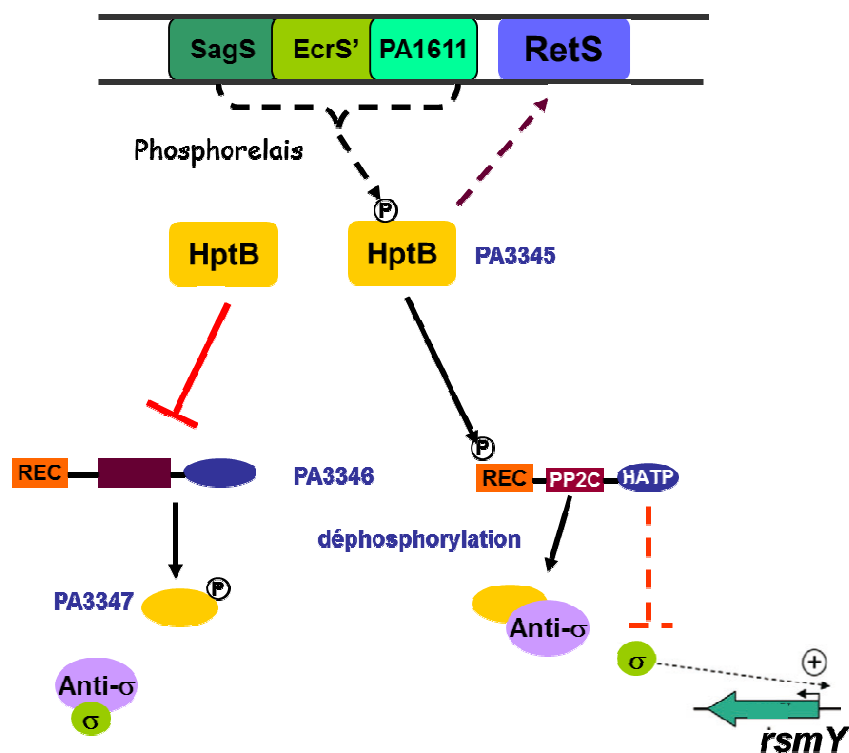


Figure 17 La voie HptB , REC : domaine receveur, PP2C : domaine phosphatase, HATP : domaine histidine kinase/ ATPase(d'après (Bhuwan et al., 2012),(Bordi et al., 2010),(Hsu et al., 2008)

5- Les messagers secondaires di-GMPc/AMPC

Le messenger secondaire di-GMPc est lui aussi fortement impliqué dans la transition infection chronique / aiguë. La première observation a été faite sur un mutant $\Delta retS$: il présentait des niveaux de di-GMPc plus élevés comparés à la souche sauvage (Moscoso *et al.*, 2011). Cette différence perdurait malgré une mutation supplémentaire au niveau du gène *pel*. Parmi les 17 diguanylate cyclases possédant un domaine GGDEF de *P. aeruginosa*, il a été prouvé que la diguanylate cyclase WspR est responsable de l'augmentation de di-GMPc notée dans une souche $\Delta retS$. De plus, il a été possible de réaliser artificiellement la transition SST3 / SST6-1 uniquement en augmentant la quantité de di-GMPc dans un mutant Δpel sans une mutation $\Delta retS$ au préalable (Moscoso *et al.*, 2011). Logiquement, l'activité d'une phosphodiesterase entraîne une diminution du niveau de diGMPc et inverse le phénotype entraînant une activation du SST3 au détriment du SST6-1. Toutefois cette transition reste toujours dépendante des petits ARNs RsmY et RsmZ et le lien diGMPc/RsmYZ n'est pas encore connu (Moscoso *et al.*, 2011).

L'AMPC est un régulateur des facteurs de virulence aiguë (Wolfgang *et al.*, 2003a). Or, de forts niveaux d'AMPC et de diGMPc n'ont pu être mesurés en même temps à ce jour dans *P. aeruginosa*. Ces deux messagers secondaires sont issus du même précurseur (le IMP) et le mécanisme impliqué dans la balance de leur synthèse n'est pas encore cerné (Figure 18). Tim Tolken-Nielsen a montré durant le congrès « Pseudomonas 2013 » que la surexpression de l'adénylate cyclase CyaB, qui conduit à une forte concentration d'AMPC, s'accompagne d'une faible production de diGMPc. A l'opposé, de forts niveaux de diGMPc, résultant d'une surproduction de diguanylate cyclase, conduisent à une diminution d'AMPC et à un phénotype hyperbiofilm. Ces deux messagers secondaires semblent donc indispensables lors de la transition SST3/SST6-1.

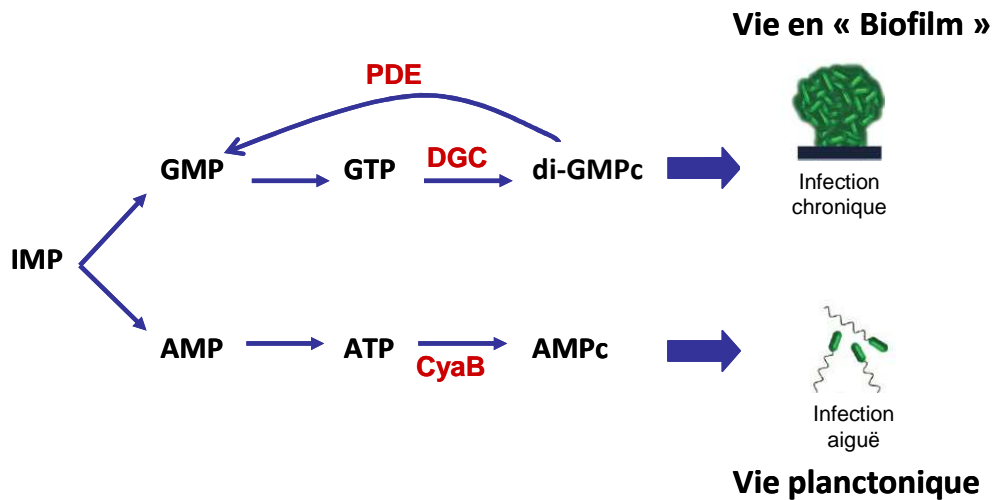


Figure 18 La voie de synthèse AMPc/di-GMPc. IMP : inosine mono-phosphate, GMP : Guanosine mono-phosphate, GTP : Guanosine tri-phosphate, AMP : Adénosine mono-phosphate DGC : diguanylate cyclase, CyaB : Adénylate cyclase, PDE : phosphodiesterase

6- Les régulations additionnelles

Le réseau se complexifie davantage puisque d'autres systèmes à deux composants influent également sur les petits ARNs régulateurs comme le système BfiS-BfiR impliqué dans l'établissement du biofilm. En plus de son rôle sur HptB, SagS est capable de phosphoryler directement l'histidine kinase BfiS ce qui a pour effet d'activer le système conduisant à la production de RNase G qui dégrade le petit ARN RsmZ. Il a été montré que la diminution de ce petit ARN est essentielle à l'établissement du biofilm car un mutant $\Delta sagS$ est incapable de former un biofilm structuré (Petrova and Sauer. 2011). Une diminution de la concentration en ions Mg^{2+} , détectée par le système PhoP-PhoQ, induit également le SST6-1 (Mulcahy and Lewenza. 2011).

Les petits ARNs RsmY et RsmZ sont soumis à d'autres régulations. Par exemple, les protéines MvaT-MvaU, membres de la famille des protéines H-NS (histone-like nucleoid structuring protein), exercent une répression transcriptionnelle sur RsmZ (Brencic *et al.*, 2009). Alors que la RNaseG dégrade RsmZ, la protéine Hfq (chaperonne d'ARNs) est elle chargée de stabiliser RsmY et de prévenir sa dégradation (Sorger-Domenigg *et al.*, 2007).

Tableau 1 Différentes voie de régulation touchant les petits ARNs RsmZ et RsmY

Fonction	Petit(s)ARN(s) régulé(s)	Effet sur le petit ARN	Gènes impliqués	Référence
Etablissement du biofilm	RsmZ	Dégradation (RNase G)	<i>bfiS-bfiR-cafA</i>	(Petrova and Sauer. 2011)
Détection des Mg ²⁺	RsmZ	Régulation négative	<i>phoP-phoQ</i>	(Mulcahy and Lewenza. 2011)
Détection de l'hypoxie	RsmY/Z	Régulation négative	<i>anr-narL</i>	(O'Callaghan <i>et al.</i> , 2011)
Modulation du signal	RsmY	Régulation négative	<i>hptB</i>	(Bordi <i>et al.</i> , 2010)Hsu <i>et al.</i> , 2008
Stabilisation de transcription	RsmZ	Répression transcriptionnelle	<i>mvaT-mvaU</i>	(Brenic <i>et al.</i> , 2009)
Protection contre la dégradation	RsmY	Régulation positive	<i>hfq</i>	(Sorger-Domenigg <i>et al.</i> , 2007)

Tous ces senseurs supplémentaires permettent à la bactérie d'ajuster au mieux l'expression de ses facteurs de virulence lors de la transition infection aiguë-chronique. Donc, la bactérie dispose de différents niveaux d'intervention pour contrôler l'activation/la répression de gènes.

Ainsi, *P. aeruginosa* a déployé tout un éventail de senseurs, de messagers secondaires, de petits ARNs dans le but de détecter le moindre changement environnemental, de l'intégrer le plus rapidement possible et d'ajuster ses facteurs de virulence au mieux, ce qui fait d'elle un pathogène doté d'une faculté d'adaptation remarquable.

V- La Régulation du SST3 et des SST6

Comme décrit précédemment, le SST3 et les SST6 sont des nanomachineries moléculaires composées au moins d'une vingtaine de protéines et essentielles à la bactérie pour sa virulence. La synthèse de tels appareils de sécrétion est très coûteuse en énergie et ne doit pas être mise en place de manière arbitraire ou à des moments préjudiciables à la bactérie. Ainsi, *P. aeruginosa* possède de nombreux réseaux de régulation interconnectée pour une expression judicieuse de ces systèmes.

1- La régulation du SST3

Chez *P. aeruginosa*, le SST3 est constitué d'un ensemble de 30 protéines, codées par les gènes de la machinerie de sécrétion et de translocation qui sont organisés en plusieurs opérons regroupés dans un même locus. Les gènes codant pour les effecteurs et leurs chaperonnes sont quant à eux dispersés à travers le génome (Figure 19).

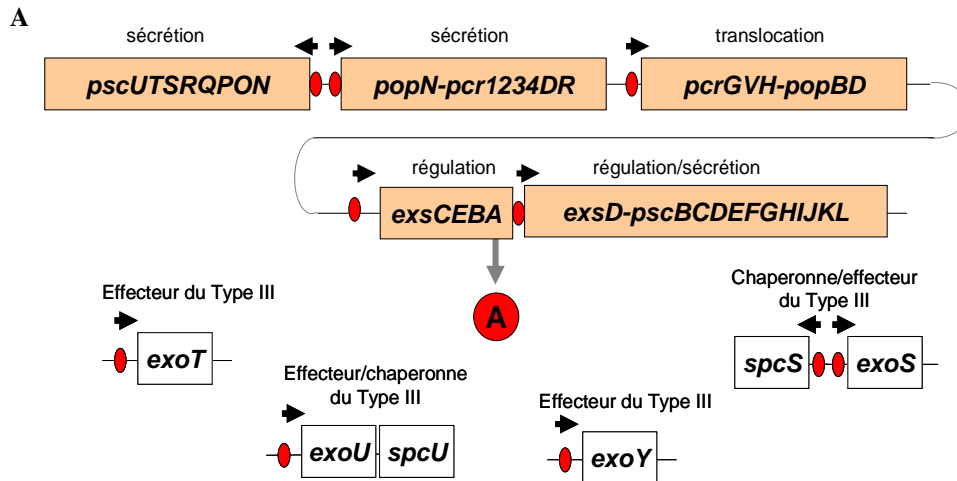


Figure 19 Représentation schématique de l'organisation génétique du SST3 d'après (Yahr and Wolfgang. 2006). Les gènes requis pour la sécrétion, la translocation et la régulation du SST3 sont contigus sur le chromosome répartis en cinq opérons (rectangles orange clair). Les gènes codant pour les effecteurs et leurs chaperonnes associés (rectangles blancs) sont situés ailleurs sur le chromosome. Les promoteurs ExsA-dépendants (flèches noires) et les sites de fixation d'ExsA (ovales rouges) sont situés en amont des gènes concernés.

Du point de vue transcriptionnel, l'expression des gènes du SST3 dépend de la présence d'un facteur de transcription, ExsA qui appartient à la famille AraC/XylS. ExsA active sa propre synthèse en contrôlant l'opéron des gènes régulateurs *exsCEBA* (Brutinel and Yahr. 2008).

Le SST3 est un système de sécrétion contact-dépendant puisque la proximité de la bactérie avec sa cellule cible induit l'expression du SST3 (Hayes *et al.*, 2010). Plusieurs voies permettent la transcription des gènes du SST3 dont deux principales, activées par le contact cellulaire : ce sont la cascade de couplage sécrétion-synthèse et la signalisation AMPc/Vfr dépendante (Figure 20).

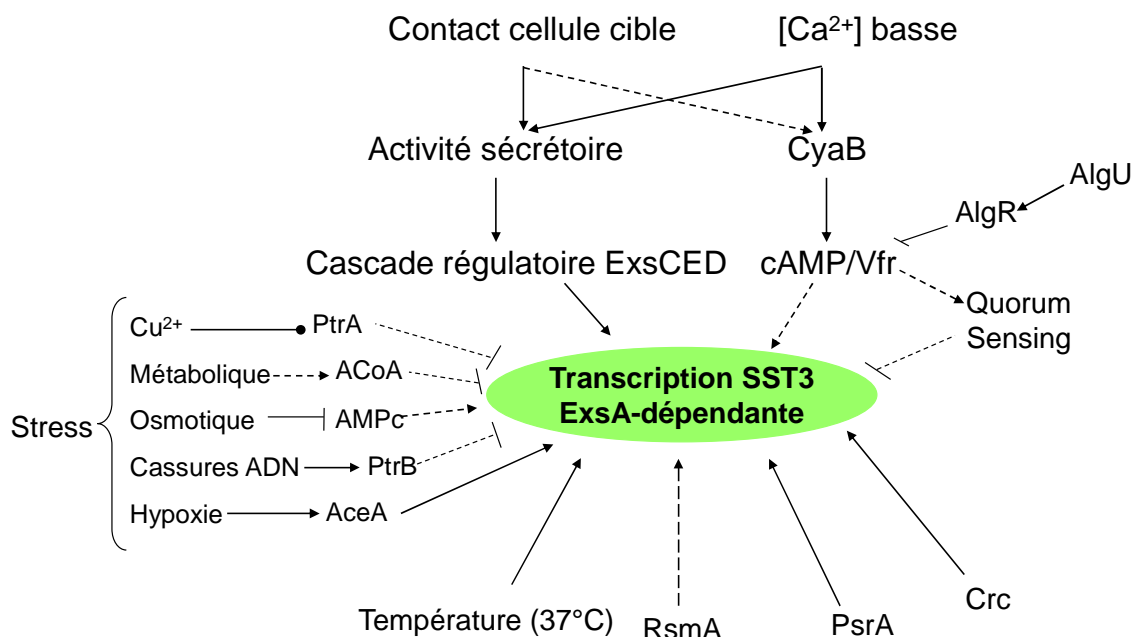


Figure 20 Schéma récapitulatif de la régulation du SST3 modifié d'après (Yahr and Wolfgang, 2006). Les lignes pleines représentent des liens de régulation prouvés expérimentalement. Les lignes en pointillés indiquent d'hypothétiques connexions de voie de régulation.

a) Spécifique : la cascade de couplage sécrétion-synthèse

Les gènes du SST3 vont être exprimés à la suite d'une cascade de régulation impliquant ExsA mais aussi trois autres protéines ExsD, ExsC et ExsE (Figure 21) (Brutinel and Yahr, 2008).

Cette cascade est basée sur un jeu d'affinité et d'échanges de partenaires. En effet, ExsD et ExsC ont tous deux, deux partenaires potentiels. ExsD en séquestrant ExsA empêche sa fixation à l'ADN et inhibe l'expression du SST3 : il joue le rôle d'anti-activateur (Thibault *et al.*, 2009). ExsC quand à lui agit comme un anti-anti-activateur et forme un complexe de stoechiométrie 2:2 avec ExsD (Dasgupta *et al.*, 2004 ; Lykken *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2007). ExsC forme également un complexe 2:1 avec le régulateur sécrété ExsE (Zheng *et al.*, 2007). Pour finir, ExsE empêche l'association ExsC-ExsD (Rietsch *et al.*, 2005 ; Urbanowski *et al.*, 2007). Les affinités de fixation sont par ordre de plus grande affinité ExsC-ExsE (Kd = 1 nM) > ExsC-ExsD (Kd = 18 nM) > ExsD-ExsA (Zheng *et al.*, 2007). Le Kd du complexe ExsD-ExsA n'a pour l'instant pas été déterminé. Contrairement au complexe formé par ExsD-ExsC, celui formé avec ExsA et ExsD présente une stoechiométrie 1:1 (Thibault *et al.*, 2009) révélant le caractère dynamique d'ExsD. Dans des conditions favorables à l'activation du SST3 (faible concentration calcique), ExsE est sécrétée et ExsD se retrouvant seul va se lier à

ExsC ce qui libère ExsA qui peut alors activer la transcription des gènes du SST3 (Figure 21). La transcription des gènes du SST3 est intimement liée à l'activité sécrétoire du SST3 : il n'y aura une forte transcription des gènes qu'à partir du moment où la machinerie de sécrétion est fonctionnelle c'est-à-dire qu'ExsE est transloquée dans la cellule-cible (Dasgupta *et al.*, 2004).

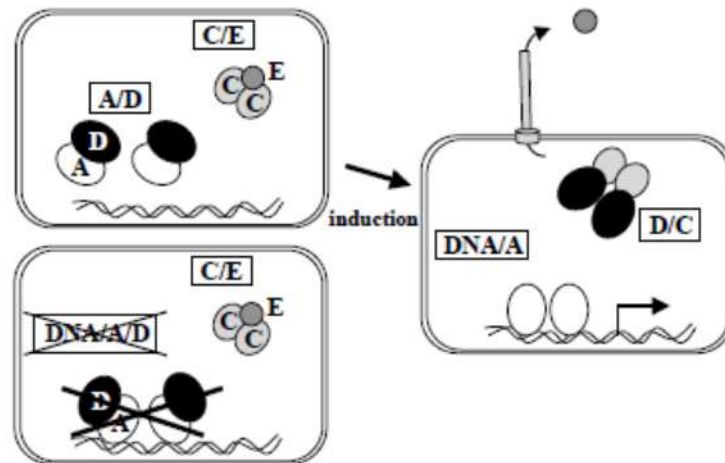


Figure 21 Modèle de la cascade de couplage sécrétion/synthèse

Cependant, il existe aussi une voie d'activation du SST3 ne passant par ExsC. En effet, des mutants *exsC* n'ont montré aucune cytotoxicité contre des érythrocytes de mouton, des cellules d'insectes et des amibes. Par contre, ils ont révélé une cytotoxicité SST3-dépendante retardée, mais de l'ordre de celle de la souche sauvage, sur des lignées de cellules épithéliales et de macrophages de mammifères (Dasgupta *et al.*, 2006). Ainsi, la voie dépendante de ExsC serait importante pour une réponse rapide à tous les types cellulaires testés tandis que la voie indépendante représenterait une adaptation spécifique lors d'infection de mammifères (Dasgupta *et al.*, 2006).

b) La voie de signalisation AMPc/Vfr –dépendante (CVS pathway)

Une manière de reproduire l'effet du « contact » en laboratoire sans la présence de cellules est la croissance de *P. aeruginosa* dans un milieu pauvre en calcium (Ca^{2+}) ou en présence de sérum (Frank. 1997 ; Vallis *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2005 ; Urbanowski *et al.*, 2007). Ce mécanisme d'activation passe par la modulation du messager secondaire AMPc car des études ont montré que ces deux stimuli entraînaient une augmentation de l'AMPc intracellulaire, l'effecteur allostérique de Vfr (Wolfgang *et al.*, 2003a ; Rietsch and

Mekalanos. 2006). A ce jour, le mécanisme par lequel Vfr/AMPC contrôle l'expression du SST3 est inconnu. Bien que de nombreuses études sur la régulation du SST3 aient porté sur son induction par de faibles concentrations en calcium, sa signification physiologique n'a pas encore été établie. De manière intéressante, des niveaux d'AMPC intracellulaires élevés sont constatés après croissance de la bactérie dans un milieu contenant 200 mM de NaCl, ce qui n'est pas observé en présence de 5 mM de NaCl. L'osmolarité affecte également la synthèse du SST3, l'expression d'*exoS* augmentant lorsque la concentration de NaCl passe de 5 à 200 mM. Cela suggère un lien possible entre stress osmotique, cascade de signalisation AMPC et régulation du SST3 (Rietsch and Mekalanos. 2006)

Il existe une régulation inversée entre le SST3 et les facteurs impliqués dans la virulence dite chronique comme les alginates par exemple. Ainsi, la plupart des mutants *mucA*, comme une partie des isolats CF, sont non-cytotoxiques et mucoïdes. L'absence de MucA entraîne la libération du facteur sigma AlgU, ce qui active l'expression du gène *algR* et la synthèse des alginates. Mais AlgR va inhiber l'expression de *vfr*, ce qui a pour conséquence une diminution de synthèse des facteurs de virulence contrôlés positivement par Vfr, dont le SST3 (Wu *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2010).

c) Voies de régulation interconnectées autour du SST3

Concernant la mobilité, le SST3 et les pili de type IV sont co-régulés puisque ces pili constituent la première adhésine permettant le contact avec la cellule-hôte dont dépend l'expression du SST3 (Sundin *et al.*, 2002). Par contre, l'expression du flagelle est régulée de manière opposée à celle du SST3 puisqu'un mutant Δ *fliC* a une cytotoxicité augmentée contre les macrophages et au contraire, une surproduction d'ExsA réduit la mobilité flagellaire (Soscia *et al.*, 2007). Il semble que ces deux machineries très proches du point de vue de leur structure s'opposent par leur régulation.

De plus, le SST3 est régulé positivement par le régulateur post-transcriptionnel RsmA, qui appartient à la voie Gac/Rsm impliquée dans la transition expression de facteurs de virulence aiguë / chronique (Voir chapitre transition vie planctonique/ vie communautaire). Une hypoxie détectée par le système ANR-NarL active aussi le SST3 en jouant négativement sur les petits ARNs régulateurs RsmY et RsmZ (O'Callaghan *et al.*, 2011).

Le SST3 est un système qui est également modulé par les nombreux stress ressentis par la bactérie. Concernant la température, le système est activé à 37°C et réprimé à 28°C, ce

qui peut correspondre à une activation par la température du corps du mammifère infecté (Wurtzel *et al.*, 2012). Comme nous l'avons déjà mentionné, le SST3 est également positivement régulé par une forte osmolarité (concentrations en sel extracellulaires élevées) (Rietsch and Mekalanos. 2006).

Lors d'un stress lié au cuivre, il a été proposé que la protéine PtrA (Pseudomonas Type III repressor A) inhibe le SST3 par interaction directe avec ExsA (Ha *et al.*, 2004). Mais au laboratoire, nous n'avons pas observé de lien SST3/PtrA et l'implication de cette protéine dans la résistance au cuivre a été démontré (Elsen *et al.*, 2011).

Chez *P. aeruginosa*, les cassures à l'ADN déclenchent la cascade de signalisation « réponse SOS » activant les systèmes de réparation de l'ADN. Dans la voie « réponse SOS », PtrB agit comme répresseur de l'expression des gènes du SST3 par un mécanisme inconnu (Wu and Jin. 2005). La répression du SST3 en réponse aux cassures de l'ADN pourrait permettre à la bactérie de re-diriger ses ressources énergétiques vers la réponse de stress « SOS ». Les gènes *exsD* et *exsE* ont également été identifiés comme faisant partie du régulon de MvaT, la topologie de l'ADN joue également sur la régulation du SST3 (Castang *et al.*, 2008).

Il existe aussi un lien entre le métabolisme central du carbone et le SST3 : dans un environnement limité en oxygène, *aceA* codant pour l'isocitrate lyase a été également montré comme favorisant l'expression du SST3 sans jouer sur les niveaux d'ExsA (Chung *et al.*, 2013). Le mécanisme n'a pas encore été identifié mais il devrait passer par les voies RetS/LadS.

Le SST3 est également très sensible aux signaux/stress métaboliques détectés par la bactérie. Des mutants sans pyruvate deshydrogénase (*aceA* ou *aceB*) ou un régulateur du transport de glucose (*gltR*) sont incapables d'exprimer les gènes du SST3 en milieu dépourvu en calcium (Dacheux *et al.*, 2002 ; Wolfgang *et al.*, 2003a). De la même manière, la surproduction de pompes à efflux et la surexpression de gènes impliqués dans le transport de l'histidine et le métabolisme empêchent l'expression des gènes du SST3 (Rietsch *et al.*, 2004, Linares *et al.*, 2005). Cette influence négative pourrait s'expliquer par le fait d'une surproduction ou d'une déplétion de métabolites spécifiques, susceptibles de contrôler le SST3. Les mécanismes moléculaires liant les stress métaboliques et les gènes du SST3 sont à éclaircir.

Le métabolisme joue aussi d'une autre manière sur l'expression du SST3 : PsrA est un inhibiteur transcriptionnel des gènes responsable de la dégradation des acides gras (fatty acid

degradation, *fad*) et c'est un activateur transcriptionnel de RpoS (régulateur central de la phase stationnaire). Mais PsrA est aussi le seul facteur de transcription connu, en plus d'ExsA, pour jouer directement sur l'expression du SST3 : en se liant au promoteur *pexsCEBA*, il peut contrôler positivement la transcription de l'opéron *exsCEBA* (Shen *et al.*, 2006). En présence d'acides gras à longues chaînes, l'inhibition de PsrA est levée sur l'opéron *fad* et sa liaison à *pexsCEBA* est inhibée. Les acides gras ont déjà été montrés comme inhibant le SST3 (Kang *et al.*, 2009). De précédentes études sur micropuces ont révélé l'expression de *psrA* et des *fad* dans les poumons CF (Son *et al.*, 2007). Il semblerait que la bactérie détecte et utilise des acides gras comme molécule-signal et source de nutriments dans les infections CF.

Crc est une protéine de répression du catabolisme impliquée dans la régulation du carbone chez les *Pseudomonads* (MacGregor *et al.*, 1991 ; MacGregor *et al.*, 1996 ; Morales *et al.*, 2004). La protéine Crc est également essentielle dans la régulation de la virulence et des processus qui lui sont associés tels que mobilité, formation de biofilm et résistance aux antibiotiques. Mais Crc influence positivement le SST3 et cela en jouant sur différentes voies de régulation comme par exemple en inhibant des inhibiteurs du SST3 (PtrB) ou en activant des activateurs du système (AMPc/Vfr) (Dong *et al.*, 2013).

L'importance du SST3 dans la virulence de *P. aeruginosa* est un fait établi, sa régulation est donc primordiale et de nombreux systèmes y contribuent. Pourtant, une grande majorité des liens entre ces systèmes et le SST3 reste à élucider tels que le lien entre Vfr et le SST3, celui entre PtrB et le SST3 ou encore celui entre AceA et le SST3.

2- La régulation des SST6

Chez *P. aeruginosa*, les trois SST6 sont codés par des gènes organisés en plusieurs opérons regroupés respectivement sur les loci HSI-I, II et III (Mougous *et al.*, 2006) (Figure 22). Différentes régulations s'exercent sur ces loci, à différents niveaux.

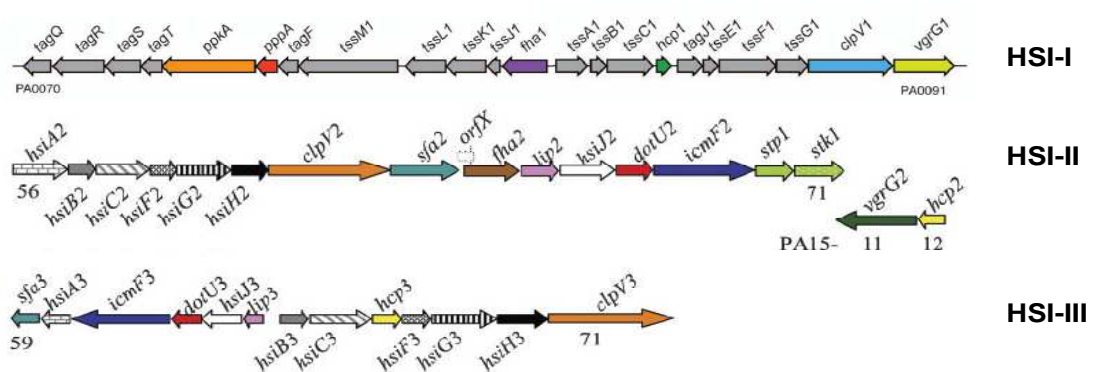


Figure 22 : Représentation schématique des trois loci HSI du SST6 de *P. aeruginosa* d'après (Mougous *et al.*, 2006).

a) Niveau transcriptionnel :

Le QS régule les HSI de manière opposée (Bernard *et al.*, 2010). Ainsi, HSI-I est régulé négativement par le QS (*las*, *pqs*) tandis que HSI-II et HSI-III sont induits par lui (*las*, *rhl*, *pqs*). HSI-II possède également dans sa séquence des boîtes « Fur », sites de fixation du facteur de transcription Fur (recouvrant les deux boîtes -10 des promoteurs σ_{70} -dépendants supposés). Celui-ci une fois complexé avec le fer Fe^{2+} empêche la transcription de ses cibles : HSI-II est donc régulé négativement par le fer (Sana *et al.*, 2012). De plus, des analyses bioinformatiques ont montré que les séquences des HSI-II et HSI-III renferment des sites de fixation de σ^{54} (-24 et -12 en amont des promoteurs *phsiA2*, *phsiB3* et *plip3*). Ils pourraient être transcrits grâce au facteur sigma alternatif σ^{54} (Bernard *et al.*, 2011). Après recrutement de l'ARN polymérase, ce facteur requiert la présence de protéines pour assurer la transcription, les bEBP (Bacterial Enhancer Binding Proteins) (Rappas *et al.*, 2007). Or, les protéines Sfa2 et Sfa3, codées respectivement dans HSI-II et HSI-III, semblent être des protéines EBP-like (Filloux *et al.*, 2008). De nombreux gènes impliqués dans des processus cellulaires comme la motilité ou la virulence sont contrôlés le facteur σ^{54} (Potvin *et al.*, 2008). A l'aide d'analyse de biopuces, le facteur de transcription PsaA a été montré comme induisant le locus HSI-II lors de la phase stationnaire de croissance (Kang *et al.*, 2008) et une autre étude de ChIP-on-chip a identifié MvaT (une protéine histone-like) comme régulateur négatif de gènes du HSI-II et III (Castang *et al.*, 2008).

b) Niveau post-transcriptionnel

Le SST6-1 est régulé négativement de manière post-transcriptionnelle par RsmA, et est donc sous contrôle de la voie Gac/Rsm impliquée dans la transition expression de facteurs de virulence aiguë/chronique (voir chapitre transition planctonique/communautaire). En effet, il y a une inhibition directe par RsmA qui se fixe sur les ARNm de PA0081 (*fha1*) et PA0082 (*tssAI*) (Brennic and Lory, 2009). Ceci implique que l'expression de ce SST6-1 est favorisée en condition d'infection chronique. La voie Gac/Rsm régule également le SST6-3 comme cela a été observé grâce à une approche transcriptomique; en effet, le niveau des transcripts du HSI-III (comme ceux du HSI-I) est diminué dans des mutants *gacA* et *rsmYZ* (Brennic *et al.*, 2009).

c) Niveau post-traductionnel

Le plus étudié des trois HSI reste le premier : il possède deux opérons constitués de gènes conservés (13, ceux codant pour l'appareil de sécrétion) et accessoires (ceux codant pour les gènes impliqués dans la régulation du système). Le HSI-I est activé par phosphorylation lors d'une association avec la surface et il nécessite un contact avec d'autres bactéries pour être fonctionnel. En effet, il n'y a aucune activation de ce système lorsque des bactéries sont mises en culture liquide (Silverman *et al.*, 2011). Sur milieu solide, les bactéries sont quasiment immobiles et les conditions environnementales de « type biofilm » sont favorisées y compris l'activation du SST6-1 (par association à la surface). Ce système est également régulé à travers un Threonine Phosphorylation Pathway (TPP) faisant intervenir un duo kinase (PpkA)/phosphatase (PppA). Après réception d'un signal inconnu, la kinase PpkA va dimériser et s'autophosphoryler sous l'action de TagR une protéine périplasmique. PpkA va ensuite phosphoryler une protéine Fha1 qui va se complexer avec l'ATPase ClpV1. Il y a alors formation du tube (polymères de Hcp1) et de son fourreau (TssB1 et TssA1), éjection du tube avec à son extrémité VgrG1, perforation de la membrane et injection des toxines (Mougous *et al.*, 2007 ; Hsu *et al.*, 2009). Ce système possède plusieurs « points de contrôle » : il y a la phosphorylation de Fha1 et en amont la présence de différentes protéines accessoires impliquées dans la régulation post-traductionnelle : les protéines TagQRST (Casabona *et al.*, 2013). Nous avons montré au laboratoire que ces quatre protéines influent sur la phosphorylation de Fha1, l'assemblage de l'appareil et l'export des effecteurs. Nous avons également montré que TagQ était une lipoprotéine de la membrane externe et que TagR était associée à cette membrane (Figure 23). De plus, l'absence de TagQ modifie la localisation TagR qui perd l'ancrage à la membrane externe.

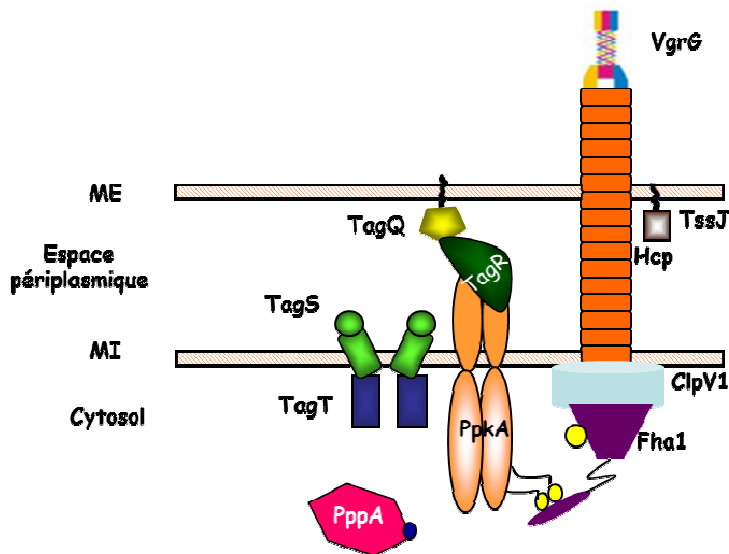


Figure 23 Représentation schématique de l'appareil de sécrétion du SST6-1 et des protéines accessoires. ME : membrane externe, MI : membrane interne. TssJ : lipoprotéine du SST6-1

Il existe également une voie de régulation du SST6-1 indépendante de la phosphorylation avec l'intervention de TagF qui empêche le recrutement de ClpV via Fha1 (Silverman *et al.*, 2011). Mais pour l'instant le signal déclencheur de cette voie est indéterminé.

Ces deux systèmes, SST3 et SST6-1, sont respectivement la signature d'une virulence aiguë et d'une infection chronique. Leur expression est coûteuse en énergie à la bactérie et c'est pourquoi ces deux systèmes sont interconnectés dans des réseaux de régulation très complexes, sur plusieurs niveaux et qui sont loin d'avoir été entièrement décryptés pour le moment.

Objectifs de ma thèse

P. aeruginosa est une bactérie ayant une redoutable capacité d'adaptation à son environnement grâce à ses différents réseaux de régulation. Il reste encore beaucoup à découvrir sur ces réseaux, notamment ceux régulant l'expression des facteurs de virulence, leurs interconnexions ainsi que les différents acteurs qui les composent.

Le fil conducteur de ma thèse était l'étude des différentes cascades de régulation des facteurs de virulence du pathogène opportuniste *P. aeruginosa* et, plus particulièrement, le décryptage des voies de régulation du SST3 et du SST6-1.

L'analyse de cette régulation est divisée en trois approches :

- Tout d'abord, dans le but de trouver de nouvelles voies de régulation et/ou de nouveaux acteurs dans des voies partiellement connues, j'ai développé une méthode originale. J'ai effectué un criblage haut-débit de chimiothèques, en partenariat avec la plateforme de Criblage des Molécules Bio-Actives (CMBA) de l'Institut dans le cadre d'un programme FINOVI, pour rechercher des signaux capables de moduler certains facteurs de virulence.
- J'ai construit une banque de mutants de la souche PAO1F obtenue par transposition. A l'aide d'un double crible, j'ai pu sélectionner des clones intéressants présentant un défaut d'expression du SST3.
- Enfin, j'ai étudié la voie de régulation Gac/Rsm dans le contexte d'une souche CF, la souche CHA. En effet, ces souches qui persistent durant des années dans les poumons accumulent des mutations plus ou moins fréquentes dans des régulateurs des facteurs de virulence ce qui peut modifier le profil d'expression de ces facteurs et re-définir la virulence globale. Pour illustrer ce fait, j'ai pu révéler le défaut de régulation conduisant cette souche CHA à exprimer des facteurs de virulence de type « aiguë » dans un contexte d'infection chronique.

Résultats

Approches chémogénomiques

Résultats et Discussion

I- Recherche de bio-activateurs

A ce jour, il reste encore énormément d'inconnues concernant la régulation du SST3 et des SST6 chez *P. aeruginosa*. Généralement, afin de trouver de nouveaux éléments régulateurs ou des chaînons manquants, deux approches sont envisagées.

La première, que l'on peut qualifier de « dirigée », s'applique quand un gène est fortement pressenti comme ayant un rôle à jouer dans la régulation du facteur d'intérêt. Cette méthode consiste à muter directement ce gène et à analyser son ou ses phénotype(s) sur la fonction de virulence étudiée de la bactérie.

Par contre, lorsqu'il y a peu de documentation sur la cascade de régulation du facteur de virulence étudié ou qu'on recherche de nouvelles voies, une méthode globale de mutagenèse « aléatoire » est pratiquée. Les mutants les plus intéressants sont ensuite validés et caractérisés. C'est par cette approche que les régulateurs globaux RetS et LadS ont été découverts (Goodman *et al.*, 2004, Ventre *et al.*, 2006).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai souhaité développer une méthode originale permettant de rechercher à la fois des gènes et des molécules-signal impliqués dans les cascades de régulation de *P. aeruginosa*, grâce à une approche de criblage à haut débit suivie d'une mutagenèse aléatoire (Figure 24). En effet, en collaboration avec la plate-forme de criblage de biomolécules actives (CMBA) de l'Institut iRTSV, j'ai mis au point un test de criblage de molécules sur des bactéries contenant des fusions rapportrices, afin de trouver des molécules capables d'activer des voies de régulation déjà identifiées ou de nouvelles voies. L'avantage de cette approche est que toutes les molécules ayant un effet négatif ou délétère sur la croissance ne sont pas retenues. Dans un deuxième temps, les molécules activatrices devaient être utilisées lors d'une mutagenèse aléatoire réalisées en leur présence, afin de déterminer les éléments régulateurs des voies activées.

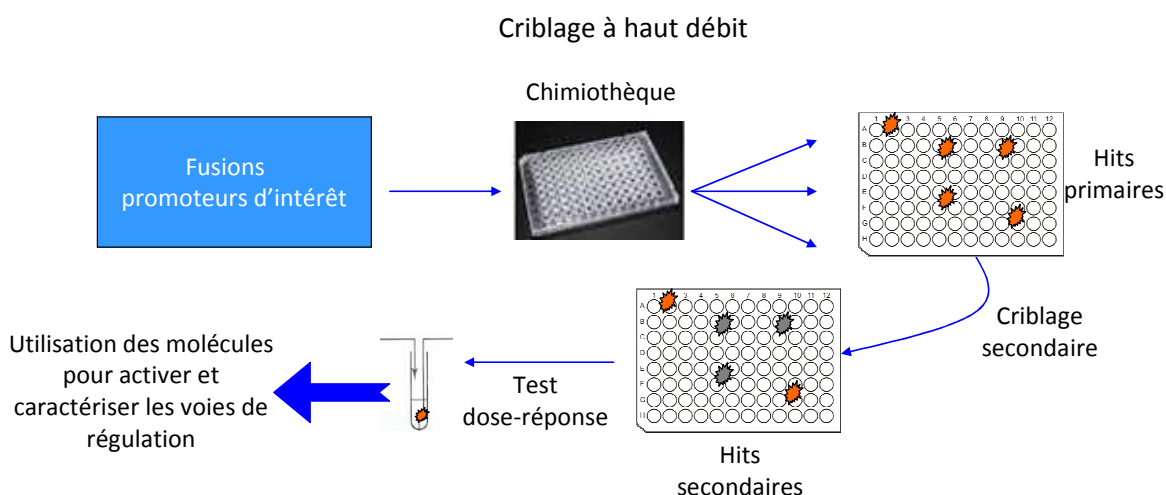


Figure 24 Les différentes étapes du criblage à haut débit

1- CHOIX DES PROMOTEURS

J'ai choisi de me concentrer sur trois facteurs de virulence : le SST3 (avec le promoteur *pexoS*), les SST6 (avec les promoteurs des gènes *fhaI* (PA0081), *hsiA2* (PA1656) et *hsiB3* (PA2365) localisés respectivement dans les loci HSI-I, HSI-II et HSI-III) et l'opéron *magABCDE* (PA4492-4496). Cet opéron est étudié au laboratoire et code pour cinq protéines dont MagD, une protéine « macroglobuline-like » qui serait impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa* (Robert-Genthon *et al.*, 2013). L'opéron *mag* et le SST6-1 étant co-régulés négativement par RetS et RsmA, il nous semblait pertinent d'étudier la régulation du promoteur *pmag* (Brencic and Lory, 2009). De plus, les SST3 et SST6-1 étant inversement régulés, leur utilisation me permettait aussi de rechercher tous les signaux d'activation possibles qu'ils soient perçus par RetS, LadS, GacS ou tout autre senseur de la bactérie impliqué dans cette régulation.

2- FUSIONS ET PLASMIDES

Des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles jouent un rôle majeur dans l'expression des facteurs de virulence que nous étudions (voir partie régulation de la virulence dans l'introduction). Afin d'étudier ces régulations, j'ai donc utilisé deux types de fusions : des fusions transcriptionnelles qui permettent l'analyse de la régulation transcriptionnelle et des fusions traductionnelles pour l'analyse de la régulation post-transcriptionnelle. Les fusions ont été créées soit sur des plasmides intégratifs tels que miniCTX (fusion

transcriptionnelle) et miniTN7T (fusion traductionnelle), soit sur le plasmide réplcatif pIA101 (fusion traductionnelle).

3- SOUCHES

Les souches de *P. aeruginosa* peuvent posséder des réseaux de régulation de leurs facteurs de virulence différents car elles ne possèdent pas le même génome « accessoire » (Klockgether *et al.*, 2011). De plus, des mutations peuvent altérer ces réseaux comme cela a été observé dans les souches PA14 (Rahme *et al.*, 1995) et CHA (voir partie 3 des résultats). Ainsi, deux souches d'origines différentes ont été choisies pour les tests: la souche CF mucoïde CHA présentant un SST3 très actif et pas d'expression de son SST6-1, et la souche non mucoïde PAO1, issue d'une blessure et ayant une bonne expression de ses SST3 et SST6-1. CHA a donc été exclusivement utilisée pour l'étude du SST3 tandis que PAO1 a servi à l'analyse du SST3, des trois SST6 et de l'opéron *mag*. L'emploi de ces deux souches devait permettre de multiplier les chances de trouver des activateurs positifs différents du SST3.

4- GENES RAPPORTEURS

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de virulence des bactéries Gram négatives multi-résistantes, de nombreux activateurs et surtout inhibiteurs des facteurs de virulence de ces bactéries ont été recherchés ces dernières années par une méthode de criblage de molécules. Le tableau 2 illustre les principales cibles et gènes rapporteurs privilégiés par les chercheurs.

Tableau 2 Principaux criblages de chimiothèques effectués récemment

Fonction ciblée	Cible du crible	Gène rapporteur	molécules recherchées	Pathogène étudié	Taille de la banque et hits retenus	Publication
Quorum Sensing	LasR	<i>gfp</i>	Inhibiteurs et inducteurs	<i>P. aeruginosa</i>	16000 (9 inhibiteurs et 14 inducteurs)	(Borlee <i>et al.</i> , 2010a)
Système de sécrétion	SST3	<i>lux</i>	Inhibiteurs	<i>P. aeruginosa</i>	80000 (5 inh)	(Aiello <i>et al.</i> , 2010)
Système de sécrétion	SST3	<i>lux</i>	Inhibiteurs	<i>Yersinia pestis</i>	70966 (4 inh)	(Pan <i>et al.</i> , 2007)
Effecteurs	ToxT	<i>gfp</i>	Inhibiteurs	<i>V. cholerae</i>	63000 (3 inh)	(Anthouard and DiRita. 2013)

Dans ce type de criblage, les trois gènes rapporteurs les plus utilisés sont :

- *lacZ* (mesure d'activité de la β -galactosidase)
- *gfp* (mesure de la fluorescence de la GFP)
- *lux* (mesure de l'activité de la luciférase par luminescence)

Ces trois rapporteurs (Tableau 3) permettent de visualiser aisément l'activation du promoteur. Ils donnent également la possibilité de miniaturiser et de réaliser les tests en plaque 96 puits.

Tableau 3 Principales caractéristiques des gènes rapporteurs

Gène rapporteur	Mesure d'activité	Miniaturisation possible	Ajout de substrat	inconvenient
<i>lacZ</i>	Point final	oui	Oui	Coût des réactifs
<i>gfp</i>	Temps réel (cinétique)	oui	Non	Auto-fluorescence des molécules et du milieu
<i>luxAB</i>	Temps réel (cinétique)	oui	Oui	Coût des réactifs
<i>luxCDABE</i>	Temps réel (cinétique)	oui	Non (synthèse <i>in vivo</i> du substrat)	Synthèse dépend du métabolisme de la bactérie

La différence entre *luxAB* et *luxCDABE* est que le premier opéron code uniquement pour la luciférase bactérienne et nécessite donc un apport de substrat, alors que l'opéron de 5 gènes code à la fois pour l'enzyme et celles qui produisent son substrat (un aldéhyde). Il n'y a donc rien à rajouter pour que la réaction se produise et la luciférase (*LuxAB*) produit de la lumière par oxydation d'un aldéhyde en présence de FMNH₂ et d'oxygène. Par contre, l'inconvénient de ce dernier est que son activité consomme de l'oxygène et FMNH₂. Si une des molécules touche le métabolisme de la bactérie, l'activité luciférase peut en être affectée et ainsi fausser le résultat du rapporteur (Close *et al.*, 2009). C'est pour cette raison que nous n'avons pas retenu *lux* comme rapporteur.

Nous avons privilégié la GFP, malgré le problème d'auto-fluorescence possible du milieu de culture et de certaines molécules, car son avantage est que la fonctionnalité des fusions peut être aisément testée sous microscope et que l'activation peut être suivie en temps réel, par fluorimétrie au fluorosKan.

Nous avons également utilisé le rapporteur *lacZ* car il est possible de mesurer en plaque 96 puits l'activité par un signal luminescent.

5- MILIEU

Pour la croissance de *P. aeruginosa*, nous utilisons couramment le milieu LB, et notamment lors des études des SST3 et SST6. Cependant, ce milieu présente une auto-fluorescence qui peut gêner les mesures de fluorescence lors des cribles.

Pour nous affranchir de la fluorescence basale du milieu LB, et nous permettre ainsi de rechercher à la fois des activateurs et des inhibiteurs de nos systèmes, j'ai réalisé différents tests avec le milieu minimum M63. Malheureusement, dans ce milieu minimum à base de phosphate, nous avons observé une activation du SST3, probablement due à une déplétion du calcium par formation de phosphate de calcium insoluble. Le milieu M63 peut donc servir uniquement à cribler des inhibiteurs du SST3. Comme nous recherchions des activateurs, nous avons conservé le milieu LB.

II- Criblage de la banque Prestwick®

1- Mise au point

a) Mesure de l'activité des fusions SST3

Sachant qu'une régulation post-transcriptionnelle s'exerce sur *exsA* (S. Lory, non publié, voir partie ARNs régulateurs de l'introduction), j'ai réalisé une fusion traductionnelle *pexsCEBA-lacZ* sur plasmide intégratif miniTn7T pour avoir un accès direct à cette régulation. Malheureusement, je n'ai jamais pu mesurer une quelconque activité du gène rapporteur avec cette fusion, et je n'ai pas tenté d'autres constructions.

J'ai donc utilisé comme promoteur cible le promoteur du gène *exoS*, qui est régulé par ExsA. Bien que le gène ne soit pas connu pour être régulé directement au niveau post-transcriptionnel (seulement indirectement via ExsA), j'ai réalisé une fusion traductionnelle avec la *gfp*, portée par le plasmide pIA101, qui s'est révélée fonctionnelle (voir ci-dessous). J'ai également construit une fusion transcriptionnelle *pexoS-lacZ*, portée par un plasmide intégratif (miniCTX).

❖ Mesure de fluorescence (GFP) :

J'ai analysé l'activité de la fusion *pexoS-gfp* dans différentes souches en quantifiant l'expression de la *gfp* par cytométrie en flux. Le SST3 peut être induit de manière artificielle par déplétion de calcium. La souche induite représente mon témoin positif tandis que celle dépourvue du facteur clé ExsA est le témoin négatif. Ainsi, j'ai pu comparer l'amplitude de réponse face à l'induction (Figure 25A).

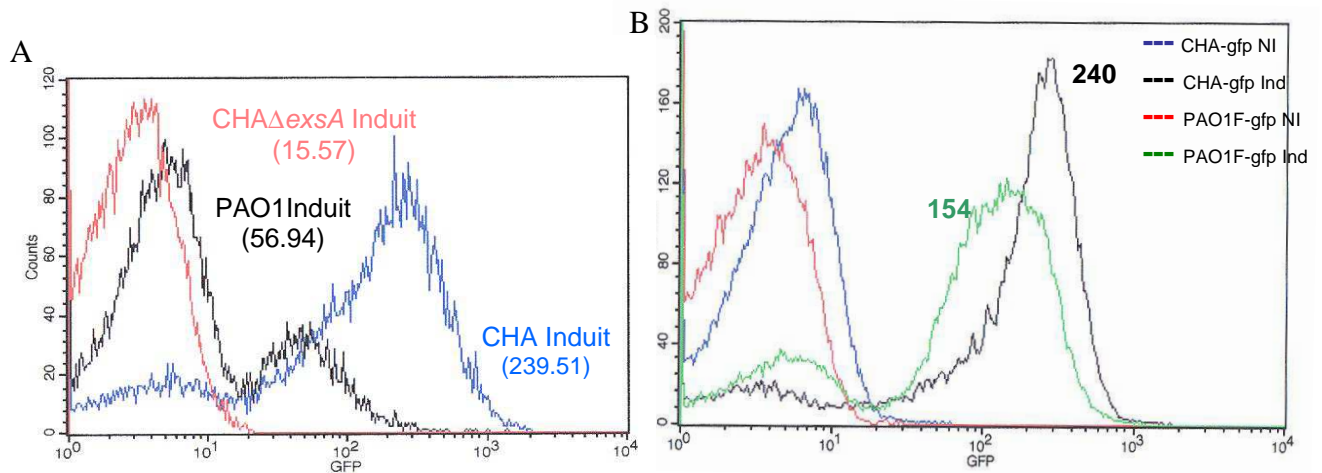


Figure 25 Visualisation de l'induction du SST3 dans CHA et PAO1F. A/ Quantification de la GFP par cytométrie en flux sur les souches CHA/pIA101*pexoS-gfp*, CHAΔ*exsA*/pIA101*pexoS-gfp* et PAO1/pIA101*pexoS-gfp*. Toutes les souches ont été induites pendant 3h par ajout de 5mM EGTA et 20mM MgCl₂. B/ Quantification de la GFP par cytométrie en flux sur les souches CHA/pIA101*pexoS-gfp* et PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* en conditions induites (Ind) ou non (NI). Dans A et B, les valeurs indiquées représentent l'intensité moyenne de fluorescence de chaque souche induite.

Nous observons que la fusion *pexoS-gfp* est induite dans plus de 80% des bactéries CHA. Comme prévu, la souche CHAΔ*exsA* est insensible à l'induction, les gènes du SST3 n'étant pas transcrits. Concernant PAO1, la fusion *pexoS-gfp* est induite dans seulement 25% des bactéries et présente un niveau d'induction quatre fois plus faible que celui observé dans CHA. Cette existence de deux sous-populations (une répondant à l'induction, l'autre pas) observée avec CHA et surtout PAO1 illustre le phénomène de « bistabilité » observé dans une population bactérienne et déjà rapporté avec ce promoteur *pexoS* (Urbanowski *et al.*, 2007); (Rietsch and Mekalanos. 2006). Cette bistabilité dépendrait de fluctuations stochastiques qui déterminent deux états cellulaires différents engendrant ainsi deux sous-populations bactériennes distinctes (Dubnau and Losick. 2006).

La fusion *pexoS-gfp* répondant très mal à l'induction dans la souche PAO1, je l'ai donc testée dans la souche PAO1F, une souche PAO1 qui a été sélectionnée pour son fort SST3 (Bleves *et al.*, 2005). Et en effet, nous observons que la fusion est activée par déplétion en calcium

dans 78% de la population PAO1F, avec une intensité de fluorescence diminuée de moitié par rapport à celle mesurée dans CHA (Figure 25B). J'ai donc deux souches réceptives à l'induction et une fusion traductionnelle (*pexoS-gfp*) opérationnelle pour le crible.

❖ Mesure de l'activité β -galactosidase (LacZ)

Pour tester la fusion *pexoS-lacZ*, je me suis servie du test classique développé par JH Miller pour mesurer l'activité β -galactosidase. J'ai utilisé l'ONPG comme substrat et j'ai mesuré l'absorbance du composé coloré résultant de l'activité de l'enzyme. Comme pour la GFP, j'ai réalisé ce test en conditions induites et non induites du SST3 en me servant de la souche CHA Δ *exsA* comme contrôle négatif (Figure 26).

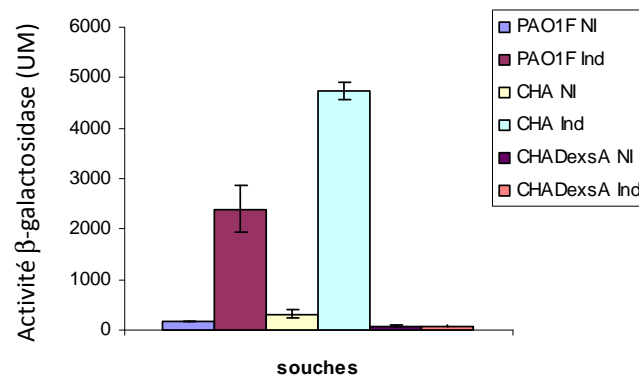


Figure 26 Forte activité de transcription du SST3 dans CHA et PAO1F. Mesure d'activité β -galactosidase de la fusion transcriptionnelle *pexoS-lacZ* intégrée dans le chromosome des souches CHA, CHA Δ *exsA* et PAO1F. NI : non induit, Ind : Induit par 5mM EGTA/20mM MgCl₂

La souche CHA*pexoS-lacZ* en condition induite du SST3 présente une activité β -galactosidase dix fois plus importante que celle mesurée en condition non induite. L'induction de *pexoS-lacZ* est plus faible dans PAO1F. Comme pour la fusion traductionnelle, je retrouve la même tendance : une induction plus forte de la fusion dans la souche CHA que dans PAO1F. Je possède donc une fusion transcriptionnelle fonctionnelle entre un promoteur du SST3 et *lacZ*.

b) Mesure de l'activité des fusions SST6

J'ai réalisé pour les gènes des trois SST6 une fusion transcriptionnelle entre leur promoteur et *lacZ* (mini-CTX-*lacZ*). Les gènes du SST6-1 étant connus pour être régulés

directement par RsmA, j'ai également réalisé une fusion traductionnelle *pfha1-gfp*, mais elle n'a présenté aucune activité.

❖ Mesure de l'activité β -galactosidase (LacZ)

Pour le SST6-1, la fusion transcriptionnelle *pfha1-lacZ* présentait une très forte activité dans la souche PAO1, qui était maximale à une DO de 1,5 (Figure 27). Cette activité, dix fois plus importante que celle mesurée dans la souche PAK/*pfha1-lacZ* (Brencic and Lory. 2009), est observée sans activation préalable de notre part. Nous ne connaissons pas les facteurs activant l'expression des gènes du SST6-1, car seuls des régulations négatives transcriptionnelles et post-transcriptionnelles ont été identifiées à ce jour (Bernard *et al.*, 2010). Avec une telle activité de transcription, nous ne savons pas s'il sera possible d'activer encore plus ce système au moyen de molécules, et il semble plus judicieux de rechercher aussi des inhibiteurs du SST6-1.

Pour l'étude de la régulation post-transcriptionnelle du SST6-1, nous possédions la fusion traductionnelle *pfha1-lacZ* (Brencic and Lory. 2009) et un contrôle physiologique, le mutant $\Delta retS$ dans lequel l'inhibition post-transcriptionnelle de RetS est levée. J'ai donc mesuré l'activité β -galactosidase de la fusion intégrée dans le chromosome des souches PAO1 et PAO1 $\Delta retS$. Les activités mesurées étaient très faibles, et aucune différence n'a pu être observée entre PAO1 et PAO1 $\Delta retS$ (Figure 27). Même après avoir surexprimé *ladS* dans PAO1 (une surexpression de *ladS* équivalant à une délétion de *retS*), je n'ai jamais observé de différence d'expression de la fusion entre PAO1 et PAO1 $\Delta retS$. Notons qu'une différence de 6 avait été rapportée dans la souche PAK, avec des valeurs d'activités très faibles, de l'ordre de celles trouvées dans CHA (Brencic and Lory. 2009).

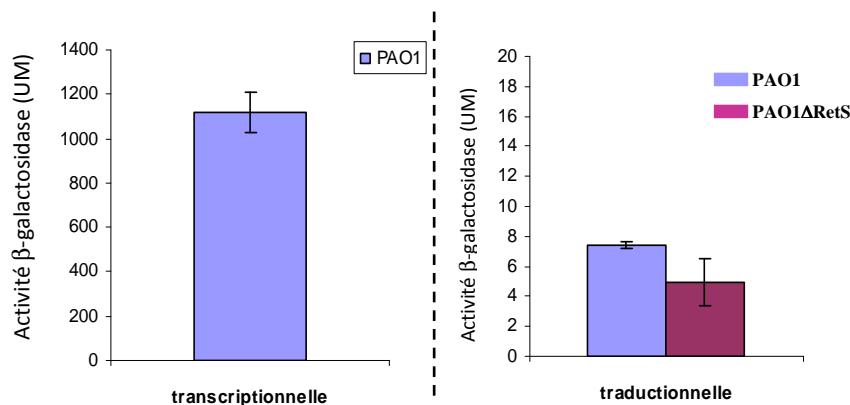
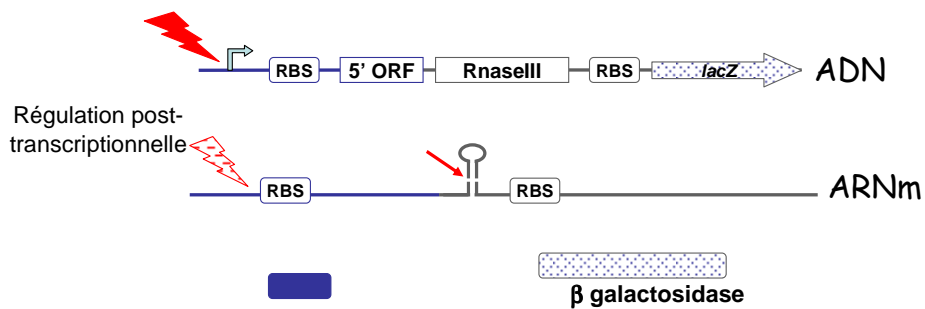


Figure 27 Mesure d'activité β -galactosidase des fusions transcriptionnelle et traductionnelle *pfha1-lacZ* dans les souches PAO1 et PAO1 $\Delta retS$. UM : unités de Miller, DO : 1,5.

J'ai essayé de trouver un moyen d'observer la régulation post-transcriptionnelle s'exerçant sur la fusion. Comme RsmA semble jouer sur la stabilité des transcrits (effet du mutant vu en transcriptomique (Brencic and Lory. 2009)), j'ai modifié la fusion transcriptionnelle *pfha1-lacZ* en me basant sur les propriétés du plasmide intégratif mini-CTX-*lacZ* (Becher and Schweizer. 2000). Ce plasmide de fusion transcriptionnelle possède entre les sites de clonage de la séquence promotrice d'intérêt et le gène rapporteur une séquence particulière qui, après la transcription en ARNm, va former une structure tige-boucle reconnue et clivée par la RNaseIII. Ainsi, la traduction de la β -galactosidase n'est pas affectée par la régulation post-transcriptionnelle qui pourrait s'exercer sur la partie 5' de l'ARNm (en bleu sur le schéma de la Figure 29).

- Fusion transcriptionnelle classique (mini-CTX)



- Fusion transcriptionnelle modifiée (mini-CTX- Δ RIII)

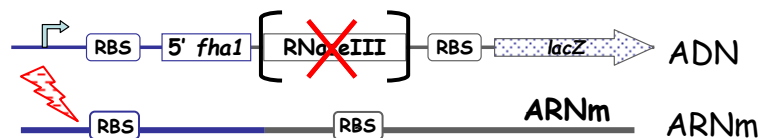


Figure 28 Représentation schématique des deux types de fusions utilisées dans cette étude

Nous avons donc délété sur notre plasmide cette séquence de clivage: ainsi, la totalité de l'ARNm, codant notamment pour le rapporteur, peut subir une régulation post-transcriptionnelle pouvant conduire à sa dégradation. Grâce à cette modification, nous observons une différence d'expression (facteur 2) de la fusion dans les souches PAO1 et PAO1 Δ *retS*, qui reflète la régulation post-transcriptionnelle négative exercée par RsmA en absence de RetS dans cette souche (Figure 29).

Pour étudier le SST6-1, je disposais donc de deux fusions *lacZ* fonctionnelles : une transcriptionnelle et une transcriptionnelle modifiée. A ce stade, nous ne savons pas si la

différence d'activité de 2 observée entre les souches PAO1 et PAO1 Δ RetS avec la fusion « modifiée » nous permettrait de cribler des molécules impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle.

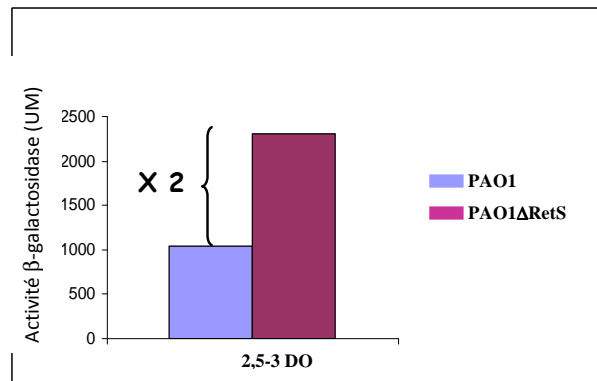


Figure 29 Mesure d'activité β -galactosidase de la fusion transcriptionnelle modifiée *ppha1 Δ RIII-lacZ* intégrée dans le chromosome des souches PAO1 et PAO1 Δ *retS*. UM : unités de Miller

Concernant les fusions transcriptionnelles *lacZ* classiques, avec les gènes *hsiA2* et *hsiB3* respectivement du SST6-2 et SST6-3, j'ai obtenu dans la souche PAO1 des activités plus faibles que pour le SST6-1 (Figure 30). J'ai testé ces fusions dans le mutant Δ *retS* et pu observer une augmentation de l'activité de *phsiB3-lacZ* d'un facteur 2. Ceci est intéressant car un effet de RsmA sur le SST6-3 avait bien été rapporté par une approche transcriptomique (Brencic and Lory, 2009). Mais le fait que cet effet s'exerce sur la fusion transcriptionnelle et non traductionnelle semble indiquer que RsmA agisse sur le SST6-3 de manière indirecte.

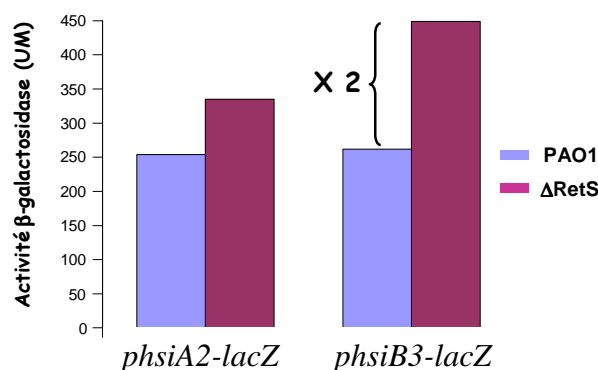


Figure 30 RetS régule indirectement le HSI-III Mesure d'activité β -galactosidase des fusions transcriptionnelles *phsiA2-lacZ* et *phsiB3-lacZ* insérées dans le chromosome des souches PAO1 et PAO1 Δ *retS*. UM : unités de Miller

c) Mesure de l'activité des fusions de la macroglobuline

La protéine MagD (macroglobuline-like) est codée par un gène localisé dans un opéron de 5 gènes. Pour le moment, son rôle reste encore à définir mais elle pourrait certainement être un nouveau facteur de virulence. Chez les eucaryotes, la macroglobuline sert à piéger des protéases. Etant donné que le gène de la macroglobuline est co-régulé avec le SST6-1 et régulé négativement par RetS (Brencic and Lory. 2009), j'ai trouvé intéressant de l'inclure dans le test de criblage pour à la fois mieux comprendre la régulation de ce système et augmenter mes chances de trouver de nouvelles voies de régulation.

J'ai donc réalisé des fusions transcriptionnelle et traductionnelle du promoteur de l'opéron avec *lacZ*. J'ai également construit une fusion traductionnelle avec *gfp* qui, tout comme la fusion *pfhaI-gfp*, n'était pas fonctionnelle.

❖ Mesure de l'activité β -galactosidase (LacZ)

La fusion transcriptionnelle *pmagA-lacZ* présentait une activité de 200 UM, et la fusion traductionnelle *pmagA-lacZ* une faible activité qui était comparable dans PAO1 et PAO1 Δ *retS* (non montré). Donc, tout comme *fhaI*, alors que l'opéron *mag* est une cible directe de RsmA, une fusion traductionnelle ne semble pas être affectée lorsque la régulation post-transcriptionnelle est altérée. J'ai donc procédé de la même manière que pour *fhaI* en modifiant la fusion transcriptionnelle portée par le plasmide mini-CTX-*lacZ* (délétion du site de clivage par la RNaseIII). En mesurant les activités obtenues avec cette nouvelle fusion dans PAO1 et PAO1 Δ *retS* (Figure 31), nous observons tout d'abord une augmentation d'activité de la fusion dans PAO1 Δ *retS*, de cinq fois par rapport à celle mesurée dans PAO1 à une DO de 2. J'ai également remarqué que les activités étaient six fois plus fortes que celles obtenues avec la fusion transcriptionnelle « classique ».

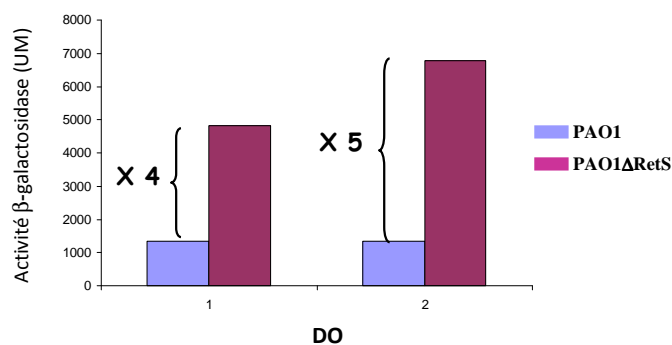


Figure 31 Fort impact de la régulation post-transcriptionnelle sur la synthèse de la macroglobuline. Mesure d'activité β -galactosidase de la fusion transcriptionnelle modifiée *pmagA Δ RIII-lacZ* intégrée dans le chromosome des souches PAO1 et PAO1 Δ *retS*. UM : unités de Miller

Comme pour le SST6-1, la fusion transcriptionnelle modifiée de *pmag-lacZ* possédait une forte activité même sans induction (bien observable dans le mutant $\Delta retS$) ; il y avait donc déjà une forte transcription et il est probable qu'une sur-activation du système soit difficile à obtenir. Par contre, nous pouvions envisager de rechercher aussi pendant le criblé des inhibiteurs de transcription.

De façon intéressante, la différence d'activité de *pmagA-lacZ* modifiée observée entre PAO1 et PAO1 $\Delta retS$ est plus importante que celle observée sur *fha1* (cinq fois au lieu de deux fois), et il semble qu'il y ait un plus grand impact de la régulation post-transcriptionnelle. Cette situation a été retrouvée dans la souche PAK grâce à une analyse de micropuces : la différence de transcription entre le mutant PAK $\Delta rsmA$ et la souche sauvage était de 1,9 pour le gène *fha1* et de 5,8 pour le gène *magA* (Brencic and Lory. 2009). Ce promoteur semblait donc être adapté à l'étude de cette voie de régulation.

Le tableau 4 est un tableau récapitulatif de toutes les fusions testées qui précise lesquelles sont exploitables pour le criblé.

Tableau 4 Bilan des différentes fusions testées

	Fusions transcriptionnelles (chromosomiques)	Fusion traductionnelles
SST3 - dépendant	<i>miniCTXpexoS-lacZ</i>	<i>pIA101pexoS-gfp</i> (plasmidique) <i>miniTn7TpexsCEBA-lacZ</i> (chromosomique)
SST6-dépendant	SST6-1: <i>miniCTXpfha1-lacZ</i> <i>miniCTXpfha1 $\Delta RIII lacZ$</i>	<i>pIA101fha1-gfp</i> (plasmidique) <i>miniTn7Tpfha1-lacZ</i> (chromosomique)
	SST6-2 : <i>miniCTXphsiA2-lacZ</i>	
	SST6-3 : <i>miniCTXphsiB3-lacZ</i>	
Macroglobuline -dépendant	<i>miniCTXpmag-lacZ</i> <i>miniCTXpmag $\Delta RIII lacZ$</i>	<i>pIA101pmag-gfp</i> (plasmidique) <i>miniTn7Tpmag-lacZ</i> (chromosomique)

Rouge : fusion non fonctionnelle, verte : fusion validée et fonctionnelle

d) Adaptation du test en plaque 96 puits

❖ Mesure de l'activité GFP

La mesure des fusions avec le rapporteur *gfp* se fait par cinétique : lecture directe de fluorescence dans un fluorimètre (FluorosKan) au cours du temps.

❖ Mesure de l'activité β -galactosidase : le β -glo[®]

Etant donné que je ne pouvais plus utiliser la méthode classique ONPG pour mesurer l'activité LacZ de mes fusions, il m'a fallu trouver un système de mesure d'activité β -galactosidase en plaques. Ainsi, j'ai utilisé le réactif β -glo[®] de Promega[®] qui permet d'associer un signal luminescent à la quantité de β -galactosidase présente dans le puits (Figure 32A). Après avoir rajouté à la culture bactérienne le réactif contenant un agent de lyse, il suffit de lire la luminescence dans un lecteur de plaque. Cette méthode semblait donc bien adaptée au départ puisque, théoriquement, elle s'effectuait en une étape.

Cependant, j'ai rencontré deux problèmes : une saturation du signal due à une trop forte activité des fusions et un problème de lyse incomplète des bactéries dans les puits. Par exemple, je n'observais aucune différence de l'activité de la fusion transcriptionnelle *pexoS-lacZ* dans la souche CHA entre les conditions non induite et induite du SST3. Pour contourner les deux problèmes, j'ai testé différentes dilutions de la culture bactérienne: au 1/10^e, 1/100^e et 1/1000^e (Figure 32B). Plus la culture était diluée, plus j'obtenais une différence significative entre les deux conditions testées, différence similaire à celle obtenue avec le test ONPG classique (Figure 26).

Les séries de dilutions manuelles posent un problème pour l'utilisation de β -glo, puisqu'elles sont sources d'erreurs. Néanmoins, nous avons retenu ce réactif pour les promoteurs pour lesquels il n'y avait que des fusions fonctionnelles avec le rapporteur *lacZ* (SST6s et *pmag*). Par contre, pour le SST3, comme nous avons le choix entre des fusions avec *gfp* et *lacZ*, nous avons décidé de limiter les manipulations et de faire le crible avec la fusion traductionnelle *pexoS-gfp*, malgré les problèmes d'autofluorescence du milieu (LB) et de certaines molécules. Recherchant essentiellement des activateurs du SST3, les problèmes d'autofluorescence du milieu ne nous gênaient pas.

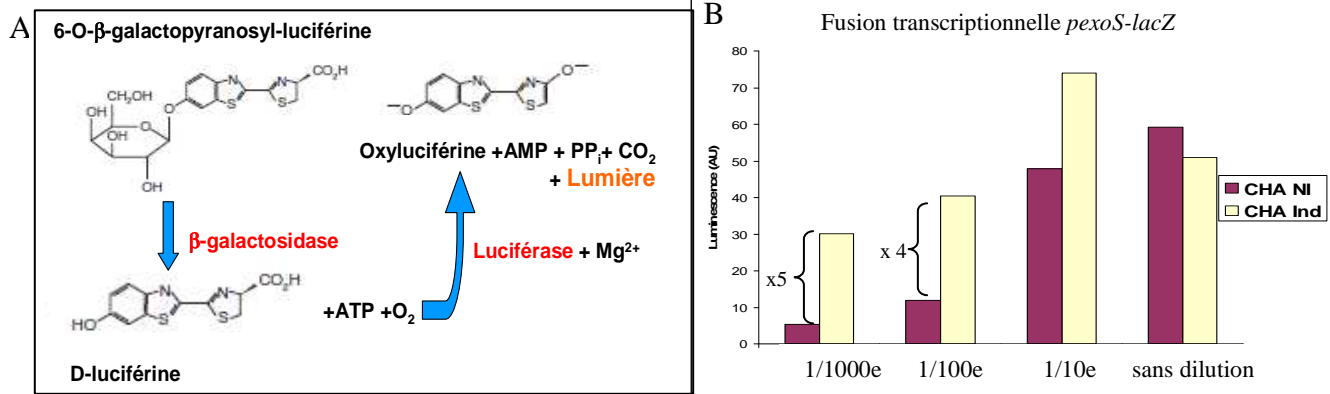


Figure 32 Utilisation du β-glo pour le crible A/ Schéma des deux réactions enzymatiques conduisant au dégagement de lumière. B/ Mesure de l'activité β-galactosidase de la fusion transcriptionnelle *pexoS-lacZ* dans la souche CHA en conditions induites et non-induites du SST3 et à différentes dilutions.

❖ Détermination de la robustesse du test : le «score z' »

Pour savoir si je pouvais utiliser les fusions construites pour le crible en plaque 96 puits, je devais d'abord déterminer leur «robustesse ». Pour cela, je devais évaluer pour chacune « le score z' » qui est une valeur permettant de juger la qualité de mes fusions pour un test en simplicat (Zhang *et al.*, 1999). Pour cela, deux contrôles doivent être définis pour borner l'essai : un contrôle positif et un contrôle négatif. La formule permettant de calculer le z' score est la suivante:

$$z' = 1 - \frac{[(3x \text{ écartype du contrôle positif}) + (3x \text{ écartype du contrôle négatif])}{\text{Moyenne du contrôle positif} - \text{moyenne du contrôle négatif}}$$

Après calcul du z' score, il y a 5 possibilités :

- Si le $z' = 1$, l'essai est idéal
 - Si $1 < z' \geq 0,5$, l'essai est excellent
 - Si $0,5 > z' > 0$, il y a « essai double » → la bande de séparation est étroite
 - Si $z' = 0$, c'est un essai de type « Oui /Non » → pas de bande de séparation, les deux conditions se touchent (toutefois, elles sont distinctes)
- } La bande de séparation est large entre les 2 contrôles

- Si $z' < 0$, l'essai est impossible \rightarrow pas de bande de séparation, superposition des deux conditions (elles sont mélangées).

❖ SST3 :

Pour déterminer le score z' du crible de la fusion *pexoS-gfp*, je voulais utiliser comme contrôle négatif le mutant $\Delta exsA$. L'inconvénient est que l'autofluorescence du milieu LB est telle qu'il n'y avait aucune différence entre la souche non induite et le mutant $\Delta exsA$, le niveau basal de fluorescence étant déjà haut. Je n'ai donc pu borner l'essai qu'avec le contrôle positif (souche sauvage induite), limitant le crible à la seule recherche d'activateurs, ce qui était tout de même le but initial de l'étude.

J'ai donc déterminé le score z' de la fusion *pexoS-gfp* dans les souches CHA et PAO1F. La Figure 33 présente les résultats obtenus en mesure de fluorescence après trois heures de croissance de la souche CHA/*pexoS-gfp* (à gauche) et de PAO1F/*pexoS-gfp* (à droite) en conditions induites ou non du SST3. Avec un score z' de 0,55, le test est possible entre les deux conditions de CHA/*pexoS-gfp*. Par contre, le score z' obtenu avec PAO1F est négatif. Malgré tout, la souche PAO1F a néanmoins été maintenue pour le crible de la chimiothèque car bien que ne répondant pas comme CHA à l'EGTA dans ces conditions d'activation, elle aurait pu répondre fortement à certaines molécules testées.

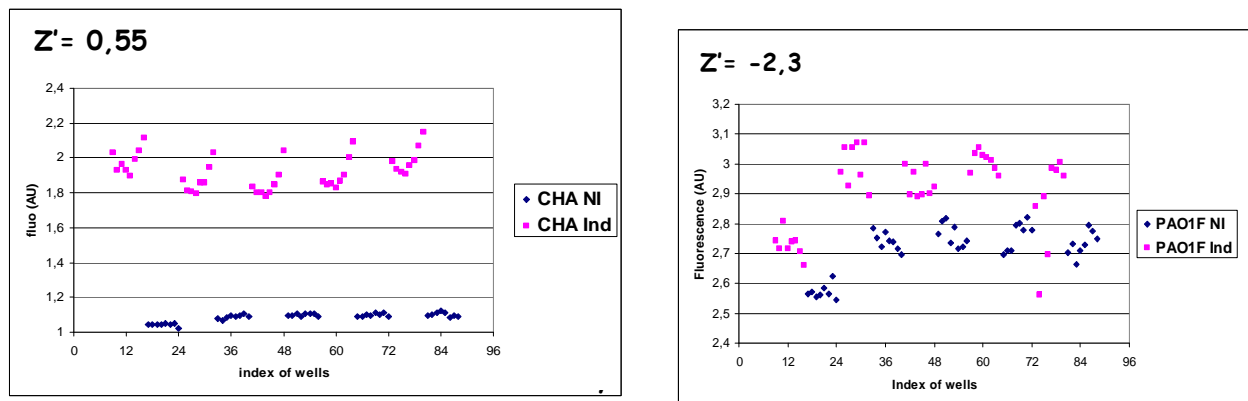


Figure 33 Le crible est possible pour CHA. Détermination des « scores z' » entre CHA/pIA101*pexoS-gfp* et PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* en conditions induite du SST3 (Ind) et non induite (NI)

❖ SST6 et macroglobuline :

Comme je ne possédais pas de moyens d'induire la transcription des gènes du SST6 et de la macroglobuline, j'ai utilisé pour borner mon essai un contrôle positif arbitraire (une fusion d'un promoteur d'un gène du SST3, *pcrG*, inductible à l'EGTA et fusionné à *lacZ*) et comme contrôle négatif ma fusion traductionnelle *pfha1-lacZ* (niveau d'activité très bas).

Concernant les SST6 2 et 3, des z' négatifs ont été obtenus car les conditions de tests ne devaient pas être optimales pour ces deux systèmes. Le crible étant donc impossible avec ces 2 fusions, j'ai poursuivi avec le SST6-1 et la macroglobuline.

Pour ces deux systèmes, j'ai tiré avantage du fait que je possède des fusions transcriptionnelles modifiées avec de très fortes activités pour à la fois chercher des activateurs et des inhibiteurs de ces 2 systèmes. Ainsi, j'ai dilué mes échantillons au $1/100^e$ à la recherche d'activateurs et d'inhibiteurs forts, et au $1/1000^e$ pour des activateurs faibles (il y a une meilleure séparation à la 2^e dilution qui peut permettre d'identifier des molécules non sélectionnées à la 1^e dilution). Sur la Figure 34 sont présentés les résultats obtenus avec les souches PAO1*pfha1* Δ RIII-*lacZ* et PAO1*pmag* Δ RIII-*lacZ* après 3 heures de croissance en LB; les bactéries ont ensuite été diluées soit au $1/100^e$, soit au $1/1000^e$ avant la révélation au β -glo. Nous pouvons donc utiliser ces deux souches et ces deux dilutions pour cribler les banques de molécules.

Fusions Dilutions	<i>pfha1-lacZ</i>	<i>pmag-lacZ</i>
$1/100^e$	$z'_1=0,7$ (zone A)	$z'_1=0,3$
	$z'_2=0,54$ (Zone B)	$z'_2=0,5$
$1/1000^e$	$z'_3=0,73$ (zone C)	$z'_3=0,7$

$Z'(1)$: correspondant à la recherche d'activateurs forts

$Z'(2)$: correspondant à la recherche d'inhibiteurs forts

$Z'(3)$: correspondant à la recherche d'activateurs faibles

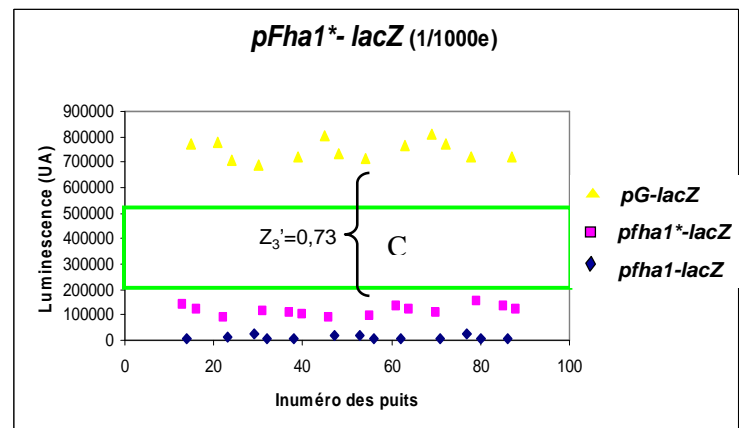
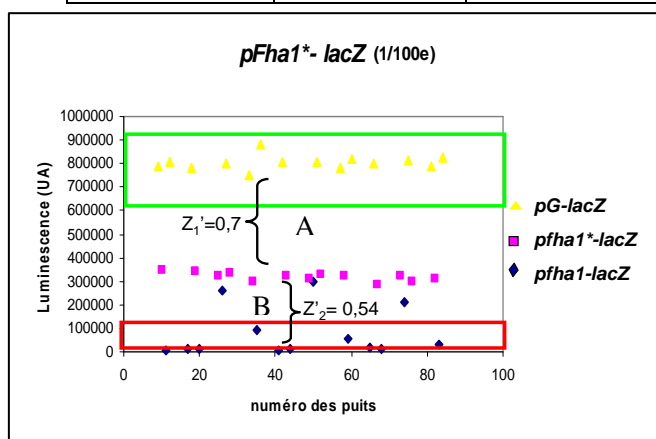


Figure 34 Le crible est possible pour le SST6-1 et la macroglobuline. Détermination des « score z' » entre PAO1*pfha1* Δ RIII-*lacZ* (*pfha1**-*lacZ*) et PAO1*pmag* Δ RIII-*lacZ* avec comme contrôle positif PAO1/pIApG-*lacZ* (*pG-lacZ*) et négatif PAO1*pfha1-lacZ* (traductionnelle, *pfha1-lacZ*). Détermination du score z' avec *pfha1* Δ RIII-*lacZ* : mesure de luminescence des fusions : pIApG-*lacZ* (13000 UM), *pfha1* Δ RIII-*lacZ* (1000 UM) et *pfha1-lacZ* (8 UM)

Les molécules à tester sont toutes conservées dans du DMSO 100% à une concentration de 10mM et utilisées à une concentration finale de 50µM, ce qui apporte 0,5% de DMSO dans l'essai. Pour le crible, il a donc fallu vérifier que ce solvant n'altérait pas l'activité de mes promoteurs, ni la croissance de mes souches.

J'ai donc réalisé des courbes de croissance et des mesures d'activité LacZ (Figure 35) et GFP (non montré) et n'ai pas remarqué de différences significatives en présence de 0,5% DMSO.

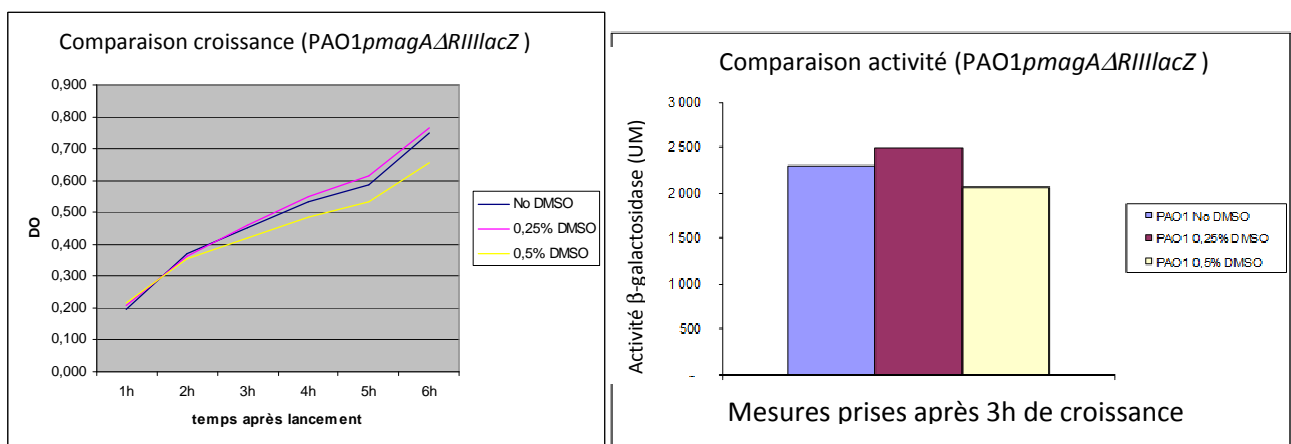
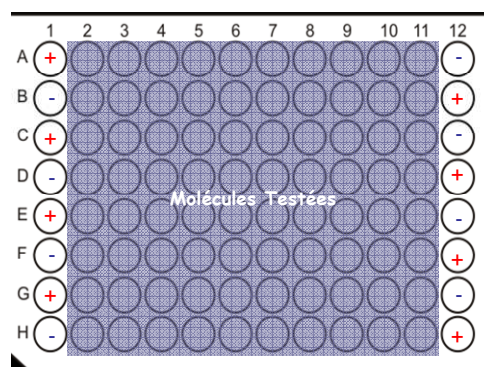


Figure 35 Aucun effet du DMSO sur la croissance et l'activité des souches. Test de croissance et d'activité β-galactosidase en présence de DMSO pour PAO1pmagAΔRIII-lacZ.

❖ « Blank test »

J'ai ensuite pu réaliser un test contrôle dans les conditions du « vrai » crible afin de vérifier tous les paramètres en même temps. La plaque témoin (Figure 36) comprend le contrôle positif (plus rouge), le contrôle négatif (moins bleu) ainsi que les molécules à tester (zone grisée). Elle permet de déterminer de nouveau le score z', le coefficient de variation, l'écartype de chaque test ainsi que les valeurs moyennes représentant la valeur basale du rapporteur sans activation.



	PAO1					
	CHA <i>pexoS-gfp</i>	PAO1F <i>pexoS-gfp</i>	<i>pfha1ΔRII-lacZ</i> (1/100 ^e)	<i>pfha1ΔRIII-lacZ</i> (1/1000 ^e)	<i>pmagΔRIII-lacZ</i> (1/100 ^e)	<i>pmagΔRIII-lacZ</i> (1/1000 ^e)
Valeurs moyennes	2,5	1,5	409000	106000	661000	248000
unités	UA (fluo)	UA (fluo)	UA (lumi)	UA (lumi)	UA (lumi)	UA (lumi)

Figure 36 Représentation schématique de la plaque « test » et valeurs moyennes de l'activité basale de chaque test. UA : unité arbitraire, Fluo : fluorescence, lumi : luminescence

o La chimiothèque Prestwick[®]

Le CMBA a mis à notre disposition la banque Prestwick, dans le cadre d'une collaboration FINOVI. La « Prestwick[®] Chemical Library » renferme 1200 molécules présentant une grande diversité de structures chimiques et d'activités pharmacologiques. Tous ces composés sont déjà commercialisés et ont donc déjà été testés pour leur innocuité chez l'homme. Les différentes molécules sont conservées à 10mM dans du DMSO et réparties sur 15 plaques de 96 puits. Cette chimiothèque possède l'avantage d'avoir des composés déjà caractérisés, ce qui en cas de touches positives facilite l'achat des molécules et la recherche d'analogues.

2- Sélection des molécules

Le criblage primaire s'est déroulé comme suit : les molécules (10 mM) ont été tout d'abord diluées au 1/20 dans du LB par le robot sur la plate-forme et déposés sur une plaque 96 puits à raison de 10µl par puits. Dans tous les essais, 90 µl de bactéries ont ensuite été ajoutés dans le puits: les molécules sont donc diluées 200 fois et en concentration finale de 50 µM ce qui apporte 0,5% DMSO dans le milieu.

Pour le SST3, les molécules ont été mises en contact avec les souches PAO1F et CHA (90µL/puits, DO:0,1) en début de croissance sur plaques et la fluorescence suivie pendant 4h.

Pour le SST6 et la macroglobuline, les bactéries ont été remises en culture jusqu'à une DO de 1,5 (environ 3h de croissance à 37°C en erlens sous agitation à 300 rpm) avant de les ajouter aux molécules, dans le but de suivre une induction tardive pendant 2 h. A la fin des 2 h, j'effectuais à l'aide d'une multi-pipette une première dilution manuelle au 1/100^e puis une

deuxième au 1/1000^e avant de révéler mes plaques avec le réactif β -glo et faire la mesure de luminescence. Le seuillage a été fixé à un minimum de deux fois la valeur d'activité basale.

A l'issue du criblage primaire, 141 molécules sont sorties comme hits potentiels sur l'ensemble des promoteurs et souches, soit 12% de la chimiothèque. 68 molécules devaient être confirmées de nouveau car des erreurs de manipulations des plaques ont pu biaiser les résultats. Par la suite j'ai effectué un criblage secondaire sur un pool des 209 molécules sur l'ensemble des promoteurs et je n'ai retenu que les dix-huit molécules qui étaient ressorties à la fois au criblage primaire et au criblage secondaire. Trois molécules étant activatrices à la fois pour PAO1F et CHA, cela donne un final de 15 molécules sélectionnées pour la suite de l'étude (15/141). L'ensemble du criblage a été effectué sur deux mois et le schéma récapitulatif (ci-dessous) en résume les grandes parties (Figure 37).

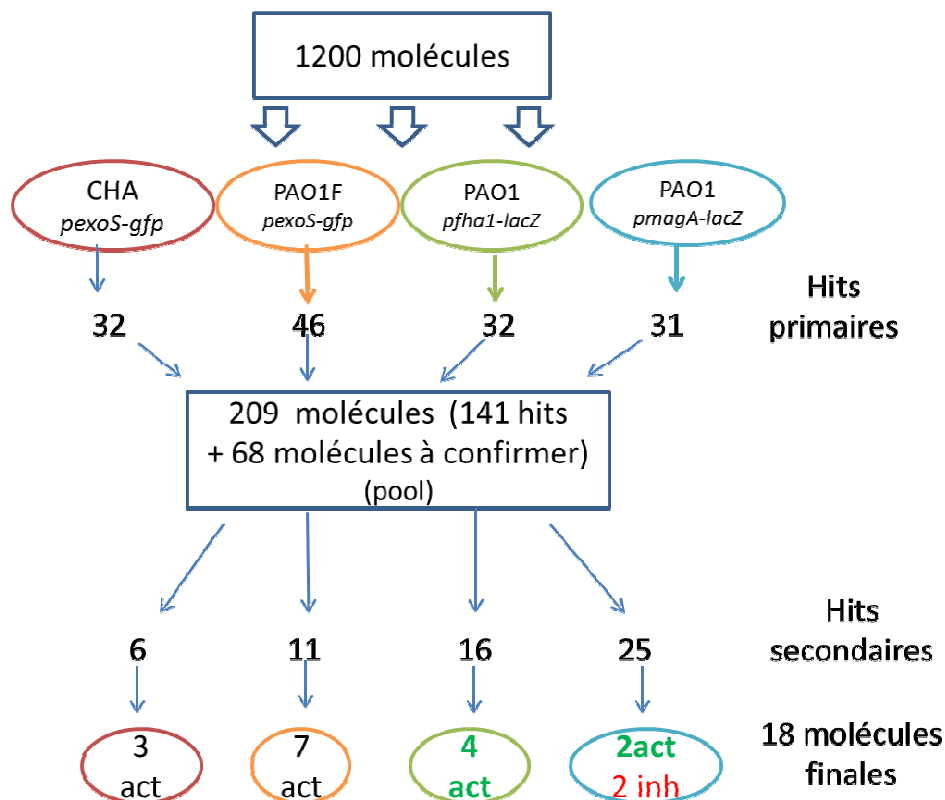


Figure 37 Bilan récapitulatif du criblage. Les 18 molécules finales sont celles communes au criblage primaire et secondaire Prestwick. Act : activateur, inh : inhibiteur

Voici un exemple de résultat (Figure 38) obtenu pour le SST3 avec PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* (mesure en point final de fluorescence). On note que comme le montrait le score z' , il n'y a

pas de séparation entre les contrôles actifs et inactifs. Toutefois, l'isoetharine entraîne une augmentation nette de la fluorescence.

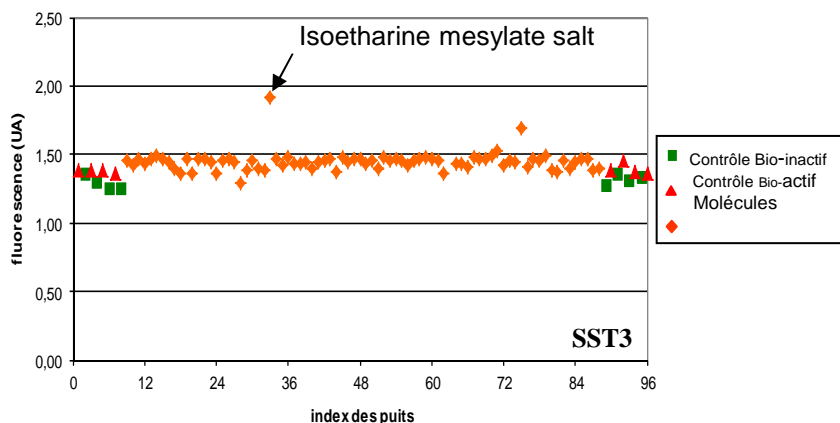


Figure 38 Résultat obtenu avec le promoteur du SST3 sur PAO1F. Contrôle bio-actif : PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* induit (5mM EGTA+20mM MgCl₂), contrôle bio-inactif : PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* non induite

3- Caractérisation des molécules

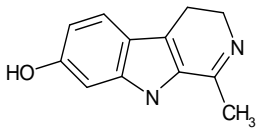
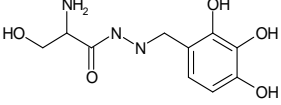
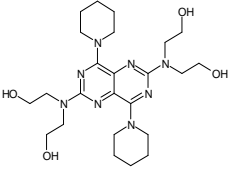
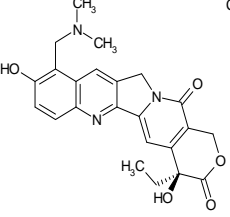
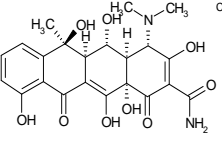
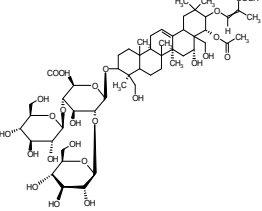
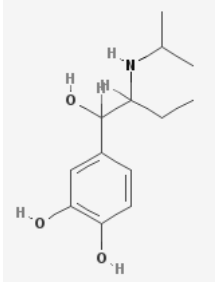
Une fois réduite à 15 la liste des molécules à tester, je me suis procuré chacune d'elles auprès de SIGMA[®]. Afin de valider les hits, j'ai réalisé :

- un test dose-réponse allant de 5 nM à 500 μM. Pour les molécules activant le SST3, j'ai effectué un double-test rapporteur, *lacZ* et *gfp*, afin de m'affranchir du biais des molécules auto-fluorescentes.

- j'ai également comparé en test dose-réponse et en plaque les composés Prestwick[®] et leurs équivalents chez SIGMA[®] dans le but de vérifier qu'il n'y avait pas de problème de dégradation des molécules achetées après plusieurs cycles de congélation/décongélation.

- ❖ SST3 : 7 molécules putatives (4 activateurs pour PAO1F + 3 activateurs en commun pour CHA et PAO1F)

Tableau 5 molécules retenues comme possibles activateurs du SST3

Molécules ^a	Formule	Type de molécule	Active sur PAOIF ^b	Active sur CHA
Harmalol hydrochloride dihydrate*		Alcaloïde (produit réglementé. non testé) ^c	Oui	Oui
Topotecan*		Inhibiteur de la topoisomérase	Oui	Oui
Dipyridamole*		Inhibiteur de phosphodiesterase	Oui (1,5x)	Oui
Oxytétracycline dihydrate		Dérivé de tétracycline	Oui (=)	Non
Beta-Escin		Surfactant	Oui (0,5x)	Non
Benserazide hydrochloride			Oui (= 1,25 x)	Non
Isoétharine mésylate salt			Oui (=)	Non

^a : * symbolise les molécules autofluorescentes, ^b : entre parenthèses sont indiqués les effets mesurés des molécules par rapport à l'induction par déplétion en calcium (EGTA), ^c : l'achat de ce produit nécessitait une autorisation des autorités. C'était sûrement une molécule auto-fluorescente, donc je n'ai pas poursuivi avec elle.

- Test dose-réponse

Le fait que PAO1F présente plus de hits putatifs que CHA et que seulement trois molécules activaient les 2 souches de façon concomittente nous confortait sur le fait que la différence de réponse des souches pouvait refléter des réseaux de régulation différents.

Malheureusement, les trois molécules activant la fusion *pexoS-gfp* à la fois dans CHA et PAO1F étaient des molécules auto-fluorescentes (marquées d'une* sur le tableau). Je ne les ai donc pas retenues tout comme deux des activateurs de PAO1F qui présentaient un signal anormal (pente anormale, résultat non montré). Les deux derniers composés (benserazide hydrochloride et isoétharine mésylate salt) donnaient un beau profil dose-réponse avec la fusion *pexoS-gfp* (Figure 39) mais je n'ai pu reproduire cet effet avec la fusion *pexoS-lacZ*. De plus, j'ai réalisé des westerns blots et pu observer que ces deux composés n'avaient aucun effet sur l'activation du SST3 : en effet, la quantité de trois protéines du SST3, PopB, PopD et PcrV, synthétisées ou sécrétées dans le milieu, ne variait pas en leur présence (Figure 39). Ces molécules doivent certainement agir sur le rapporteur, la GFP, et augmenter sa stabilité ou potentialiser son activité.

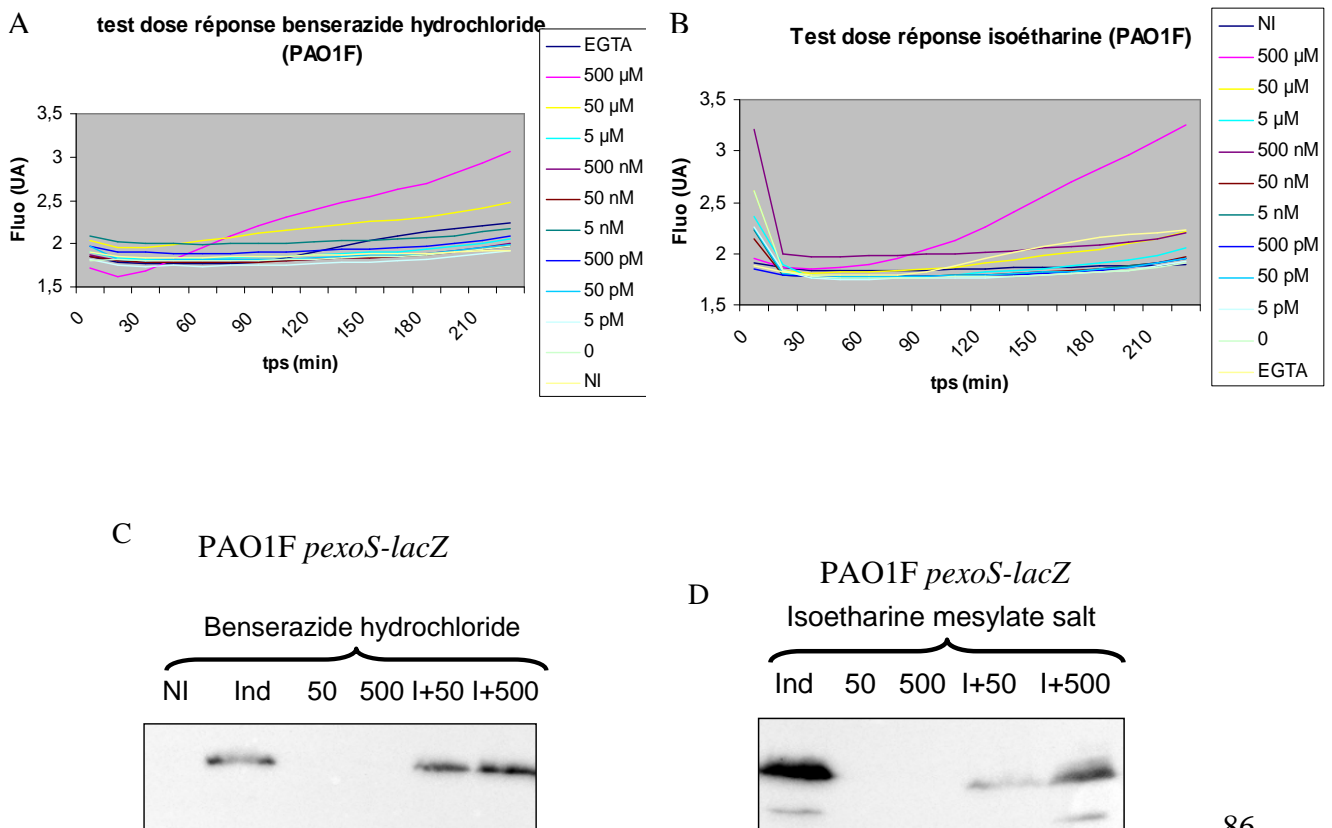


Figure 39 Benserazide et Isoetharine semblent avoir un effet sur la GFP. Test dose-réponse de PAO1F/pIA101*pexos-gfp* en présence de benserazide (A) et d'isoétharine (B) à différentes concentrations. NI : non induit, EGTA : Induit à 5mM EGTA/20mM MgCl₂. Recherche d'activation du SST3 : Western-blots anti-PopB et anti-PcrV sur les lysats bactériens de souches PAO1F/*pexoS-lacZ* en présence de benserazide (C) ou d'isoétharine (D) à la concentration indiquée (en μM)

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai construit une fusion entre le gène *fdx1* codant pour une ferredoxine et le gène rapporteur *lacZ* ou *gfp* que j'ai introduite dans le chromosome de PAO1F. L'expression de *fdx1* s'est montrée indépendante d'ExsA et de la concentration en calcium (Elsen *et al.*, 2010). En présence des deux molécules, j'ai bien observé une augmentation de fluorescence pour la fusion *pfdx1-gfp* tandis qu'il n'y avait aucun effet des molécules sur *pfdx1-lacZ*. Les deux molécules ont donc bien un effet sur le rapporteur GFP indépendamment du promoteur. Elles pourraient la stabiliser, ce qui pourrait expliquer l'activation artificielle du gène rapporteur (Figure 40).

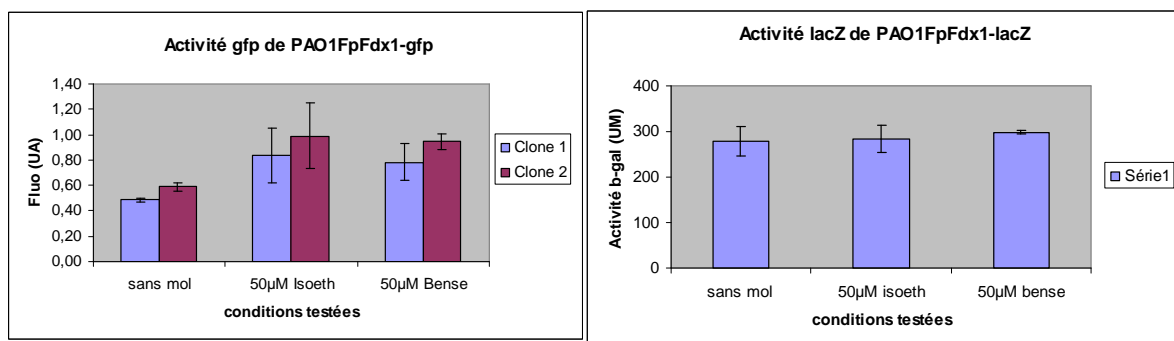
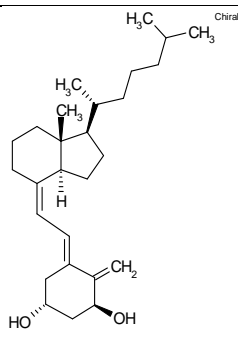
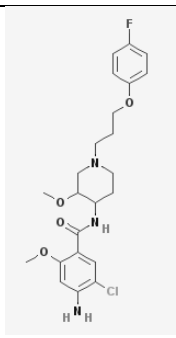
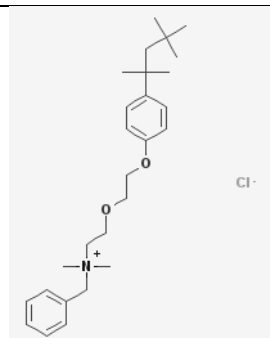
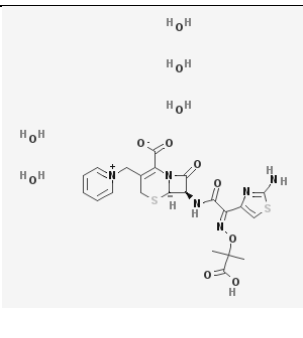


Figure 40 Benserazide et isoetharine ont un effet sur la GFP indépendamment du promoteur. Mesure de fluorescence et d'activité β-galactosidase des souches PAO1F*pfdx1-gfp* et PAO1F*pfdx1-lacZ* en présence ou non de 50μM de benserazide (bense) ou d'isoétharine (isoeth).

❖ SST6-1 (4 activateurs potentiels)

Quatre molécules ont été identifiées (Tableau 6) : 3 par dilution au 1/100^e et 1 au 1/1000^e.

Tableau 6 molécules retenues comme possibles activateurs du SST6-1 (malgré leur faible effet d'activation)

Molécule	Alfacalcidol ^α	Cisapride ^α	Benzethonium chloride ^α	Ceftazidime pentahydrate
Formule				
Type de molécule (a)	Métabolite actif de la vitamine D (x1,5)	Benzamide substitué (x1,2)	Surfactant (x1,8)	Céphalosporine (x1,6)
Dilution de la souche	(1/100 ^e)	(1/100 ^e)	(1/1000 ^e)	(1/100 ^e)

^α symbolise les molécules ayant un effet sur la croissance bactérienne. ^(a) Les chiffres entre parenthèses représentent l'effet d'activation mesuré des molécules par rapport au niveau basal.

-Test dose-réponse

J'ai réalisé un test dose-réponse avec les 4 hits positifs de *pfha1-lacZ*, qui n'a donné aucun résultat concluant (Figure 41). Ceci peut s'expliquer par le fait que les touches étaient toutes situées légèrement au-dessus du niveau basal. De plus, je me suis rendue compte que la croissance des bactéries était favorisée en présence de trois des molécules ressorties lors du criblage (marquées par une ^α dans le tableau). La valeur de luminescence n'ayant pas été rapportée à la DO₆₀₀, l'activité totale β-galactosidase était ainsi légèrement augmentée sans véritable effet sur le promoteur.

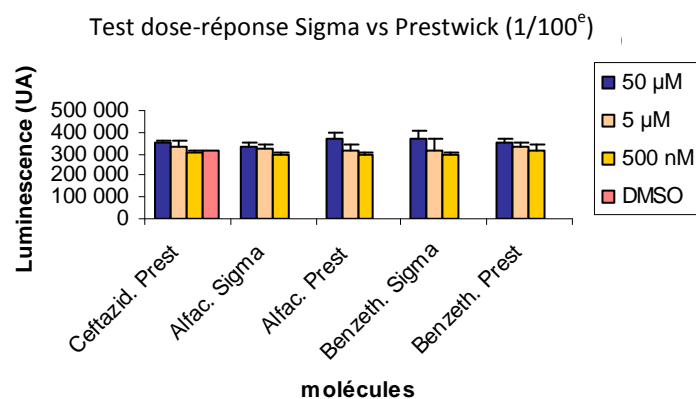
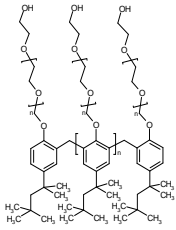
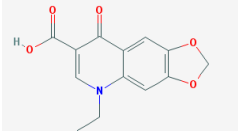
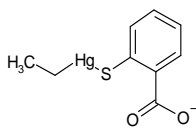
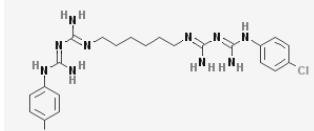


Figure 41 Test dose-réponse (mesure d'activité β-galactosidase) par β-glo de la fusion transcriptionnelle modifiée *pfha1ΔRIII-lacZ* intégrée dans le chromosome de PAO1 en présence de molécules aux concentrations indiquées.

❖ Macroglobuline (2 activateurs et 2 inhibiteurs potentiels)

Quatre molécules ont été identifiées (Tableau 7) : 2 activateurs par dilution au 1/100^e et 1/1000^e et deux inhibiteurs au 1/100^e.

Tableau 7 molécules retenues comme possibles activateurs et inhibiteurs de l'opéron *mag* (malgré leur faible effet sur le promoteur)

molécules	Activateurs		Inhibiteurs	
	Tyloxapol	Acide oxolinique	Thimérosal	Chlorexidine
formules				
Type de molécule	Surfactant (1,5 X)	4-quinolone (1,2X)	Antiseptique (1,5x moins)	Désinfectant (1,5x moins)
Dilution de la souche	(1/100 ^e)	(1/1000 ^e)	(1/100 ^e)	(1/100 ^e)

Les chiffres entre parenthèses représentent l'effet d'activation mesuré des molécules par rapport au niveau basal.

- Test dose-réponse

Concernant les molécules affectant l'expression de *pmag-lacZ*, les deux inhibiteurs étaient en fait de forts inhibiteurs de croissance, sans spécificité pour le promoteur. Le fait que ces molécules soient ressorties uniquement pour cette fusion est surprenant puisqu'elles auraient dû affecter l'ensemble des tests, la croissance n'ayant pas été prise en compte. Concernant les activateurs, seul le Tyloxapol a eu un effet très faible sur le promoteur *pmagA* (Figure 42) que je n'ai jamais pu reproduire malgré différents tests réalisés en test ONPG classique (non montré).

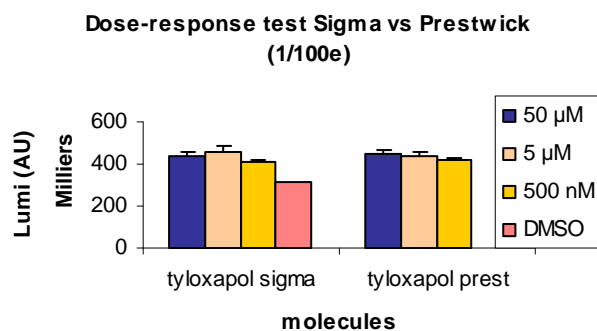


Figure 42 Le Tyloxapol a un faible effet activateur sur *pmagA*. Test dose-réponse (mesure d'activité β -galactosidase) par β -glo de la fusion transcriptionnelle modifiée *pmagA Δ RIII-lacZ* dans la souche PAO1 diluée au 1/100^e en présence de molécules aux concentrations indiquées.

4- Conclusions

A l'issue de ce premier criblage, aucune molécule n'a été obtenue mais nous avons tiré les enseignements suivants :

❖ Problème de reproductibilité

Le criblage comportait trop de cibles, testées en simplicat pour chaque molécule. Le fait de tester une nouvelle fois l'ensemble des promoteurs avec les hits primaires a donné des résultats contradictoires. En effet, de nombreuses molécules ont réagi avec des promoteurs différents entre les cribles primaire et secondaire ou même ont changé d'action en passant d'activateur à inhibiteur sur le promoteur testé. Cette variabilité de réponse m'a contraint à exclure toutes les molécules ne conservant pas la même cible et la même action lors des deux criblages primaire et secondaire. Le score z' n'était peut-être pas assez élevé pour garantir un signal fiable dans ces conditions ou le seuillage était trop faible.

De plus, pour le SST6-1 et la macroglobuline, le fait d'avoir réalisé deux séries de dilution à la main a introduit un biais de reproductibilité de pipetage et de quantité de bactéries transférées.

On ne peut pas non plus exclure la variabilité de solubilité et de biodisponibilité des composés testés dans ce crible.

❖ Problème de seuillage

Le fait d'avoir une activité basale forte pour le SST6-1 et la macroglobuline nous permettait certainement de cribler des inhibiteurs mais nous a amené à retenir de nombreuses touches à peine plus hautes que le contrôle « DMSO » (sans molécules) comme activateurs faibles. A la fin, il s'est avéré que toutes ces molécules proches du seuil n'avaient aucun effet sur le promoteur. La plupart des cribles sélectionne des molécules (inhibitrices ou activatrices) avec un effet 4 fois supérieur à celui de l'activité basale, ce que nous n'avons pas obtenu.

❖ Croissance bactérienne

Nous n'avons pas pris en compte la croissance bactérienne. Ceci n'a pas affecté le test pour le SST3 car nous recherchions des activateurs. Par contre, les gènes *fha1* et *magA* étaient déjà transcrits et les souches présentaient déjà une forte activité basale. La lecture au β -glo ne tient compte que de la luminescence totale et cette activité n'est pas rapportée à la DO. Si la population croît, le signal lumineux croît également et biaise la lecture.

❖ Fluorescence du milieu et des molécules

L'auto-fluorescence du milieu utilisé pour le crible (LB) a certainement empêché de détecter de faibles activations pour le crible du SST3 et surtout de le cribler en parallèle pour des inhibiteurs.

Pour la GFP, la valeur de fluorescence considérée était la valeur finale au bout de 4h de mesure de l'activité. Ceci a également introduit un biais puisque je me suis retrouvé avec des valeurs de fluorescence élevées mais des profils cinétiques anormaux (fluorescence élevée et constante depuis le début, fluorescence décroissante mais toujours au-dessus du seuil de sélection). Il me fallait donc vérifier chaque suivi de fluorescence et ne pas me fier à la valeur finale.

III- Criblage de la banque Infarmatik[®]

Avec nos collaborateurs du CMBA, nous avons décidé de cribler une deuxième chimiothèque : Infarmatik[®]. Cette banque hongroise comporte 728 composés aux structures très variées (conservés à 10 mM dans du DMSO), ce qui pouvait favoriser la découverte de bio-activateurs de mes trois systèmes.

1- Amélioration du crible

Forts de notre expérience du premier criblage, nous avons mis au point un test beaucoup plus robuste pour éviter au maximum les faux-positifs. Nous nous sommes limités au test d'un seul système, le SST3, avec utilisation de la fusion *pexoS-gfp*. Comme nous recherchions des activateurs du SST3 et que nous savions que la voie Gac/Rsm était bloquée dans CHA, nous avons retenu la souche PAO1F pour le crible. Le score z' du test précédant étant mauvais pour cette souche, afin de l'améliorer, la durée du test a été rallongée d'une heure (soit croissance en présence de molécules durant 5 heures). Dans ces conditions et en retranchant la valeur de fluorescence du milieu LB à celles des temps T_0 et T_5 , le score z' était de 0,6 (test réalisable).

Les différences entre les deux cribles sont résumées dans le tableau 8 :

Tableau 8 Changements opérés entre le criblage Prestwick et Infarmatik

Chimiothèques	Prestwick ®	Infarmatik®
Système(s) testé(s)	SST3, SST6 et macroglobuline	SST3
Fusion (s) utilisée(s)	<i>pexoS-gfp</i> , <i>pfha1-lacZ</i> , <i>pmagA-lacZ</i>	<i>pexoS-gfp</i>
Souche (s) utilisée(s)	PAO1(F), CHA,	PAO1F
robotisation	partielle (2 dilutions manuelles)	totale
Reproductibilité	un test/ molécule (1 plaque)	trois tests / molécule (3 plaques)
Prise en compte de la DO_{600}	Non	Oui, normalisation de la valeur de fluorescence par la DO
« Read-out »	Prise directe de la valeur de fluorescence au bout de 4h	Différence de fluorescence ($T_{+5h} - T_0$).

2- Hits primaires et secondaires

Sur les 728 composés de la banque, six ont induit une augmentation de fluorescence au minimum deux fois supérieure au bruit de fond :

- ❖ deux molécules sont ressorties sur les trois plaques
- ❖ deux molécules sont ressorties sur deux des trois plaques
- ❖ deux molécules sont ressorties seulement sur une des trois plaques

J'ai donc sélectionné ces six molécules pour un criblage secondaire en « 5-plicats » sur une plaque. A la suite de cette vérification, je n'ai confirmé que les molécules ayant déjà réagi sur les trois plaques lors du crible primaire : GL-0410 (avec un effet correspondant à deux fois celui de l'induction à l'EGTA) et GL-1395 (avec un effet correspondant à 19% celui de l'EGTA et 1,5 x la valeur du Non Induit) (Figure 43). Ceci nous conforte dans l'idée qu'un test en triplicat est indispensable.

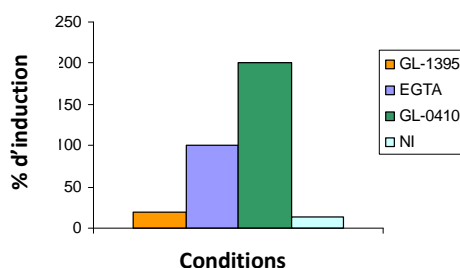


Figure 43 GL-0410 et GL-1395 ont un effet sur PAO1F/*pexoS-gfp*. Conditions induite (Ind) et non induite (NI) du SST3.

J'ai donc réalisé un test dose-réponse en présence des deux molécules : je me suis rendue compte qu'elles n'étaient plus efficaces au-dessous de 50 μ M. Par contre, je les ai également testées sur CHA et bien que présentant une légère auto-fluorescence, j'ai constaté un effet de GL-0410. De plus, les deux molécules à 50 μ M semblaient potentialiser le signal fluorescent de *pexoS-gfp* obtenu en condition induite (Figure 44).

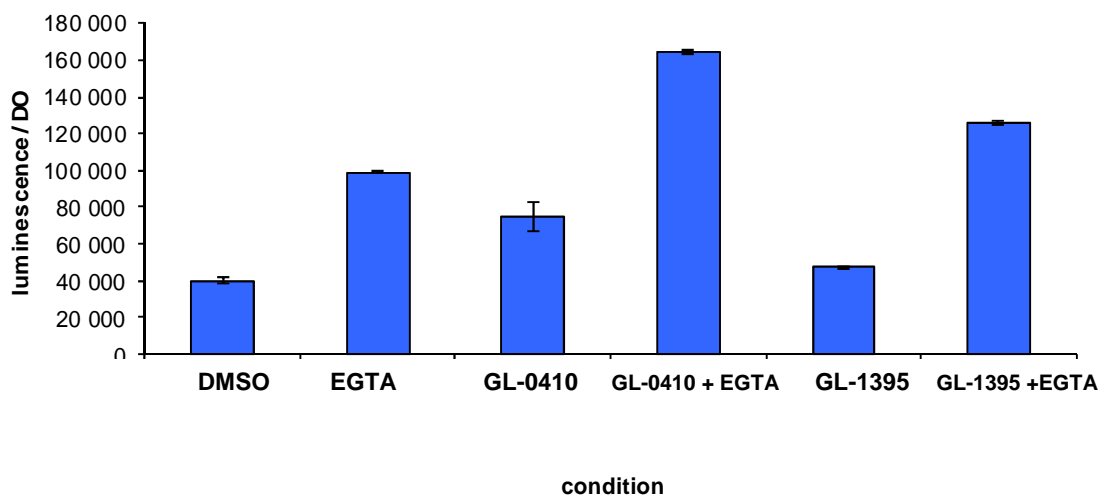
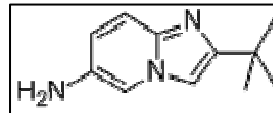


Figure 44 Test des composés GL-0410 et GL-1395 sur la souche CHA. Mesure de fluorescence sur CHA/pIA101*pexoS-gfp*. Contrôle non induit : DMSO, EGTA : induit par ajout de 5mM EGTA et 20mM MgCl₂. Molécules testées à 50μM

3- Caractérisation de GL-0410



Ce composé est une amine portant la formule chimique 2-tert-butyl-imidazo[1,2-a]pyridin-6-ylamine. Comme pour le criblage de la chimiothèque Prestwick, j'ai réalisé différents tests avec plusieurs rapporteurs pour vérifier l'action de GL-0410 sur le promoteur *pexoS*. J'ai confirmé l'effet de la molécule à des concentrations plus élevées (500μM) sur des cultures de PAO1F/*pexoS-gfp* en plaques ou en tubes (non montré). Par contre, je n'ai obtenu aucun effet de la molécule sur les fusions *pexoS-lacZ* et *pexoS-lux*, même à de fortes concentrations (Figure 45A). Il semblerait que cette molécule agisse de nouveau sur la GFP uniquement. J'ai testé l'effet de cette molécule sur le SST3 par western blots et je n'ai remarqué aucune activation du SST3 en présence de GL-0410.

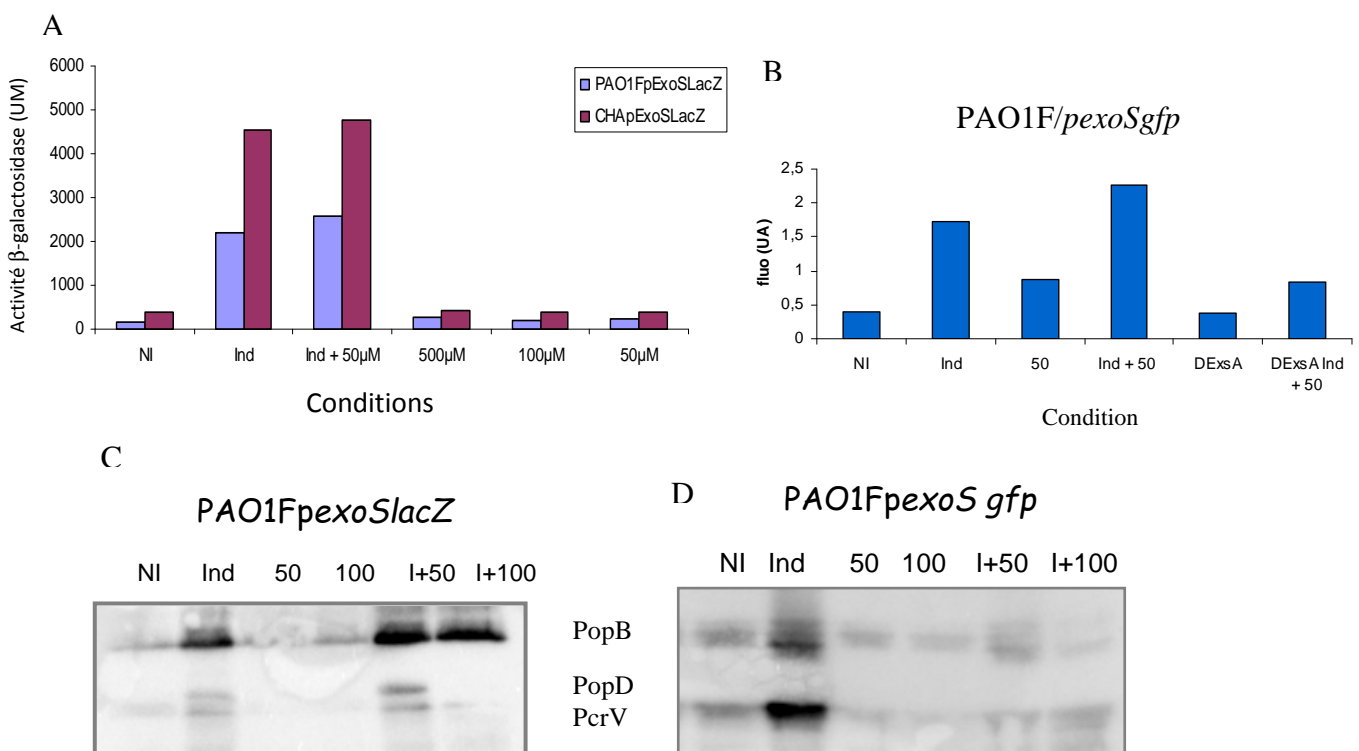


Figure 45 GL-0410 semble agir sur la GFP. Mesure d'activité β -galactosidase (A) et de fluorescence (B) des souches CHA*pexoS-lacZ*, PAO1F*pexoS-lacZ* et PAO1F/*pexoS-gfp* en présence ou non de différentes concentrations de GL-0410 Recherche d'activation du SST3 : Western-blots anti PopB, PopD et PcrV sur les lysats bactériens de souches PAO1F/*pexoS-lacZ* (C) et PAO1F/*pexoS-gfp* (D)
NI : non induit Ind : Induit

Tout comme avec l'isoétharine et le benserazide, j'ai testé la molécule GL-0410 sur un autre promoteur, *pdfx1*, en utilisant la souche PAO1F*pdfx1-gfp* (Figure 46). Nous voyons que cette molécule entraîne une augmentation de la fluorescence: elle agit probablement sur la stabilité ou l'activité de la GFP ce qui expliquerait le fait qu'elle soit ressortie comme hit avec la fusion *pexoS-gfp*.

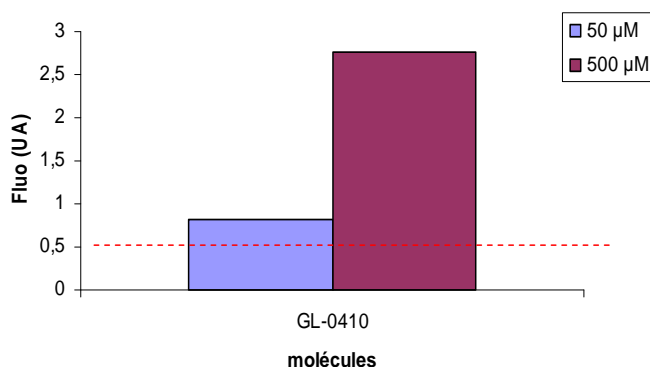
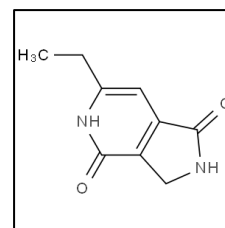


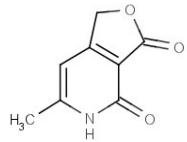
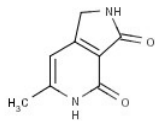
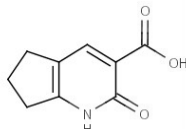
Figure 46 GL-0410 a un effet sur la GFP indépendamment du promoteur testé. Mesure de fluorescence de la souche PAO1F*pdfx1-gfp* (croissance en plaques) avec ou sans le GL-0410 aux concentrations indiquées

4- Caractérisation de GL-1395 et analogues



De formule chimique 6-ethyl-1H,2H,3H,4H,5H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-1,4-dione, le GL-1395 est une cétone ayant un faible effet d'activation sur *pexoS-gfp* (19% de celui produit par une induction à l'EGTA). Son effet étant reproductible bien que faible, après concertation avec le CMBA, nous avons décidé de tester directement ses analogues, espérant ainsi obtenir une molécule plus active. Nous avons donc commandé trois analogues à GL-1395 (Tableau 9) afin de les tester et voir s'ils possédaient un effet activateur plus important.

Tableau 9 Analogues de GL-1395

Noms des molécules	Formules
(5112748) 6-methylfuro [3,4-c]pyridine-3,4(1H, 5H)-dione	
(5112754) 6-methyl-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-3,4(2H,5H)-dione sulphate	
(9195742) 2-oxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b] pyridine-3-carboxylic acid	

Je les ai donc testés en duplicats à cinq concentrations différentes: 500 μM , 50 μM , 5 μM , 500 nM et 50 nM sur CHA et PAO1F contenant la fusion *pexoS-gfp*.

Parmi les trois composés, seul 5112754 a eu un effet sur PAO1F une seule fois à 50 μM . L'effet était de 28% celui de l'induction par EGTA. Par la suite, je l'ai testé à 50 μM sur *pexoS-gfp*, *pexoS-lux* et *pexoS-lacZ* et n'ai observé aucun effet de cette molécule analogue sur les trois rapporteurs (Figure 47). J'ai donc abandonné son étude.

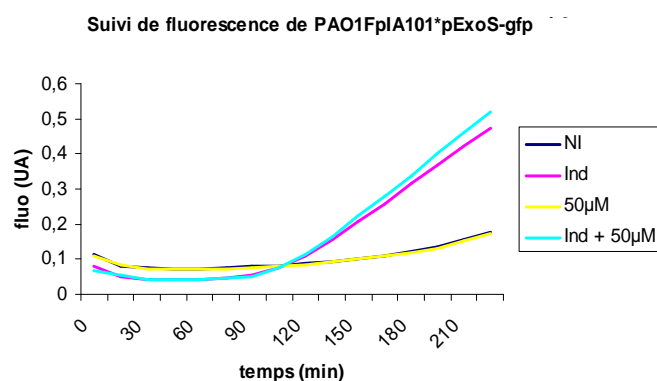


Figure 47 l'analogue 5112754 n'a pas d'effet sur PAO1F/*pexoS-gfp*. Suivi de fluorescence de la souche PAO1F/pIA101*pexoS-gfp* en présence de 50 μM de 5112754. (Ind) : induction du SST3 par EGTA et (NI) non induit

IV- Conclusions générales :

Au terme de ces deux criblages, nous pouvons dire que la simplification mais également le renforcement du test par de nombreux contrôles ont permis de réaliser un deuxième crible très robuste. Les deux molécules de la banque Infarmatik sélectionnées n'étaient pas des faux positifs puisqu'elles jouaient sur la GFP, le produit de mon gène

rapporteur. Cependant, elles n'avaient aucun effet sur mon promoteur d'intérêt (SST3), comme les premières molécules retenues pour Prestwick (benserazide hydrochloride et isoétharine mésylate salt). Ce constat met en relief la forte susceptibilité de la GFP aux différents composés testés.

Le laboratoire dispose donc maintenant d'un test performant et robuste. Il pourra être testé sur des chimiothèques comme la CNE (Chimiothèque Nationale Essentielle, 640 composés) représentante de la diversité des 40000 molécules de la chimiothèque nationale mais aussi sur des banques plus vastes et avec des cibles biologiques (surnageant bactériens, sucres, composants membranaires de cellules eucaryotes ...) pour réaliser une approche plus informée.

En plus de ce test robuste, l'enseignement tiré de ces deux criblages est qu'il faut écarter *lacZ* des rapporteurs (nécessité de dilutions avec le β -glo) et qu'il est très important d'effectuer un criblage avec préférentiellement deux activités mesurées en même temps afin d'éviter les biais dus aux effets sur les rapporteurs : la meilleure des combinaisons pour le SST3 au vu de mes deux criblages, est l'utilisation en LB d'une souche à la fois *pexoS-lux* et *pexoS-gfp*. Cette souche a été réalisée au laboratoire. Grâce à une vérification d'activation simultanée des deux rapporteurs, nous pourrions sélectionner les molécules agissant sur le promoteur et non juste le rapporteur.

Mutagenèse aléatoire

I- Mutagenèse aléatoire

Dans le but de manipuler génétiquement le génome bactérien, les chercheurs ont très vite détourné à leur avantage les phages, plasmides et transposons naturels de ces bactéries. Ainsi, des plasmides ont été manipulés afin de pouvoir les intégrer dans le chromosome bactérien en utilisant des propriétés de phages : un plasmide contenant un site *attP* d'attachement d'un phage va pouvoir s'intégrer au site *attB* d'attachement situé dans le chromosome bactérien en présence de l'intégrase spécifique du phage. Les transposons permettent aussi la manipulation génétique. La plupart s'insère de manière aléatoire mais certains ont un site d'insertion spécifique comme le transposon Tn7, dont le site *attTn7* est localisé en aval du gène *glmS* dans le chromosome de *P. aeruginosa* (Choi *et al.*, 2005).

La famille des transposons « mariner » a été découverte chez *Drosophila mauritiana*. Ces transposons sont composés d'une séquence ADN de 1300pb contenant des séquences terminales répétées inversées de 30pb. Ils ont la propriété de s'insérer de manière aléatoire dans le génome (Robertson and Lampe. 1995) et disposent d'un promoteur fort (*ptac*) qui peut induire la transcription des gènes situés en aval du site d'insertion. Si ces gènes se trouvent être des activateurs ou des inhibiteurs du système étudié, leur action sera alors mise à jour et il sera possible de les identifier. Après transposition aléatoire (un seul événement d'intégration par clone), une banque de mutants est établie puis criblée, et les mutants jugés pertinents sont caractérisés. Pour cela, il suffit d'avoir un test visuel ou suffisamment discriminant pour sélectionner les mutants intéressants. Ce test se fait soit par recherche de phénotypes, soit par mesure de l'activité d'un gène rapporteur. Les transposons « mariner » ne nécessitant aucun facteur spécifique à leur hôte, ils ont été utilisés pour la création de banque de mutants aussi bien eucaryotes que procaryotes (Hayes. 2003).

Cette technique de mutagenèse aléatoire utilisant des transposons mariner a permis la découverte de nouveaux acteurs dans la virulence des bactéries ou dans l'interaction hôte-pathogène. Ainsi, l'un des premiers à avoir réalisé cette démarche chez *P. aeruginosa* en utilisant le transposon *Tn5B22* est George A. O'Toole: il a observé et retenu des mutants de sa banque déficients pour la formation de biofilm en plaque 96 puits (O'Toole *et al.*, 1999). Dans le cas où est étudié l'impact des mutations sur un gène précis, l'expression de ce dernier est suivie à l'aide d'une fusion avec un gène rapporteur. Ainsi, le système à deux composants PprAB influant sur la formation des fimbriae a été mis à jour grâce à une mutagenèse

aléatoire dans une souche exprimant la fusion *pcupE-lacZ* (Giraud *et al.*, 2011). Le plasmide suicide pBT20 contenant le transposon mariner « Himar1 C9 » utilisé pour cette étude est le même dont je me suis servie pour réaliser ma banque de mutants.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai cherché à identifier de nouveaux éléments régulant l'expression du SST3. Pour cela, j'ai mis en œuvre une mutagenèse aléatoire, après avoir appris la technique auprès de nos collaborateurs marseillais et plus particulièrement Christophe Bordi, afin de découvrir des régulateurs dont les gènes étaient interrompus ou leur expression induite par l'insertion des transposons.

1- Le transposon « mariner »

J'ai réalisé une banque de mutants par transposition à l'aide du transposon « mariner » C9 porté par le plasmide suicide pBT20 (Figure 48). Ce plasmide est mobilisable et peut être transféré dans *P. aeruginosa* par conjugaison tri-parentale en présence d'un plasmide helper. Une fois dans la bactérie, seul le transposon s'intègre dans le chromosome et les clones sont sélectionnés sur la base de leur résistance acquise à la gentamycine.

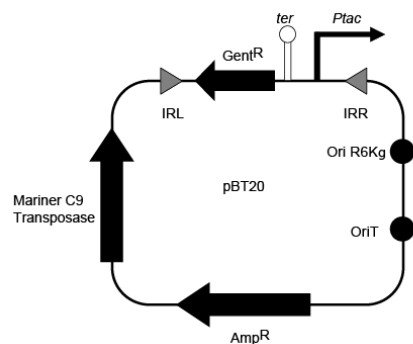


Figure 48 Représentation schématique de pBT20, le vecteur du transposon « mariner » C9. IRR et IRL : répétitions inversées nécessaires à la transposition (taille de l'insertion : 1783 pb), Gent^R : gène *aaCI* confère une résistance à la gentamycine pour la sélection des clones transformés, transposase C9 : code pour la transposase, permettant la recombinaison, *Ptac* : promoteur fort, *ter* : arrêt de transcription.

2- Choix des souches

Afin de voir si je pouvais discriminer l'activité de la fusion *pexoS-lacZ* sur boîte en condition induites ou non induites du SST3, j'ai testé différentes souches de *P. aeruginosa* contenant la fusion intégrée dans le chromosome. Pour cela, je les ai étalées sur boîte LB-X-Gal ou LB-X-Gal + EGTA/MgCl₂ (déplétion de Ca²⁺), afin de visualiser l'activité de la β-galactosidase : en effet, le X-gal est un substrat de l'enzyme, qui une fois clivé, forme un

composé coloré. La distinction entre les clones blancs et bleus constitue le premier criblage. Les souches testées ont donné les résultats suivants :

- la souche CHA n'était pas idéale à cause de la mucoïdie car il fallait attendre très longtemps avant de voir apparaître la coloration des colonies.
- la souche PAO1F, non mucoïde, permettait ce criblage blanc-bleu (Figure 49). Elle a donc été retenue pour la banque de mutants.

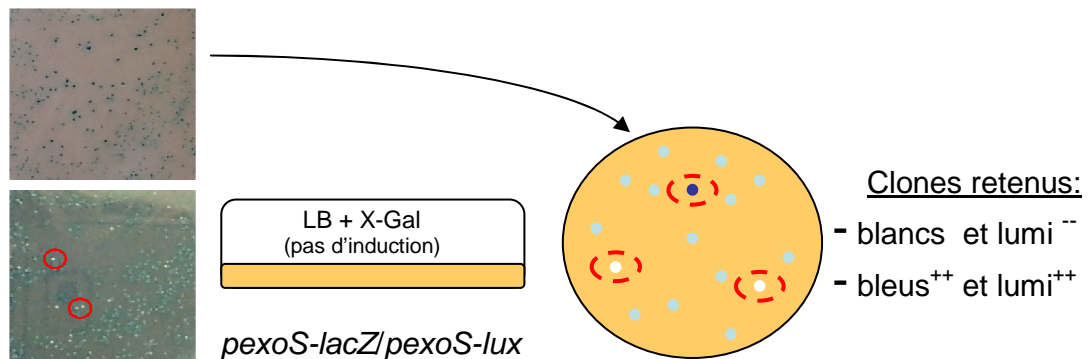


Figure 49 PAO1F convient pour le criblage blanc/bleu. Photos représentatives de la comparaison de couleur des colonies PAO1F et PAO1F*pexoS-lacZ* sur LB+ X-gal + EGTA/MgCl₂ (même région de la boîte observée sur les 2 photos). Des colonies blanches sont encerclées en rouge. Représentation schématique du principe du criblage de la banque de mutants qui a été étalée sur des boîtes LB + X-gal pour distinguer les clones de couleurs différentes.

En plus de l'activité β -galactosidase, un deuxième gène rapporteur a été intégré dans le chromosome pour éviter la sélection de faux positifs (insertion du transposon soit en amont, soit au sein du gène *lacZ*) : il s'agit de *lux*. Ainsi, j'ai réalisé une souche PAO1F contenant les fusions *pexoS-lacZ/pexoS-lux* pour générer la banque de mutants. Grâce au deuxième gène rapporteur, une mesure de luminescence est effectuée en plaque sur les clones sélectionnés pour confirmer ou infirmer l'effet de la mutation. Si la mutation a bien un impact sur le promoteur *pexoS*, il doit être observé avec les deux rapporteurs. Le cas échéant, l'insertion s'est faite dans *lacZ* (clone blanc) ou devant son promoteur conduisant à sa surexpression (clone bleu foncé).

3- Mise en œuvre

Des mutagénèses ayant déjà été réalisées dans les conditions d'induction du SST3 en présence d'EGTA (Wu *et al.*, 2004), j'ai souhaité rechercher des éléments activateurs du SST3 en absence d'EGTA, c'est à dire en conditions non induites du SST3. Cependant, lors

de la mise au point du criblage sur boîte, je me suis rendue compte que la fuite du promoteur *pexoS* était suffisante pour induire une synthèse et une activité β -galactosidase et colorer les clones. L'addition dans le milieu de calcium (inhibition du SST3), n'a pas permis de diminuer l'expression du gène rapporteur. J'ai donc décidé de sélectionner à la fois les clones bleu foncé (activité β -galactosidase renforcée) ou blancs (activité nulle).

Après conjugaison triparentale, j'ai étalé ma banque de mutants sur 72 boîtes de 135 mm de diamètre sur milieu sélectif contenant de la gentamycine et obtenu environ 150 à 200 clones/boîte. Cela équivaut à environ 14000 clones criblés, ce chiffre reflétant le nombre d'évènements de transpositions survenus. Le génome de PAO1 étant de 6 264 404 pb, ceci correspond à une insertion du transposon tous les 440-450 pb ; l'ensemble du génome était assez bien couvert mais une couverture optimale aurait été de l'ordre d'une insertion tous les 40-45 pb.

J'ai pu sélectionner 179 clones (dont 9 bleu foncé) que j'ai testés pour leur activité *pexoS-lux* en conditions non induite et induite du SST3.

Je n'ai pu confirmer les clones bleu foncé, car ils avaient une activité β -galactosidase *pexoS-lacZ* équivalente à celle de la souche contrôle. Par contre j'ai pu identifier 4 clones intéressants présentant une baisse importante d'activité des 2 rapporteurs *lacZ* et *lux* dans les deux conditions (non montré). Il s'agit des clones « A », « 25 », « W* » et « i ».

4- Perspectives : caractérisation des clones

Maintenant, il reste à localiser la zone d'insertion du transposon au niveau des 4 clones A, W, 25 et i. Pour cela la technique de « PCR semi-arbitraire », devra être employée (O'Toole *et al.*, 1999). Le principe en est le suivant : à l'aide d'un couple d'amorces dont une est dégénérée (Tpn P1 et ARB1, Figure 50), une première PCR est réalisée dans des conditions de température très permissives afin d'amplifier un pool de séquences de tailles diverses. La deuxième PCR utilise les amorces Tpn P2 et ARB2 dont la séquence correspond à une partie d'ARB1 et sert à amplifier de manière plus spécifique une séquence à proximité du transposon (Figure 50).

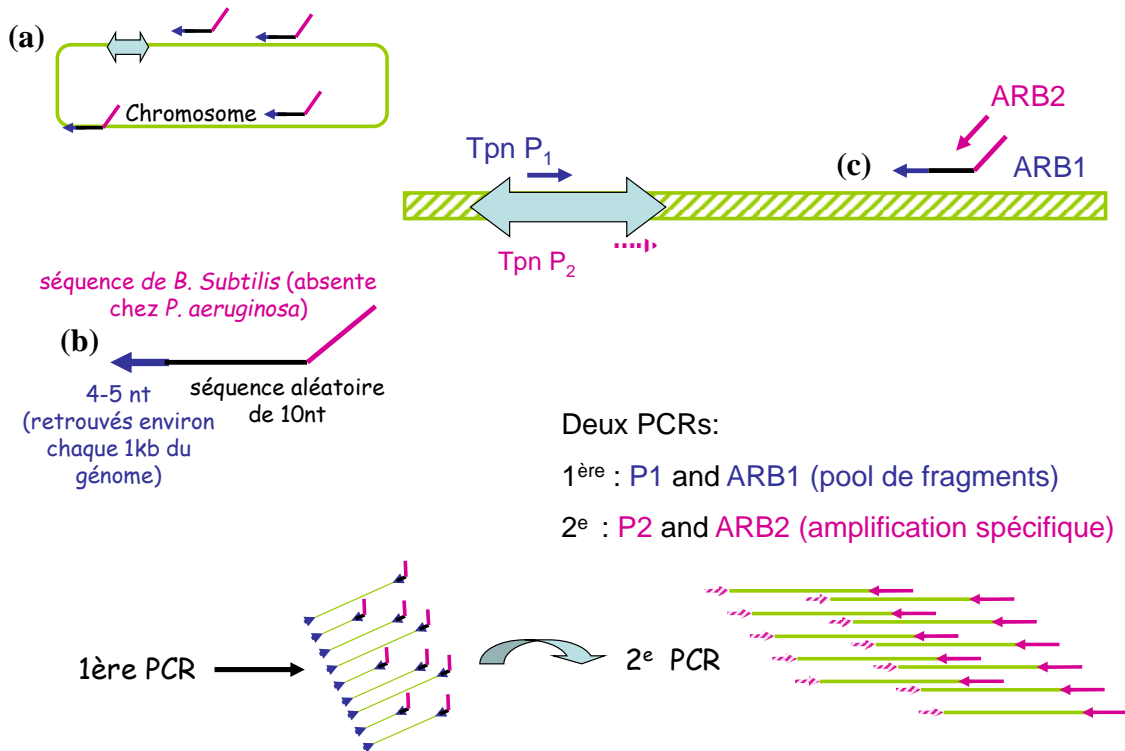


Figure 50 Principe de la PCR semi-arbitraire. (a) Un transposon (symbolisé par une double flèche bleue) s'est inséré dans le chromosome de la bactérie. (b) L'amorce ARB1 a une structure particulière puisqu'elle possède une séquence de 4-5nt retrouvée environ chaque 1 kb du génome, une séquence aléatoire et une séquence spécifique de *B. subtilis*. Grâce à cette séquence répétée tous les kb, cette amorce va pouvoir se fixer un peu partout sur le génome, y compris à proximité du transposon (c). Avec le deuxième jeu d'amorces, une amplification spécifique est réalisée puisque l'amorce ARB2 correspond à la séquence de *B. subtilis*.

Il faudra ensuite caractériser le phénotype des 4 mutants et puis vérifier si l'insertion a un effet pleiotrope ou non. Si leur effet est confirmé, il faudrait surexprimer ou déléter ces gènes pour voir si en conditions non induites, une activation du SST3 est observée.

Maintenant que nous avons mis en place avec succès au laboratoire la technique de mutagenèse aléatoire, nous pouvons envisager de cribler de nouvelles banques dans des conditions de culture différentes ou de réaliser des banques dans d'autres souches.

Etude de la régulation d'un isolat clinique : La souche CHA

I- Etude de la régulation d'un isolat clinique : la souche CHA

Alors que l'on est loin de comprendre l'ensemble des mécanismes gouvernant la régulation des facteurs de virulence de la souche référence PAO1, il est apparu qu'il existe des différences de régulation au sein des isolats cliniques. En effet, la plupart des souches se sont adaptées à leur environnement grâce à des mutations ou par acquisition de gènes par transfert horizontal, entraînant des différences dans leur virulence et leur régulation. Ces souches ont pour caractéristique une taille de génome plus importante que celle de PAO1 (6,2 Mb, Wiehlmann *et al.*, 2007)). Ainsi, la souche PA7, isolée en Argentine pour sa résistance très marquée aux antibiotiques, possède un génome de 6,6 Mb qui comporte 51 régions de plasticité génomique codant en partie pour de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques (Roy *et al.*, 2010).

Les souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose (CF) subissent un long processus appelé « adaptation CF » durant les mois ou années que dure l'installation de la chronicité (Hogardt and Heesemann. 2010). Cette reprogrammation de la bactérie est une réponse aux conditions environnementales stressantes rencontrées dans les poumons CF (présence de ROS, d'antibiotiques, milieu anaérobie...). Ainsi, dans les poumons CF sont retrouvés une variété de clones présentant différents phénotypes :

- mucoïde (surproduction d'alginate) : la mucoïdie est un mécanisme de protection de la bactérie contre les différents stress environnants (ROS, limitation en oxygène et nutriments, antibiotiques, forte osmolarité et déshydratation) (Mathee *et al.*, 1999; Bragonzi *et al.*, 2005)
- sessile (perte du flagelle et des pili de type IV), devenant résistant à la phagocytose
- expression diminuée des facteurs de virulence aiguë (SST3, SST2, élastase, pyoverdine) au profit de l'activation du SST6-1
- émergence de « Small Colony Variant » ou SCV; ces variants sont caractérisés par des colonies de taille réduite sur boîte, une résistance aux antibiotiques accrue et la capacité à former des hyper-biofilms. Ils forment donc une sous-population du biofilm extrêmement persistante qui peut « réverter » sans la pression des antibiotiques.

- forte résistance aux antibiotiques due à des modifications des porines et à la surproduction des pompes à efflux.

Cette diversité bactérienne au sein des poumons CF provient de l'accumulation de mutations, qui touchent notamment des facteurs de régulation de la virulence (Smith *et al.*, 2006). Ainsi, une mutation dans le gène *mucA* est majoritairement responsable de la sur-expression des alginate (voir plus loin). Les mutations dans le gène *rpoN*, requis pour l'assemblage du flagelle, sont majoritairement responsables de la perte du flagelle (Kresse *et al.*, 2003). Le QS est lui aussi affecté par des mutations dans le gène codant pour le régulateur LasR, ce qui conduit à l'absence d'activation de son propre régulon mais également de ceux de RhlR et de PqsR du fait de l'organisation hiérarchique des trois systèmes : ceci conduit à la diminution de l'activité du SST2 et de la production de pyoverdine et d'élastase (Hogardt *et al.*, 2007). Des études ont montré également que des mutants *rhlR* provoquaient des infections aiguës avec une fréquence diminuée de moitié par rapport à la souche sauvage et favoriseraient donc les infections chroniques (Silo-Suh *et al.*, 2002). Des mutations dans le gène *exsA* ont été retrouvées : elles entraînent la perte de la cytotoxicité SST3-dépendante des souches (Smith *et al.*, 2006).

En résumé, au début de la colonisation des poumons CF, la souche bactérienne est mobile et présente un caractère virulent, et pendant l'adaptation CF, elle opère une transition: elle devient immobile et affiche des traits de virulence chronique (Figure 51).

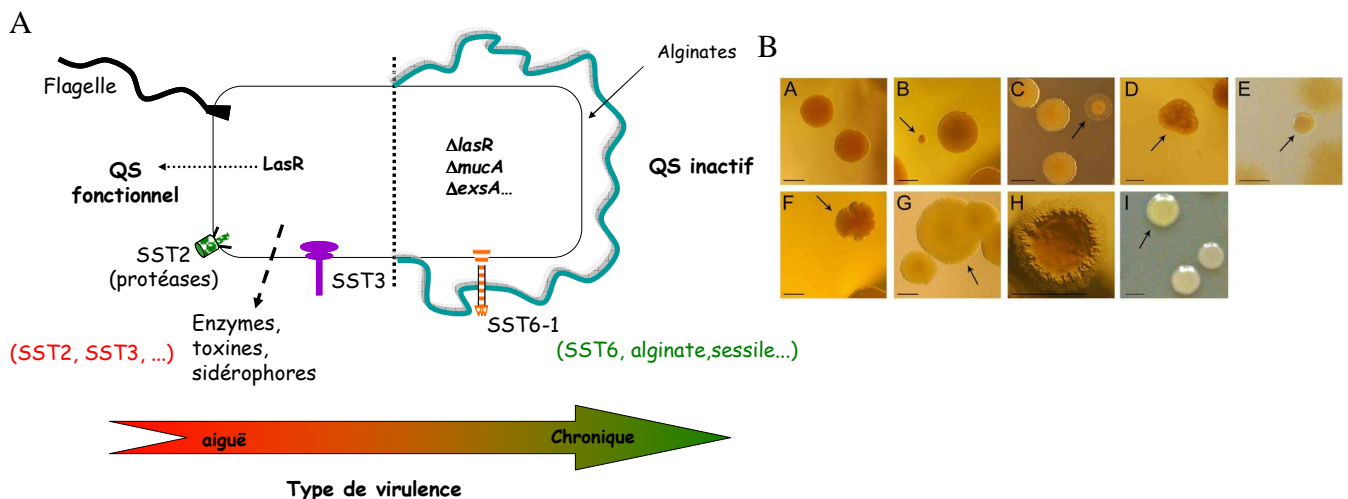


Figure 51 Différentes manifestations de l'adaptation CF A/ le passage d'un phénotype virulent à un phénotype chronique d'après Hogardt *et al.*, 2010 B/ différents mutants rencontrés dans les poumons CF étalés sur LB, A : phénotype normal, B : petit, C : translucide, D : « ridé », E : mucoïde, F : ondulé, G : large, H : filiforme , I : hyper-pigmenté (Lujan *et al.*, 2011).

La capacité de *P. aeruginosa* à présenter des phénotypes très variés est un véritable atout pour la persistance de la bactérie dans les poumons, chaque sous-groupe de bactéries

réagissant différemment aux traitements antibiotiques. Cette variété est renforcée par les phénotypes hypermutateurs. En effet, dans le cas des souches CF, différents phénotypes sont rencontrés dus à différentes mutations causées entre autre par un gène *mutS* défectueux : SCV, translucides, « ridés », mucoïdes, ondulés, larges, filiformes, hyper-pigmentés (Figure 51) (Lujan *et al.*, 2011).

1- La souche CHA

La souche CHA a été isolée au CHU de Grenoble chez un patient atteint d'une mucoviscidose sévère accompagnée d'une infection chronique à *P. aeruginosa* (Toussaint *et al.*, 1993). Lors du prélèvement, ce patient souffrait d'une maladie pulmonaire à un stade avancé qui a fini par le tuer. Cette souche de sérotype O6 appartient au clone J, un des groupes clonaux communs disséminé dans le monde entier (Wiehlmann *et al.*, 2007).

En collaboration avec l'équipe du Dr Sophie de Bentzmann (IMM, Marseille), le génome de CHA a été séquencé par la technique « Illumina Genome Analyser » et annoté par Genostar (Montbonnot, Isère). Ce travail a été réalisé en parallèle par l'équipe de Pr Burkhard Tümmler (Bezuidt *et al.*, 2013). Ce génome de 6 484 650 pb contient 5900 gènes, 14 îlots de pathogénicité. Elle présente 179 CDS spécifiques à CHA, qui ne sont retrouvés ni dans PAO1, ni dans PA7, ni dans PA14 et LESB58. Cependant, CHA partage de nombreux îlots génomiques avec LESB58 ; elle a également incorporé un gène *aaCI* lui conférant une résistance contre les aminoglycosides.

CHA possède une des caractéristiques majeures des souches CF : la mucoïdie (Delic-Attree *et al.*, 1996). Dans la majorité des cas, ce phénotype mucoïde résulte d'une mutation dans le gène *muca*. MucA est un facteur anti-sigma chargé de séquestrer le facteur sigma alternatif σ^{22} , appelé aussi AlgU. Ce facteur ECF (ExtraCytoplasmic Function) régule positivement la synthèse des alginates. Grâce au séquençage du génome de CHA, une mutation dans *muca* a été identifiée, entraînant le remplacement du résidu alanine 5 par une glycine dans la protéine MucA. Nous avons montré que la mucoïdie est bien liée à cette mutation car l'introduction dans CHA d'une copie du gène *muca* de PAO1 restaure un phénotype non mucoïde (Figure 52).

Toutefois, la souche CHA est très étudiée pour un trait de virulence qui n'est pas généralement associé à des souches CF : un SST3 fortement actif (Fito-Boncompte *et al.*, 2011 ; Ader *et al.*, 2005 ; Dacheux *et al.*, 1999).

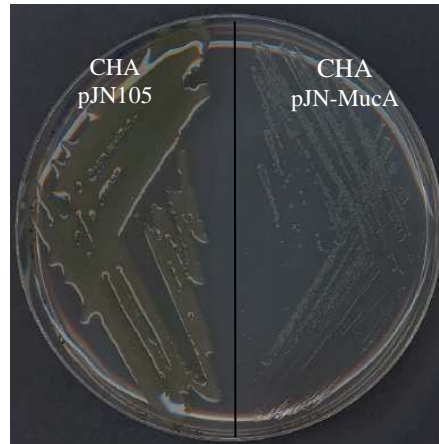


Figure 52 La mutation dans *mucA* conduisant à la protéine MucA_{A5G} est responsable du phénotype mucoïde de CHA. Complémentation de CHA par une copie du gène *mucA* sauvage de PAO1, placé sous contrôle du promoteur *pBAD* du plasmide pJN105. Visualisation sur boîte PIA contenant 0,2% arabinose du phénotype mucoïde de la souche sauvage CHA/pJN105 et de l'absence de mucoïdie de CHA/pJN-MucA.

2- CHA : un isolat CF dépourvu de SST6-1

La présence de nombreuses espèces bactériennes dans les poumons CF implique une compétition sérieuse entre elles et donc l'activation du SST6-1 (Rao *et al.*, 2011). Au laboratoire, nous disposons d'isolats cliniques de différentes origines, dont des souches CF comme CHA que nous avons testé pour leur expression du SST6-1. Pour cela, nous avons cherché dans les lysats bactériens la présence de la protéine Hcp1 qui forme le canal sécréteur du SST6-1 (cf Introduction). Sur le western blot anti-Hcp1 présenté Figure 53, nous remarquons que les différentes souches produisent des quantités variables de Hcp1, LES400 et KK1 étant celles qui en contiennent le plus. De façon surprenante, Hcp1 est indétectable seulement dans une seule souche, la souche CHA.

CHA est donc une souche clinique CF possédant un SST3 très actif mais pas de SST6-1 fonctionnel.

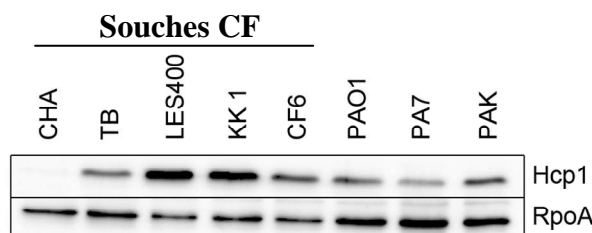


Figure 53 La souche CHA ne synthétise pas Hcp1. Western blot anti Hcp1 et anti-RpoA réalisé sur des lysats bactériens. RpoA : protéine cytoplasmique témoin de charge

L'absence de Hcp1 dans CHA n'est pas due à une absence de son gène, car grâce au séquençage du génome, nous savions que le locus HSI-1 comportant l'ensemble des gènes du SST6-1 était bien présent dans le chromosome de la souche. Nous avons donc voulu savoir si cette absence de synthèse résultait d'un défaut de transcription des gènes ou d'un défaut de la régulation post-transcriptionnelle connue pour contrôler négativement le SST6-1 ((Brencic and Lory. 2009), partie transition vie planctonique/ vie communautaire de l'introduction).

J'ai tout d'abord contrôlé dans CHA l'activité transcriptionnelle du promoteur de *fhaI*, un des gènes du locus HSI-I. J'ai mesuré l'activité β -galactosidase de la souche contenant, insérée dans son chromosome, la fusion transcriptionnelle *pfhaI-lacZ* et je l'ai comparé à celle de la souche de référence PAO1 contenant la même fusion. La Figure 54 montre que *pfhaI* est bien exprimé dans CHA, même si c'est à un niveau plus faible que dans PAO1. Par contre, il n'y a pas de traduction de *fhaI* dans CHA, puisque l'activité d'une fusion traductionnelle *pfhaI-lacZ* est nulle dans la bactérie, comparée à celle observée dans PAO1 (Figure 54).

Ces résultats indiquent que l'absence de SST6-1 dans CHA était probablement due à un défaut dans la régulation post-transcriptionnelle.

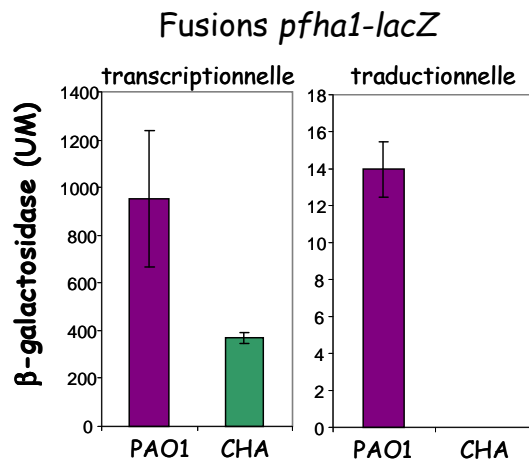


Figure 54 Défaut de traduction du SST6-1 dans CHA. Les histogrammes représentent la mesure d'activité β -galactosidase des fusions transcriptionnelle et traductionnelle *pfhaI-lacZ* insérées dans le chromosome des souches CHA et PAO1. La mesure a été réalisée à une DO de 1,5, en triplicat.

3- Forte répression du SST6-1 par RsmA

La régulation post-transcriptionnelle s'exerçant sur le HSI-1 fait intervenir deux petits ARNs régulateurs, RsmY et RsmZ, dont le rôle est de séquestrer la protéine RsmA qui régule

négativement ses ARNm-cibles (voir partie ARNs régulateurs de l'introduction). J'ai donc mesuré le niveau d'expression de ces petits ARNs dans CHA au moyen de fusions transcriptionnelles et pu observer qu'il était quasiment nul comparé à celui de PAO1 (Figure 55) : il y a donc un défaut de synthèse des petits ARNs régulateurs dans la souche CHA.

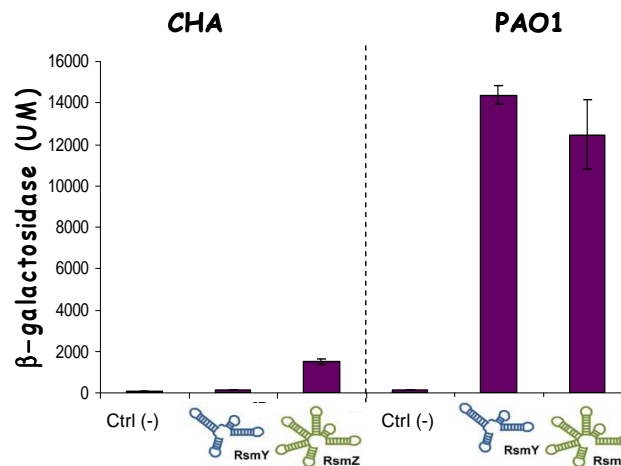


Figure 55 Défaut d'expression des petits ARNs dans CHA. Mesure d'activité transcriptionnelle des gènes des petits ARNs dans les souches CHA et PAO1 transformées avec le plasmide vide pMP220 (contrôle négatif) et les plasmides contenant les fusions transcriptionnelles *prsmY-lacZ* (RsmY) et *prsmZ-lacZ* (RsmZ).

La faible synthèse des petits ARNs doit s'accompagner d'une surabondance de RsmA libre, et par voie de conséquence, une sur-répression de ses cibles : ceci pourrait expliquer l'absence de traduction des protéines du SST6-1.

Afin de valider cette hypothèse, j'ai donc construit un mutant $CHA\Delta rsmA$ et analysé la synthèse de Hcp1 par western blot. L'absence de RsmA entraîne bien une augmentation de la synthèse et même de la sécrétion de Hcp1 dans la souche CHA mutante (**Figure 56A**). Ce phénotype résulte bien de l'absence de RsmA car le mutant $CHA\Delta rsmA$ est complétement par une copie de *rsmA* sauvage portée sur un plasmide. En parallèle, j'ai vérifié l'impact de la mutation sur l'activité du SST3 et observé que $CHA\Delta rsmA$ ne synthétise ni ne sécrète plus aucune protéine du SST3 (**Figure 56B**). La mutation du gène *rsmA* dans CHA inverse complètement l'expression du SST3 et du SST6-1 de la souche.

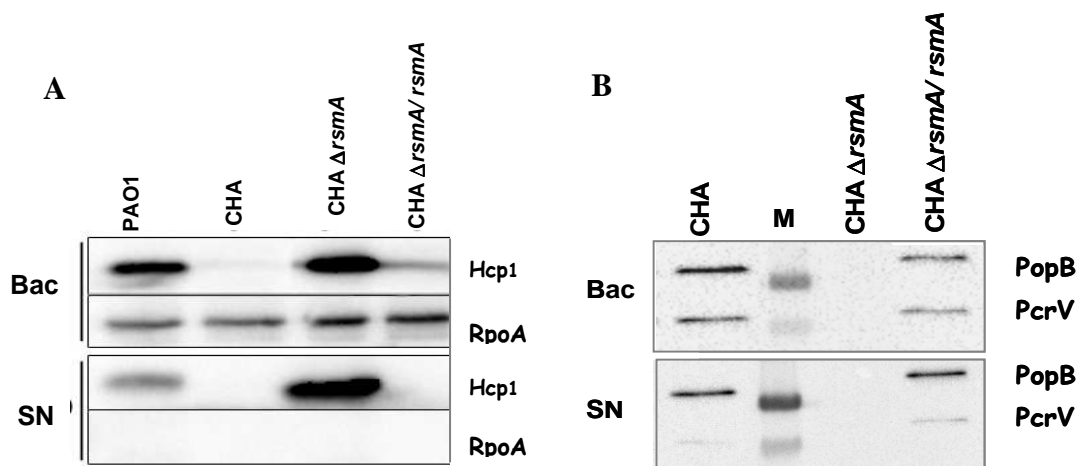


Figure 56 Inversion d'expression du SST6-1 et du SST3 dans un mutant CHA $\Delta rsmA$. A/Activité du SST6-1, mesurée par synthèse et sécrétion de Hcp1. Western blot anti-Hcp1 et anti-RpoA réalisés sur des lysats (Bac) ou des surnageants bactériens (SN) des souches indiquées. RpoA : témoin de charge. B/Activité du SST3. Western blots anti-PopB et anti-PcrV réalisés sur des lysats (Bac) ou des surnageants bactériens (SN) des souches indiquées en conditions d'activation du SST3 (déplétion de Ca²⁺). M : marqueurs de poids moléculaire

4- Des masters régulateurs sans effets sur la voie Gac/Rsm

La balance entre facteurs de virulence aiguë et chronique est principalement régie par les deux régulateurs globaux RetS et LadS qui contrôlent de manière opposée la voie Gac/Rsm (voir parties RetS et LadS de l'introduction). Ainsi, une délétion de *retS* ou une surexpression de *ladS* conduit à une augmentation de la sécrétion de Hcp1 (Goodman *et al.*, 2004 ; Ventre *et al.*, 2006). J'ai donc cherché à modifier l'expression du SST6-1 dans CHA en impactant l'un de ces deux master-gènes. Alors que nous observons clairement dans la souche PAO1 l'effet attendu de la délétion de *retS* et de la surexpression de *ladS* sur la sécrétion de Hcp1, aucun effet n'est visible dans la souche CHA : l'expression du SST6-1 n'est pas rétabli (**Figure 57**). Ces deux régulateurs ne sont donc pas responsables de l'absence de RsmY et RsmZ dans CHA.

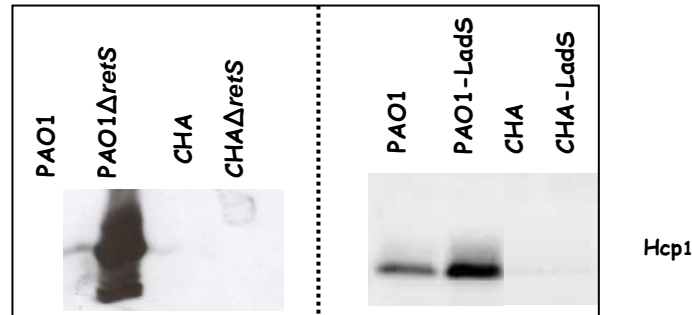
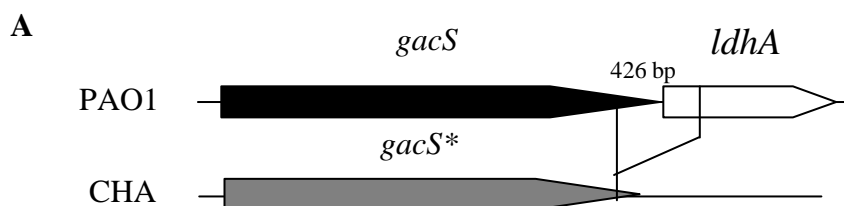


Figure 57 RetS et LadS n'ont pas d'effet sur l'expression du SST6-1 de CHA. Western blots anti-Hcp1 réalisés sur des surnageants bactériens des souches indiquées. Pour la surproduction de LadS, les souches CHA et PAO1 ont été transformées soit avec le plasmide vide pBBR-MCS4 soit avec pBBR-ladS qui porte *ladS* sous le contrôle d'un promoteur *plac*.

5- Délétion dans le gène *gacS*

Il existait donc dans CHA un défaut dans la cascade de régulation post-transcriptionnelle qui devait se situer en aval de RetS et LadS et en amont de RsmY et RsmZ, c'est-à-dire au niveau du système à deux-composants GacS/GacA. C'est l'analyse du génome de la souche CHA qui nous a permis d'expliquer ce blocage de la cascade de régulation. En effet, la souche présente une délétion chromosomique de 426 pb modifiant l'extrémité 3' de *gacS* et l'extrémité 5' du gène *ldhA* localisé en aval. Cette délétion affecte donc non seulement l'extrémité C-terminale de la protéine GacS (que nous appellerons GacS*) mais compromet aussi l'expression du gène *ldhA* codant pour la lactate déshydrogénase NADH-dépendante (**Figure 58A**).

Du point de vue structural, la protéine putative GacS* de CHA présente une modification de son dernier domaine, le domaine Hpt, qui est chargé du transfert du phosphate au régulateur de réponse GacA (**Figure 58-B**). Or, l'unique rôle connu de GacA phosphorylé est d'activer la transcription des petits ARNs RsmY et RsmZ, régulant ainsi le taux de RsmA libre dans la bactérie (Brencic *et al.*, 2009). Si la mutation de *gacS* entraîne un défaut d'activation de GacA, cela pouvait expliquer le défaut d'expression des petits ARNs.



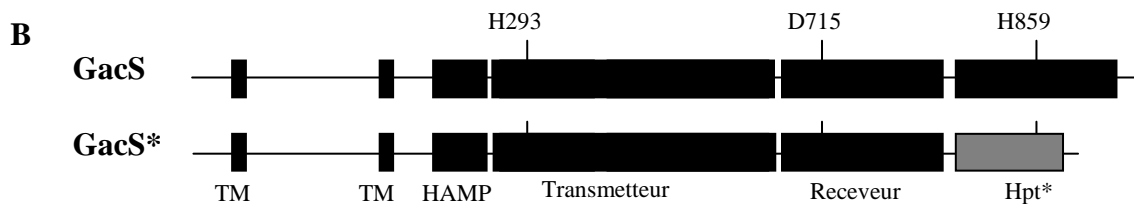


Figure 58 Une délétion de 426pb dans le génome de CHA affecte *gacS*. A/ Représentation schématique de la délétion au niveau du gène *gacS** de CHA. B/ Comparaison des différents domaines constituant les protéines GacS (925aa) de PAO1 et GacS* (896aa) de CHA

6- Rétablissement de la voie Gac/Rsm

Afin de confirmer l'impact de cette délétion chromosomique sur l'expression des facteurs de virulence de CHA, j'ai amplifié le gène *gacS* de PAO1 et je l'ai cloné sous le contrôle du promoteur *pBAD* porté par un plasmide que j'ai introduit dans CHA. J'ai ensuite mesuré l'effet de ce gène sur l'expression des petits ARNs au moyen de fusions transcriptionnelles. Sur la Figure 59, nous observons que le gène *gacS* de PAO1 rétablit l'expression de RsmY et RsmZ dans CHA à des niveaux comparables à ceux mesurés dans la souche référence PAO1.

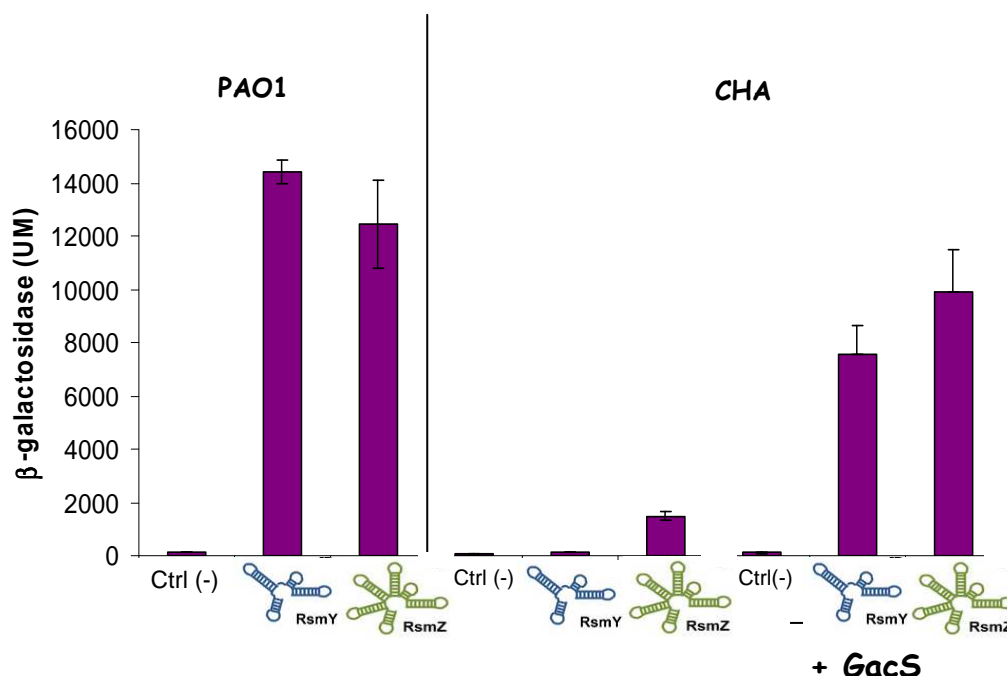


Figure 59 La complémentation par *gacS* de PAO1 rétablit l'expression des petits ARNs RsmY et RsmZ dans CHA. Mesure de l'activité β -galactosidase des souches PAO1, CHA et CHA transformée avec le plasmide pJN-*gacS* (+*GacS*). Les trois souches contiennent le plasmide vide pMP220 (contrôle négatif) ou des plasmides pMP220 portant les fusions transcriptionnelles *prsmY-lacZ* (RsmY) et *prsmZ-lacZ* (RsmZ).

La complémentation est confirmée par le rétablissement dans CHA/pJNgacS de la production de la protéine Hcp1 et la baisse de production des protéines du SST3 (Figure 60). De plus, la cascade de régulation est de nouveau connectée aux master-gènes puisqu'une délétion de *retS* dans une souche complétement CHA/pJNgacS a maintenant un impact sur la sécrétion des facteurs de virulence, comme nous l'observons dans PAO1 (Figure 60).

La délétion dans le gène *gacS* de la souche CHA est bien responsable de la surabondance (ou absence de titration) de RsmA libre dans la bactérie, ce qui entraîne une forte répression du SST6-1 et une suractivation du SST3.

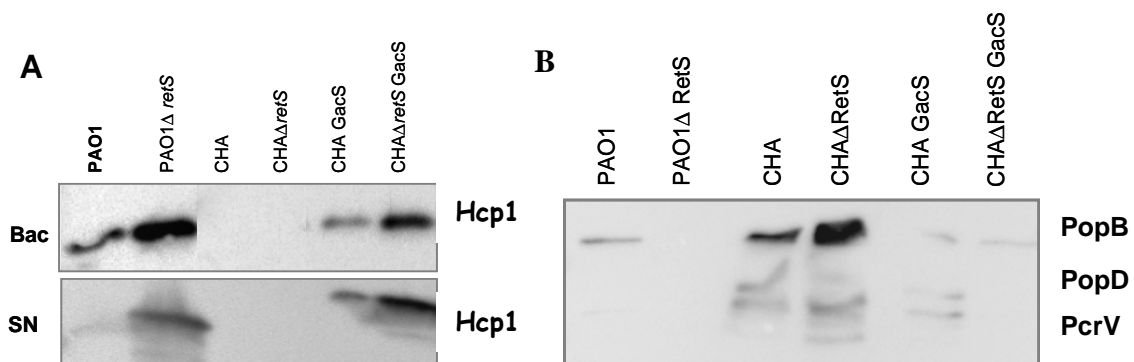


Figure 60 La complémentation de CHA par le gène *gacS* de PAO1 rétablit l'effet de la mutation *ΔretS* sur l'expression du SST6-1 et du SST3
 A/Western blots anti-Hcp1 réalisés sur des lysats (Bac) ou des surnageants bactériens (SN) des souches indiquées. B/ Western blot anti-PopB, anti-PopD et anti-PcrV réalisé sur des surnageants bactériens (SN) des souches indiquées dans des conditions d'activation du SST3 (déplétion de Ca^{2+})

7- Absence de GacS dans CHA

La délétion chromosomique affectant la région 3' du gène *gacS* conduit au remplacement des 48 derniers acides aminés de la protéine par 19 autres, et donc à un raccourcissement de son domaine Hpt, que nous appellerons Hpt* (Figure 61A). De manière générale, les domaines Hpt sont constitués de quatre hélices alpha de longueur variable (dont une porte l'histidine conservée), formant un « fagot », impliquées dans l'interaction avec le domaine receveur du régulateur de réponse lors du transfert de phosphate (Stock *et al.*, 2000). Le domaine Hpt* de GacS* possède toujours son histidine conservée, siège du phosphorelais, mais une modélisation des domaines Hpt de PAO1 et Hpt* de CHA, réalisée par nos collaborateurs marseillais avec le programme « PyMOL », indique qu'il manque dans Hpt*

une des quatre hélices caractéristiques de ces domaines (Figure 61B). L'absence de cette hélice manquante pourrait sûrement rompre un équilibre entre les différentes interactions hydrophobiques et électrostatiques qui stabilisent le « fagot ».

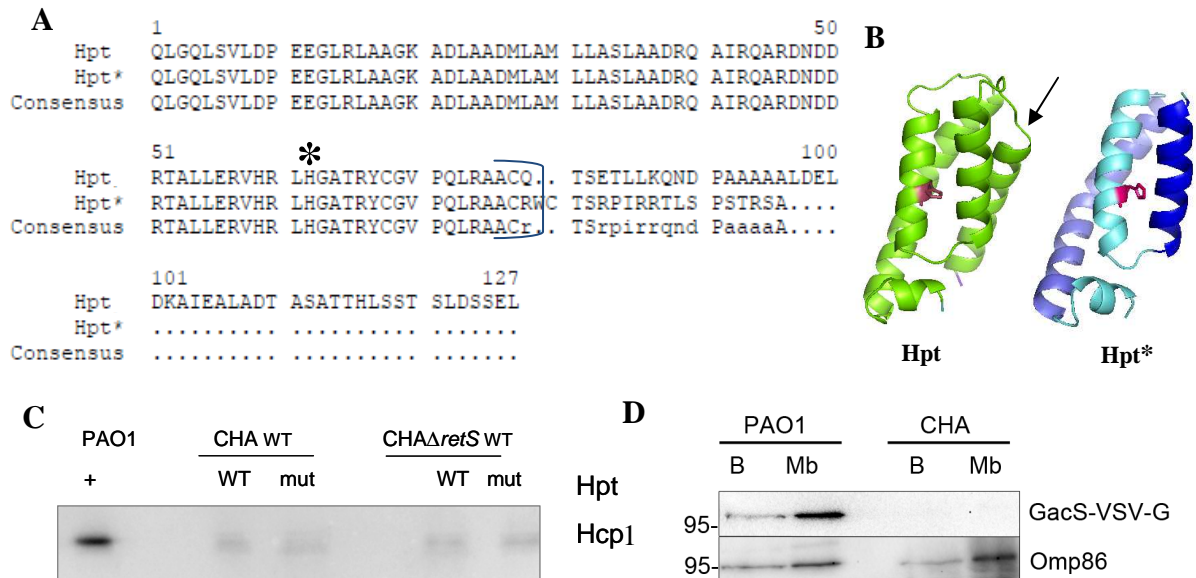


Figure 61 La délétion de l'extrémité 3' de *gacS* conduit à une absence de GacS* dans les membranes de CHA A/Alignement de séquences entre Hpt de PAO1 et Hpt* de CHA, l'histidine conservée est indiquée par une *, B/Modélisation des domaines Hpt de GacS de PAO1 (en vert) et Hpt* de GacS* de CHA (en bleu). La flèche montre l'hélice α manquante dans Hpt*. C/Western blot anti-Hcp1 réalisé sur des lysats bactériens des souches indiquées. CHA et CHA Δ retS ont été transformées avec un plasmide mTN7T codant pour le domaine Hpt de GacS contenant soit son histidine conservée (WT) soit une glutamine (mut), D/Western blots anti-VSV-G et anti-Omp86 réalisés sur des lysats bactériens et des membranes purifiées de PAO1 et CHA dont les gènes *gacS* sont fusionnés en 3' avec une séquence codant pour l'épitope VSVG .Omp86 : témoin de charge

Une étude a montré que le domaine isolé Hpt de GacS pouvait être suffisant pour interagir avec LadS et ainsi rétablir la voie LadS dans un mutant Δ *gacS* (Roux *et al.*, soumis). En supposant que GacS* puisse transférer son phosphate à un domaine Hpt fonctionnel fourni *en trans*, j'ai introduit dans CHA un plasmide exprimant soit le domaine Hpt natif de GacS de PAO1, soit un domaine Hpt muté incapable de transférer un phosphate, son histidine conservée étant remplacée par une glutamine. Aucun de ces deux domaines n'a modifié l'expression SST3/SST6-1 des souches (Figure 61C).

Cette absence de complémentation « osée » pouvait être liée à une absence de protéine GacS*. J'ai donc recherché sa présence dans CHA. Ne disposant pas d'anticorps anti-GacS, une étiquette VSV-G a été placée en C-terminal des protéines de PAO1 et de CHA, en modifiant directement le gène chromosomique. La présence de ces protéines taggées a été vérifiée dans les membranes des deux souches. La protéine GacS-VSV-G est bien présente dans les membranes de la souche PAO1. Par contre, nous n'avons pas détecté de protéine

GacS*-VSV-G dans CHA (Figure 61D). Après vérification par RT-PCR (non montré), nous avons pu observer que l'ARNm est bien présent, et que la délétion de 426 pb n'entraîne pas une instabilité conduisant à la dégradation de l'ARNm ce qui aurait pu expliquer l'absence de GacS*. Ainsi, la modification du domaine Hpt entraîne probablement une instabilité conduisant à la dégradation de GacS*.

8- Impact phénotypique de la délétion dans *gacS* ou *ldhA* ou les 2 gènes

Dans la plupart des cas, les mutations qui s'opèrent durant une colonisation durable des poumons des patients atteints de mucoviscidose confèrent à la bactérie un avantage pour persister et s'imposer dans la niche (adaptation CF). Quelles sont les principales caractéristiques de la souche CF CHA et l'impact de cette délétion sur sa virulence ?

a) Virulence SST3-dépendante

Nous avons vu que CHA est une souche très cytotoxique car elle possède un SST3 très actif (Dacheux *et al.*, 1999). C'est l'une des seules souches de *P. aeruginosa* capable de survivre à une attaque de leucocytes et de les tuer par oncose grâce à son SST3 (Dacheux *et al.*, 1999 ; Dacheux *et al.*, 2001). Un mutant Δ *exsA* dépourvu de son SST3 présente une virulence aiguë très amoindrie dans un modèle d'infection pulmonaire de souris (Ader *et al.*, 2005).

Par western blots, nous avons observé une baisse voire une absence de protéines du SST3 dans les souches CHA/pJNgacS et CHA Δ *rsmA* (Figure 60 et 56). Nous avons voulu savoir quel en était l'impact sur la cytotoxicité. Alors que CHA entraîne 80% de cytotoxicité sur des macrophages J774 après 3 heures d'infection (Figure 62), le mutant Δ *rsmA* est quant à lui complètement non cytotoxique. Ceci est en accord avec l'effet observé sur la production des protéines en Western blot (Figure 56). La souche CHA complétementée par le gène *gacS* de PAO1 est moins virulente que la souche sauvage et présente une cytotoxicité similaire à celle de PAO1 (50%). La mutation Δ *retS* n'affecte pas la cytotoxicité de CHA sauf si la cascade a été rétablie, au préalable, par complémentation de la souche avec le gène *gacS*.

La mutation dans *gacS* permet donc à CHA d'avoir un SST3 très actif, qui probablement échappe à l'effet répressif exercé par LadS dans des conditions d'infections chroniques.

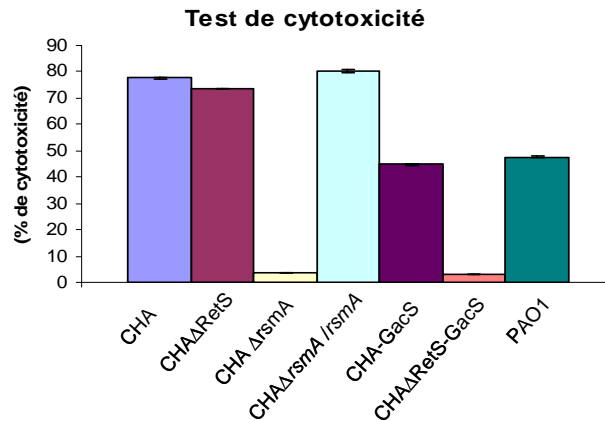


Figure 62 La complémentation par *gacS* a un impact sur la cytotoxicité SST3- dépendante de CHA. Test de cytotoxicité sur macrophages J774 réalisé avec les souches indiquées à une MOI de 5. La mesure a été réalisée trois heures après infection.

b) Production d'exopolysaccharides

P. aeruginosa produit trois sortes d'exopolysaccharides (EPS) que sont les Pel, les Psl et les alginate (voir partie exopolysaccharides dans l'introduction). Etant donné que CHA surproduisait les alginate, j'ai cherché à savoir si la souche produisait également les deux autres EPS, qui sont nécessaires à l'initiation, au développement et au maintien du biofilm (Colvin *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2009). Une manière de détecter leur présence est de mesurer la capacité de la souche à former des biofilms à l'interface air-liquide, ce type de biofilm étant considéré comme dépendant de Pel (Friedman and Kolter. 2004).

Figure 63, nous observons que CHA est incapable de former ce type de biofilm, suggérant que la souche ne produit pas de Pel. Ceci est en accord avec les études qui ont montré que les ARNm des gènes *pel* et *psl* sont les cibles de la régulation négative de RsmA (Irie *et al.*, 2010 ; Brencic and Lory. 2009). Nous avons pu aussi montrer qu'un mutant CHA Δ rsmA, et les souches CHA et CHA Δ retS complémentées par *gacS* produisent des biofilms à l'interface air-liquide, formant ces anneaux colorés au cristal violet sur le support.

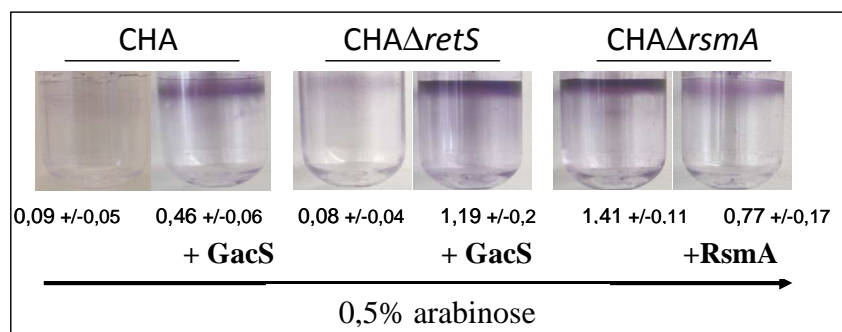


Figure 63 CHA ne forme pas de biofilm à l'interface air-liquide. Test de formation de biofilm avec les souches CHA, CHA Δ retS et CHA Δ rsmA complétées respectivement par pJN-GacS et pVLT-RsmA ou les plasmides vides (Réalisé par C. Bordi).

Ainsi, la souche CF CHA bien que surproduisant des alginate, ne produit pas les exopolysaccharides Pel, et probablement pas les Psl, leur synthèse étant verrouillée par RsmA.

c) Mobilité

P. aeruginosa est capable de se déplacer selon trois types de mobilité dépendant de la nature du milieu et des appendices extracellulaires mis en jeu. Le déplacement en milieu aqueux se fait par « swimming » et fait intervenir le flagelle. Les pili de type IV sont responsables du « twitching » qui prend place sur une surface solide (Rashid and Kornberg, 2000). Le mouvement de « swarming » a lieu sur une surface semi-solide et implique les rhamnolipides en plus du flagelle et des pili de type IV (Kearns, 2010). Cependant, tous ces appendices extracellulaires jouent également un rôle déterminant dans la virulence de *P. aeruginosa* d'où l'intérêt de voir leur fonctionnalité (voir partie facteurs de virulence impliqués dans la mobilité dans l'introduction).

Contrairement à la majorité des souches CF qui perdent leurs appendices extracellulaires au cours de la reprogrammation dans les poumons, nous avons pu observer que la souche CHA est mobile et capable d'utiliser ces trois modes de déplacement (Figure 64). RsmA joue un rôle important car un mutant CHA Δ rsmA est fortement impacté dans sa capacité à se déplacer en « swimming » et « twitching » (Figure 64A et B) ; ceci est en accord avec les études montrant que RsmA active l'expression du flagelle et du pili de type IV, par un mécanisme non élucidé à ce jour (Burrowes *et al.*, 2006 ; Brencic and Lory, 2009). La souche CHA complétée par *gacS* voit essentiellement sa mobilité de type « twitching »

réduite, indiquant que dans nos conditions, la délétion de *gacS* dans CHA semble favoriser la synthèse du pili de type IV. Or, les pili de type IV semblent être des adhésines essentielles au contact avec la cellule-hôte, indispensable pour l'activité du SST3 (Sundin et al., 2002).

Alors que pour le Swimming et le Twitching, les phénotypes des souches étaient très reproductibles, des phénotypes très différents pour le « swarming » ont été observés, les souches étant tantôt très peu mobiles, tantôt très mobiles et je n'ai pas pu dégager un comportement clair. La souche complétementée CHApGacS présentait cette même variabilité. Seul le mutant CHA Δ *rsmA* avait un phénotype reproductible sur toutes les boîtes testées, c'est-à-dire un swarming plus faible que celui observé avec PAO1 (Figure 64Cet D). Le « swarming » dépend de nombreux paramètres, tels que épaisseur des boîtes, humidité du milieu, ce qui peut expliquer la faible reproductibilité et les résultats plus variables que j'ai obtenu (Tremblay and Deziel. 2008).

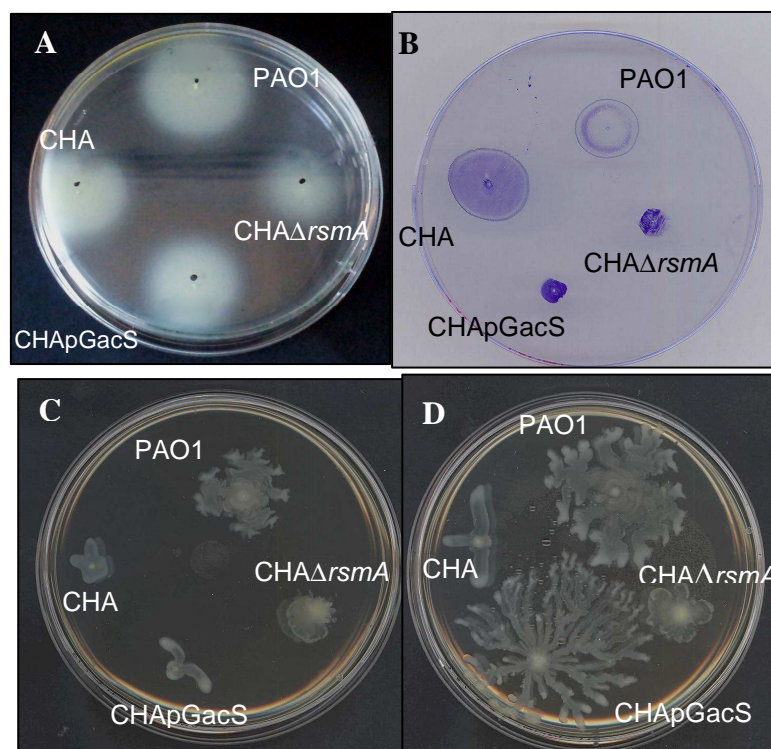


Figure 64 CHA possède les trois mobilités. Test de mobilités : swimming, (A) twitching (B) et deux boîtes de swarming (C et D) représentatives des différentes mobilités des souches PAO1, CHA, CHA-pGacS (complémentation chromosomique) et CHA Δ *rsmA*.

d) Pigmentation

CHA présente une pigmentation différente de celle de PAO1, observée sur boîte en milieu PIA. Elle présente une coloration rose-mauve apparaissant tardivement et colorant la gélose. L'élément responsable de cette coloration doit donc être diffusible et subir un processus d'oxydation. Sur PIA, le mutant $CHA\Delta rsmA$ perd cette coloration, ce qui indique que la production des pigments produits par CHA est contrôlée par RsmA. La souche complémentée $CHApGacS$ présente un phénotype intermédiaire (coloration rose moins marquée) mais l'inactivation de *retS* dans cette souche complémentée par *gacS* ($CHA\Delta retSpGacS$) conduit à un phénotype similaire à RsmA, c'est-à-dire la perte de la coloration mauve (Figure 65). La synthèse de ces pigments est donc normalement sous contrôle de la voie RetS/LadS/Gac/Rsm, qui est bloquée dans CHA dans le sens de la production de ce pigment rouge.

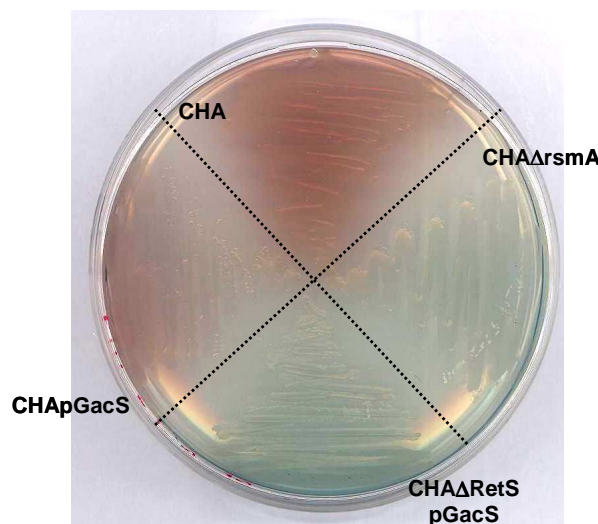


Figure 65 RsmA régule la production des pigments dans CHA. Différence de pigmentation sur milieu PIA entre les souches CHA, $CHA\Delta rsmA$, $CHApGacS$ et $CHA\Delta retSpGacS$ après une nuit à 37°C.

Tout d'abord, nous avons pensé que le pigment responsable de cette coloration « rose-mauve » pouvait être la pyomélanine (Yabuuchi. 1972). En effet, ce pigment rouge-brun, produit par 5% des souches CF, confère une résistance au stress oxydatif et accroît la persistance de la bactérie dans les poumons (Rodriguez-Rojas *et al.*, 2009). Mais la délétion du gène *hpd*, responsable de la synthèse de ce pigment, n'a pas affecté la pigmentation de la bactérie (non montré); nous avons donc exclu cette hypothèse et CHA ne fait partie des souches pyomélaniques. *P. aeruginosa* a la capacité de produire différents pigments qui, en

plus de donner une pigmentation caractéristique, sont avant tout des facteurs de virulence. Ainsi, la pyocyanine est une toxine ayant des propriétés redox capable de générer des ROS et de causer des dégâts cellulaires. Elle donne à la bactérie une coloration bleu-vert tandis que la pyoverdine est un sidérophore lui conférant une teinte jaune-vert (Lau *et al.*, 2004 ; Laursen and Nielsen. 2004 ; Takase *et al.*, 2000). Différentes études ont montré que RsmA régulaient de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de ces deux pigments (Burrowes *et al.*, 2006 ; Moscoso *et al.*, 2011 ; Frangipani *et al.*, 2013). Or, en plus de la pyocyanine, *P. aeruginosa* produit d'autres phénazines, qui sont des métabolites à noyau aromatique, dont: l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA), le 1-hydroxyphenazine (1-OH-PHZ) (composé rouge), le phenazine-1-carboxamide (PCN), l'aeruginosine A (rouge). Ces pigments de couleur différente et aux propriétés antibiotiques servent aussi bien de facteurs de virulence (induction d'apoptose) que de molécules signal (Mavrodi *et al.*, 2001; Mavrodi *et al.*, 2013).

Il est important de déterminer la nature précise des pigments synthétisés par la souche CHA ainsi que leur impact dans la virulence de la bactérie. Pour cela, il faudrait réaliser une extraction des phénazines par le chloroforme (l'aeruginosine, elle, reste dans la phase aqueuse), puis une analyse par chromatographie en phase gazeuse afin de les identifier. L'observation des mouvements d'expression des gènes par des analyses transcriptomiques (comparaison CHA et CHA Δ rsmA) permettrait d'identifier les éléments impliqués dans la synthèse des pigments.

e) Isolats de type « SCV »

Les « SCV » sont l'un des variants phénotypiques les plus marquants retrouvés parmi les isolats CF (Haussler *et al.*, 1999). Sélectionnés au cours de la longue colonisation des poumons, ils sont plus résistants aux antibiotiques et produisent plus de biofilm, ce qui leur confère une meilleure persistance dans les poumons (Lory *et al.*, 2009). De façon intéressante, il a été montré que les mutants *gacS* avaient tendance à générer plus de SCV que les souches sauvages lors d'une croissance en biofilm. De plus, ce phénotype est stable car aucune apparition de révertants n'a été observée après ré-étalement de ces SCV en absence d'antibiotique (Davies *et al.*, 2007).

La souche CHA étant naturellement dépourvue de GacS, j'ai d'abord voulu savoir si elle était capable de générer des clones SCV et, si c'était le cas, si elle en génèrait plus que la souche complémentée CHApGacS. Ainsi, j'ai réalisé avec CHA une expérience de production de biofilm à l'interface air-liquide, condition devant favorisant l'apparition de SCV. Après

une croissance en biofilm de 24h, j'ai récupéré les bactéries fixées au support et les ai étalées sur boîtes LB. J'ai pu ainsi observer plusieurs clones phénotypiquement différents du sauvage : de grosses colonies non mucoïdes (encerclées en orange, Figure 66A) mais surtout des petites colonies rugueuses mucoïdes ou non (entourées en rouge, Figure 66A). J'ai sélectionné les petites colonies et les ai repiquées plusieurs fois pour tester la persistance des caractères « petit » et « mucoïde ». Je n'ai pas observé de révertants pour les deux caractères, en accord avec les données publiées avec les mutants *gacS* (Davies *et al.*, 2007).

A ce stade, j'ai conservé et caractérisé deux clones : « Pnm » (pour petit et non mucoïde) et Pmuc, un clone petit et mucoïde. En étudiant la capacité de « swimming » de ces deux clones, j'ai constaté que la souche Pnm avait une mobilité très réduite par rapport à la souche sauvage CHA (Figure 66B). J'ai poursuivi la caractérisation de la souche Pnm en réalisant un test de formation de biofilm à l'interface air-liquide : cette souche en produisait beaucoup plus que CHA suggérant qu'elle peut produire des Pel (Figure 66C). Pour voir si cette production résultait d'un effet sur RsmA, j'ai vérifié l'expression et la sécrétion des protéines du SST3 du clone Pnm par western blots. Etonnamment, elle présentait une synthèse et sécrétion identique à la souche sauvage (Figure 66D). De plus, le clone Pnm n'exprime toujours pas le SST6-1 (non montré). J'ai vérifié et confirmé par PCR que le clone était bien toujours *gacS* (-). Le SCV Pnm est donc un variant de CHA moins mobile et capable de produire des Pel mais ayant le même profil d'expression du SST3 et du SST6 que CHA, suggérant que RsmA est toujours surabondante et active: il est probable que l'expression des gènes *pel* soit fortement augmentée ce qui permettrait d'échapper au contrôle négatif exercé par RsmA.

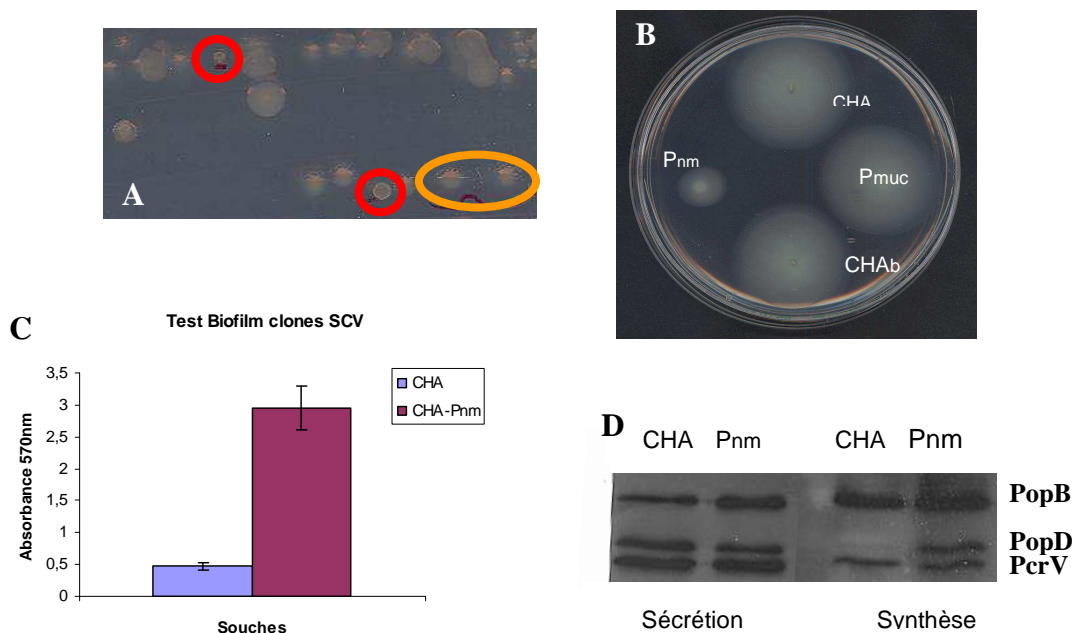


Figure 66 CHA est capable de produire des SCV A/Phénotype « petit et non mucoïde» (encerclé en rouge) comparé à une taille normale et mucoïde (encerclé en orange). B/Tests de « swimming » des clones sélectionnés, CHA souche sauvage et CHAb (clone issu du biofilm et présentant les mêmes caractéristiques que CHA sauvage) C/ Test de formation de biofilm. D/Western blot anti PopB, PopD et PcrV des souches indiquées, en conditions d'activation du SST3 (déplétion en Ca²⁺).

Enfin, j'ai voulu déterminer la fréquence d'apparition des SCV dans CHA et voir si leur apparition était plus fréquente que dans la souche complémentée par *gacS*. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de formation de biofilm à l'interface air-liquide avec les souches CHA, CHApGacS, et CHA-*gacS-ldhA* qui est la souche complémentée à la fois pour *gacS* et *ldhA* (réinsertion dans le chromosome de CHA de la région de 426 bp de PAO1). Après étalement de 400 clones, aucun SCV n'a été observé avec la souche CHA-*gacS-ldhA* et le pourcentage de clones SCV comptabilisé pour CHA et CHAp*gacS* était très proche (respectivement 3 et 1%). Aucune conclusion n'a pu être tirée sur la capacité de CHA à donner plus de SCV en biofilm sur cette expérience.

Il faut noter que les études publiées sur l'apparition des SCV ont été réalisées sur des biofilms constitués soit *in vivo*, soit en essai MBEC P&G (biofilm établi sur des picots en plastiques en plaques 96 puits), après une croissance de 24-48h (Davies *et al.*, 2007). Je ne me trouvais certainement pas dans les meilleures conditions pour favoriser l'apparition de SCV dans la souche CHA. De plus, il aurait fallu répéter cette expérience de nombreuses fois pour dégager une tendance significative. Par contre, j'ai pu montrer que CHA pouvait générer des SCV, et cette capacité peut lui permettre de mieux persister dans les poumons CF.

f) Le régulateur global Vfr

La perturbation de la voie Gac/Rsm due à l'absence de GacS n'est pas la seule particularité de la souche CHA. En effet, alors que le facteur de transcription Vfr de la souche PAO1 agit positivement sur plus de 200 gènes (notamment sur les gènes du SST3) et négativement sur les gènes codant pour le flagelle, une mutation de *vfr* dans CHA n'a pas d'effet sur le SST3 (B. Toussaint, communication personnelle). Nous avons vérifié que cela n'était pas lié à une absence d'expression du gène car la surexpression *en trans* de *vfr* n'a également aucun effet sur l'expression de promoteurs de gènes du SST3 (Figure 67A). J'ai aussi vérifié l'expression d'autres cibles de Vfr, telles que le SST2 (régulation positive indirecte) et le flagelle (régulation négative directe) et je n'ai observé aucun changement sur la mobilité (swimming) et l'expression du SST2 (test d'activité élastase sur boîte de lait, non montré).

J'ai voulu voir s'il existait un lien possible entre l'absence d'effet de Vfr et la délétion de *gacS* en introduisant une copie de *gacS* dans la souche $CHA\Delta vfr$. Ceci était peu probable, bien qu'il existe un lien entre RsmA et Vfr, RsmA activant la synthèse de Vfr et semblant ainsi réguler positivement certains facteurs de virulence aiguë via Vfr (Coggan and Wolfgang, 2012). Figure 67B, nous observons par western blot une diminution de l'activité de sécrétion du SST3 dans CHA complétement par *gacS* et aucun effet du mutant Δvfr , comme attendu. Par contre, de façon surprenante et inexplicée, l'introduction de *gacS* dans le mutant Δvfr n'affecte plus négativement la sécrétion. Ce résultat doit être confirmé car il suggère que l'effet de GacS dépend d'un Vfr fonctionnel, bien que Vfr n'ait pas d'effet propre.

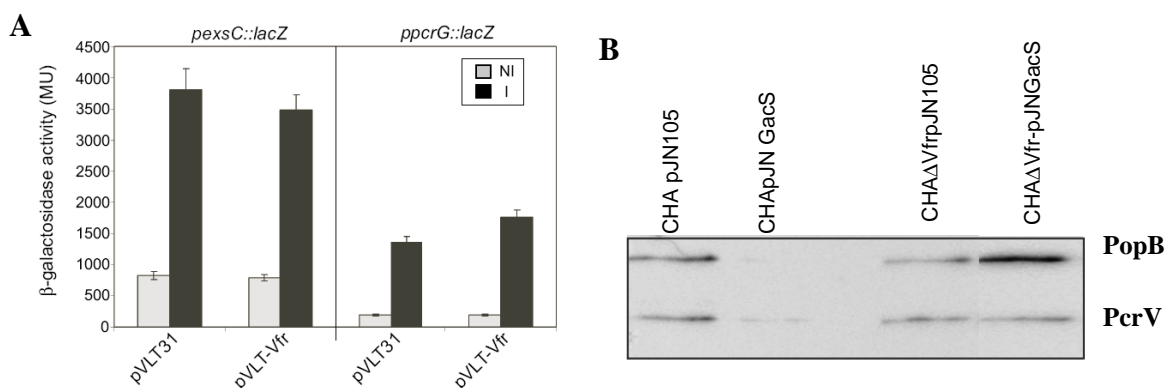


Figure 67 Vfr n'a pas d'effet sur le SST3 dans CHA **A/** mesure de l'activité β -galactosidase des souches contenant les fusions des promoteurs *pexsC* et *ppcrG* (ExsA-dépendants) fusionnés à *lacZ*. Ces souches contiennent soit le plasmide vide pVLT31, soit le plasmide portant *vfr* fusionné à *ptac*. Le milieu LB contient 2 mM d'IPTG. NI : SST3 non Induit. I: SST3 induit par déplétion en Ca^{2+} **B/** western blot anti PopB, et anti-PcrV réalisées sur des surnageants des souches indiquées en conditions d'activation du SST3.

9- Conclusions-Perspectives

La souche CHA est l'exemple frappant de la complexité de l'adaptation CF. Dans une population bactérienne très hétérogène, elle reflète la diversité des phénotypes qui peuvent être retrouvés dans des poumons CF, certains très éloignés les uns des autres. Les facteurs de virulence aiguë de cette souche ne subissent plus le contrôle négatif de LadS normalement observé lors des infections chroniques (Figure 68). Les signaux normalement détectés en conditions chroniques et influant sur la cascade de régulation post-transcriptionnelle, inhibant les facteurs de virulence aiguë, ne sont plus transduits puisque la voie Gac-Rsm est « déconnectée » du réseau du fait de l'absence de GacS.

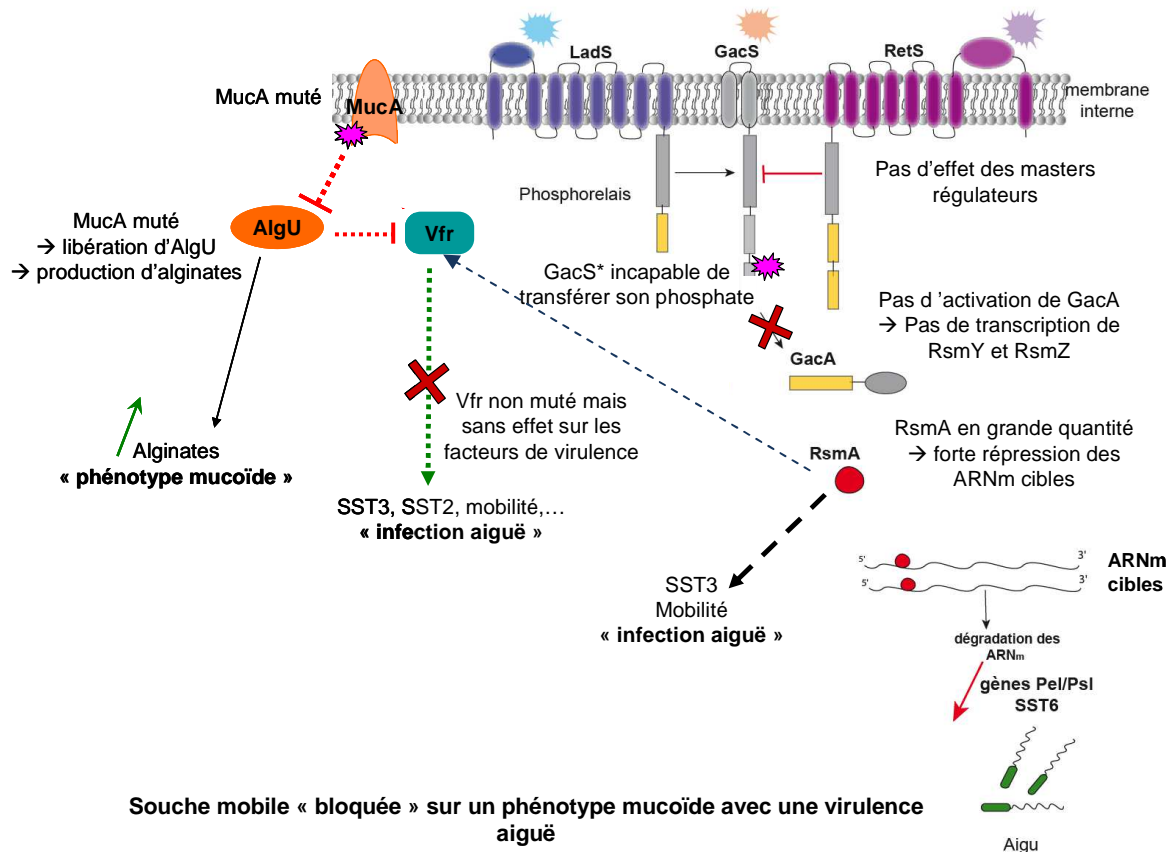


Figure 68 Schéma récapitulatif de la régulation des facteurs de virulence dans la souche CHA. Les deux masters régulateurs RetS et LadS n'ont aucune emprise sur la voie GacS/Rsm du fait de l'absence de GacS dans CHA. Cette absence conduit à une sur-abondance de la protéine régulatrice RsmA libre qui réprime fortement les gènes du SST6-1 et des Pel/Psl et favorise le SST3 et la mobilité. Il n'y a plus de transition virulence aiguë /chronique possible et les facteurs de virulence aiguë de la souche CHA ne peuvent plus être régulés négativement. CHA est mucoïde à cause de la mutation dans *mucA*. Vfr n'a aucun effet sur les facteurs de virulence aiguë de CHA testés lors de cette étude ; ils semblent déjà sur-activés.

Dans un contexte CF, CHA est donc normalement cytotoxique avec un SST3 actif. Elle n'exprime pas de SST6-1 et a préservé sa mobilité. Avec toutes ces caractéristiques CHA pourrait intervenir dans la défense du biofilm contre les leucocytes (libérations de toxines) mais aussi dans l'étape de dispersion du biofilm. En effet, douée de mobilité et possédant un SST3 actif, elle pourrait faire face aux cellules de l'immunité et servir d'éclaireuse pour d'autres souches qui pourront établir un nouveau biofilm dans une autre niche.

Contrairement à beaucoup de souches CF qui ont tendance à devenir sessiles, la souche CHA a donc conservé ses appendices extracellulaires et sa capacité à se déplacer. Le facteur sigma ECF AlgU est connu pour réguler négativement l'expression du flagelle, des pili de type IV et les rhamnolipides dans les souches CF. La sur-représentation de RsmA ayant un effet positif sur la mobilité pourrait expliquer le maintien des appendices extracellulaires chez cette souche (Wu *et al.*, 2004 ; Rau *et al.*, 2010). De plus, la mutation

gacS doit permettre d'échapper à l'effet represser qui s'exerce sur la mobilité en conditions chroniques par la cascade Gac/Rsm.

Un des traits caractéristiques des souches CF que possède CHA est la mucoidie et nous avons montré que cela résultait de la mutation dans son gène *mucA*. Les alginates ont été montrés comme ayant un rôle prépondérant dans la formation de biofilm dans les poumons (Schurr, 2013). Les autres EPS que sont les Pel et Psl sont, quant à eux, nécessaires pour l'initiation, la stabilité et le maintien du biofilm (Colvin *et al.*, 2012). CHA ne produit quasiment pas ou très peu de Pel comme nous l'avons vu dans un test de formation de pellicule (biofilm) et comme cela a été montré par RT-PCR par nos collaborateurs marseillais, Christophe Bordi et Yann Denis (Sall *et al.*, soumis). Il faut noter aussi que le gène *ldhA* codant pour la lactate deshydrogénase, NADH-dépendante, est altéré dans CHA et cette protéine a été montrée comme importante lors de la formation de microcolonies conduisant à des biofilms matures (Petrova *et al.*, 2012). En effet, la lactate deshydrogénase servirait à la conversion du pyruvate en lactate, acétate et/ ou succinate pour favoriser la survie en milieu pauvre en oxygène (balance rédox). L'absence de Pel et Psl conjuguée à celle de la LdhA peut nous faire douter de la capacité de la souche à former un biofilm structuré. Cependant, CHA semble également capable en conditions de stress de générer des SCV qui surproduisent des Pel (cas du clone Pnm). Des expériences de flow-cell pourraient nous éclairer sur sa capacité ou non à former des biofilms structurés. Pour cela, j'ai déjà réalisé les souches fluorescentes CHA-gfp et CHA Δ *retS*-gfp (souches contrôle), CHA Δ *rsmA*-gfp, CHA*pgacS*-gfp, CHA Δ *retSpgacS*-gfp et CHA*pgacS*-*ldhA*-gfp permettant l'observation au microscope de la formation de biofilm. L'utilisation de la souche fluorescente CHA complémentée avec les deux gènes *gacS*-*ldhA* sera un bon indicateur sur le rôle de la lactate deshydrogénase, indépendant de celui de GacS. Ces expériences de biofilm en flow-cell sont également nécessaires pour déterminer la réelle capacité de CHA à générer des SCV. Si CHA n'a pas la capacité de faire des biofilms, des expériences de biofilms mixtes seraient intéressantes pour voir si elle peut y contribuer avec une souche produisant les éléments qui lui manquent (dépourvue d'alginates mais produisant des Pel et Psl).

De manière intéressante, la production d'alginates tout comme la génération de « SCV » sont des marqueurs de persistance dans les poumons CF. Nous n'avons pas encore déterminé quel était la nature du pigment rouge produit par CHA et si ce pigment peut lui conférer un avantage quelconque. Par exemple grâce à leur propriété rédox, les phénazines permettent une meilleure résistance dans un environnement anaérobie. De nombreuses études font état de leur rôle dans la virulence ainsi que dans la persistance dans les poumons (Hunter

et al., 2012). CHA étant mucoïde et capable de produire des SCV en biofilm, elle a potentiellement deux sérieux atouts améliorant sa survie dans les poumons. Peut-être ce pigment non déterminé en est un troisième ? Par exemple, la 5MPCA (5-methyl-phenazine-1-carboxylic acid), est une phénazine de *P.aeruginosa* récemment décrite qui permet l'élimination de *Candida albicans* dans des biofilms mixtes et ceci de manière plus efficace que la pyocyanine (Morales *et al.*, 2010). Enfin, il serait particulièrement intéressant et enrichissant de réaliser d'autres études transcriptomiques. Il faudrait enrichir les puces pangénomiques déjà existantes à Marseille afin de réaliser la comparaison entre la souche sauvage CHA et le mutant CHA Δ rsmA dans l'espoir de découvrir de nouvelles cibles de RsmA parmi les 179 CDS spécifiques de CHA. Par exemple, nous pourrions découvrir de nouvelles phénazines d'intérêt et mieux caractériser leur impact sur la virulence de cette souche CF.

Dans la nature, les mutations spontanées GacS/GacA sont très fréquentes chez les *Pseudomonads* de la rhizosphère lors des variations phénotypiques (van den Broek *et al.*, 2005a). C'est un mécanisme permettant la cohabitation de deux populations ne produisant pas les mêmes métabolites secondaires. Ces mutations réversibles et aléatoires proviendraient d'un système de réparation MutS-dépendant défectueux. Chez la souche *Pseudomonas* sp. PCL1171, l'une de ces mutations (une délétion spontanée de 307 pb) requiert au préalable une mutation conduisant à une parfaite répétition de 10 pb (van den Broek *et al.*, 2005b). Un mécanisme similaire causant la délétion aurait pu se produire dans CHA entre les deux répétitions imparfaites de 11pb (5'-CGGCCTGCCA/GG) flanquant les extrémités 3' de *gacS* et 5' de *ldhA* dans le génome de PAO1. Un autre exemple de l'instabilité de GacS/GacA est la souche *P. fluorescens* ou CHA0. Cette souche colonise les racines de plantes et les protège en libérant des métabolites secondaires antifongiques : on parle de biocontrôle. Dans cette souche, le système à deux composants est responsable de la production de ces métabolites et des mutants spontanés *gacS* et *gacA* apparaissent dans une population de forte densité (Bull *et al.*, 2001, Duffy and Defago. 2000) décuplant ainsi la compétitivité de la population sauvage.

Durant ma thèse, j'ai recherché d'autres isolats « CHA-like », c'est-à-dire présentant une cytotoxicité SST3-dépendante et pas de SST6-1, dans le but de déterminer si la mutation dans *gacS* est répandue ou non parmi les isolats cliniques CF. Malgré l'analyse de 22 souches, aucun autre clone n'a été trouvé avec ce phénotype et il faudrait poursuivre l'analyse d'autres isolats CF. Deux autres clones de la souche CHA ont été séquencés : le clone PT22 provenant d'une rivière en Allemagne et le clone 491 isolé à Hanovre d'une patiente CF dont la capacité pulmonaire n'était pas affectée (Wiehlmann *et al.*, 2012). Cependant aucun d'eux ne présente

la délétion observée dans *gacS-ldhA*, ni n'est mobile comme CHA donc l'environnement influe grandement dans l'apparition de mutations même pour des souches d'un même clone (Bezuidt *et al.*, 2013).

Il existe d'autres souches présentant des mutations dans les gènes des masters-régulateurs. La souche PA14 est très cytotoxique : la surexpression des gènes codant pour son SST3 s'explique par une mutation dans le gène codant pour le régulateur global LadS (Mikkelsen *et al.*, 2011). En effet, une duplication de 49pb dans le gène conduit à une protéine putative tronquée. Cette souche présente un phénotype de virulence aiguë et est incapable de former un biofilm (répression de l'expression des exopolysaccharides par RetS). A l'inverse le clone C, qui a été isolé d'un patient CF, présente une mutation dans *retS* et possède une virulence de type chronique (Cramer *et al.*, 2011). Cependant, dans ces deux souches avec respectivement une virulence aiguë et chronique, il y a encore l'influence d'un des masters régulateurs (RetS ou LadS) alors que dans la souche CHA, il n'y a plus aucune communication dans la voie RetS/LadS/Gac/Rsm à cause de l'absence de GacS. CHA s'est donc soustrait totalement du contrôle des masters régulateurs.

Un élément surprenant est le rôle de Vfr dans la régulation des facteurs de virulence de CHA, ou plutôt, son absence de rôle sur les facteurs de virulence testés dans mon étude (SST3, SST2 et flagelle), alors que ceux-ci sont fortement exprimés. Il est surprenant que Vfr, élément clé de la réponse à la déplétion de calcium, n'ait aucune action sur le SST3 alors que CHA répond fortement à ce stimulus. De plus, l'absence d'effet de *gacS* dans le mutant Δvfr nous surprend et nous pousse à poursuivre l'étude du lien Vfr-GacS-SST3. Une étude transcriptomique entre $CHA\Delta vfr$ et $PAO1\Delta vfr$ pourrait donner des éléments de réponse.

L'une des balances régissant la transition infection chronique/aiguë est celle des niveaux d'AMPC et de di-GMPc dans la bactérie. Pour CHA, au vu des résultats sur Vfr, il serait vraiment très intéressant de mesurer et de comparer ces niveaux de messagers secondaires. En effet, la régulation par le di-GMPc passe par les petits ARNs et ils sont pratiquement inexistant dans CHA.

A l'issue de cette étude, il reste donc encore énormément de questions en suspens concernant la régulation des facteurs de virulence de la souche CHA, et en trouver les réponses est capital d'un point de vue fondamental et appliqué.

Conclusions Générales

La régulation précise de ses facteurs de virulence est un impératif de survie pour *P. aeruginosa*. En effet, elle doit constamment détecter les signaux environnementaux qui l'entourent et s'adapter au mieux. La détermination de la nature de ces signaux constituerait une grande avancée sur la connaissance des molécules essentielles à ce pathogène opportuniste pour opérer une transition efficace.

Durant cette thèse, j'ai cherché à activer des voies de signalisation de *P. aeruginosa* et j'ai pu développer des approches de chimogénomique et mettre au point un protocole de criblage robuste pour les futures investigations du laboratoire. Le fait d'avoir criblé des chimiothèques de molécules principalement antibiotiques ne nous permettait peut être pas d'avoir accès à celles susceptibles d'activer les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*. Après concertation avec nos collaborateurs du CMBA, il a été proposé de chercher du côté de chimiothèques renfermant des molécules plus proches de celles du quorum sensing ou de sucres afin de cibler des composés plus « physiologiques ». La construction de la souche contenant à la fois les fusions rapporteur *pexoS-gfp* et *pexoS-lux* permettra la réalisation d'un double criblage en simultané afin d'éviter les faux positifs rencontrés lors de mes deux cribles. Il serait intéressant de déterminer des conditions optimales de criblage pour les HSI-II et III afin de procéder à la recherche de molécules activatrices de ces systèmes.

Concernant le volet mutagénèse aléatoire, j'ai appris la technique auprès de nos collaborateurs marseillais et pu la mettre en place dans le laboratoire. A l'aide d'une technique originale, l'utilisation d'une souche avec deux rapporteurs (*pexoS-lacZ* et *pexoS-lux*), j'ai pu réaliser le criblage d'une première banque de mutants par transposon. Et au terme de ce criblage, j'ai pu sélectionner 4 mutants affectés dans leur expression du SST3. Leur caractérisation approfondie révélera si l'intégration s'est produite dans un nouveau gène important pour la régulation du SST3.

La plupart des isolats CF accumulent des mutations leur assurant une meilleure persistance dans les poumons. Ainsi, j'ai pu montrer que la souche CHA présentait une délétion dans un régulateur « pivot » de la transition virulence aiguë/chronique. Il serait enrichissant de poursuivre l'étude cet isolat clinique CHA par une analyse transcriptomique afin de découvrir une partie des mécanismes de régulation de cet isolat CF et de ses facteurs de virulence propres. Comprendre l'absence d'effet du master régulateur Vfr sur les facteurs de virulence dans CHA donnerait la possibilité de mieux cerner le mode de fonctionnement de ce régulateur.

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

a) Microbiologie et biologie cellulaire

Souches bactériennes, conditions de croissance et les milieux

Les souches bactériennes et plasmides utilisés dans notre étude sont décrits respectivement dans les Tableau 10 et Tableau 11 et la liste des oligonucléotides utilisés est donnée dans le Tableau 12.

Les souches ont été cultivées en conditions d'aérobie dans un milieu Luria-Bertani (LB) ou sur gélose LB ou PIA (Pseudomonas Isolation Agar) à 37°C.

Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes pour *E. coli* : 100µg/mL ampicilline, 25µg/mL kanamycine, 10µg/mL de tétracycline et 50µg/mL de gentamycine. Pour *P. aeruginosa* :

- PAO1 : 300µg/mL Carbénicilline (250µg/mL en liquide) ; 200µg/mL Gentamycine (100µg/mL en liquide) ; 200µg/mL tétracycline (100µg/mL en liquide)
- CHA : 500µg/mL Carbénicilline (300µg/mL en liquide) ; 400µg/mL Gentamycine (200µg/mL en liquide) ; 200µg/mL tétracycline (100µg/mL en liquide)

Analyse du SST3

- *In vitro*

Le SST3 est induit de manière « artificielle » par déplétion de calcium en rajoutant, en début de croissance (DO de 0,1), au milieu de culture de l'EGTA 5mM et du MgCl₂ 20mM. Lorsque l'on a besoin de réprimer l'activité basale du SST3, 5 mM de CaCl₂ sont rajoutés au milieu de culture.

- *In vivo* (Cytotoxicité sur les macrophages J774)

La cytotoxicité des souches a été testée au moyen de macrophages J774 par mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), illustrant la perméabilité membranaire des J774 causée par les toxines du SST3. Les cellules J774 sont maintenues dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4,5 g/L de glucose (Sigma), supplémenté avec 10% SVF (sérum de veau foetal), 1% acides amines non-essentiels et une solution d'antibiotiques (Invitrogen). Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur des plaques 48 puits. Avant l'infection, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS et le milieu est remplacé par du DMEM sans antibiotique. Les souches bactériennes d'une culture O/N sont diluées à une DO600 nm de 0,1 et mises à pousser à 37°C sous agitation jusqu'à une DO de 1. Les cellules J774 sont infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 5. Après 1h à 37°C en 5% CO₂, la libération de LDH a été mesurée aux temps indiqués avec le "Cytotoxicity Detection kit (LDH" (Roche) en suivant les instructions du fournisseur. Le contrôle positif est réalisé avec du Triton 2% et le milieu des cellules non infectées représente le contrôle négatif.

Cytométrie en flux

Les souches O/N sont diluées à une DO600nm de 0,1 +/- EGTA-MgCl₂ et incubées sous agitation jusqu'à atteindre une DO de 1. Une fois cette DO atteinte, 60µL de chaque culture est ajouté à 140µl de PBS 1X stérile et la fluorescence est mesurée par FACS. D'abord les souches contrôles sans Gfp sont analysées (pour éliminer le bruit de fond et repérer les bactéries), puis les souches Gfp non induites et enfin les souches Gfp induites.

Tests de formation de pellicule (biofilm interface air-liquide)

Les tests de formation de pellicule ont été réalisés dans des plaques polystyrène 24 puits Greiner bio one en suivant la technique décrite dans (Vallet *et al.*, 2001). Brièvement, les cultures O/N ont été inoculées dans du milieu M63 (1 mL) supplémenté avec 0,2% glucose, 0,5% acides casaminés et 1mM MgSO₄ à une DO600nm de 0,2 et incubées à 30°C sans agitation pendant 10 à 12h. Les cellules adhérentes sont colorées avec du cristal violet 0,1% (CV). Le surplus de colorant est enlevé par deux rinçages à l'eau distillée, le CV est dissout dans de l'éthanol 40% et l'absorbance est mesurée à 600nm.

Tests de mobilité

Les essais de motilité ont été réalisés en triplicats et répétés deux fois. Les essais de mobilité ont été effectués sur des milieu décrits dans (Rashid and Kornberg. 2000). Toutes les boîtes de Petri ont été inoculées avec des bactéries issues de cultures O/N de boîtes LB au moyen de cure-dents stériles.

Les essais de "Swarming" ont été réalisés sur des boîtes agar 0,5% contenant 0,8% de "Nutrient Broth" et 0,5% de glucose. Les bactéries sont inoculées à la surface des boîtes de Petri et incubées sur la nuit à 30°C.

La mobilité "Twitching" a été observée par des essais de "subsurface stab" à travers des boîtes LB agar 1% contenant du tryptone 1%, de l'extrait de levure 0,5% et du NaCl 1%. Les bactéries ont été inoculées sur le fond des boîtes de Petri. La taille de la zone de twitching à l'interface plastique-milieu a été mesurée après une incubation à 30°C sur la nuit, puis la marque de la zone de twitching a été colorée au cristal violet (incubation de 10 min suivi de deux rinçages à l'eau distillée).

La mobilité "Swimming" a été effectuée par inoculation de boîtes LB agar 0,3% supplémenté avec du tryptone 1% et du NaCl 0,5%. Les bactéries sont inoculées au milieu de l'agar. La taille de la zone de swimming a été mesurée après une incubation sur la nuit à 30°C.

b) Techniques de Biologie Moléculaire

Préparation d'ADN plasmidique

Les ADNs plasmidiques sont préparés en utilisant le kit « qiagen » ou par miniprep grâce à une lyse alcaline (protocole du Maniatis). Des cultures O/N d'*E. coli* sont transférées dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL et mises à centrifuger 4 min à 13000 rpm. Les surnageants sont éliminés et les culots sont remis en suspension dans 100µL de la solution I froide (25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM Glucose, pH 8). Puis 200 µL de la solution II (200mM NaOH, 1% SDS) sont ajoutés et les tubes sont retournés de temps en temps et laissés sur glace 10 min. Ensuite, 150µL de la solution III froide (5M acétate de potassium, acide acétique glacial, pH 4) sont ajoutés à chaque tube qui est vortexé 30s et mis sur glace 10 min. Après une centrifugation (10min, 13000 rpm, 4°C) le surnageant de chaque échantillon est transféré dans un nouveau tube eppendorf contenant 900µL d'éthanol absolu froid pour la précipitation de l'ADN plasmidique. Les tubes sont retournés et laissés sur glace environ 25min. Après une centrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C), les culots sont nettoyés dans 1mL d'éthanol 70% et centrifugés 10min à 13000 rpm à température ambiante. Après avoir fait sécher le tube, l'échantillon plasmidique est remis en suspension dans 20-30µL d'eau distillée.

Préparation et transformation de bactéries compétentes

Les souches de *P. aeruginosa* sont transformées en suivant le protocole décrit dans (Chuanchien *et al.*, 2002). 1 ml de culture de 16h de *P. aeruginosa* est centrifugé 30s à 13000 rpm à température ambiante. Le culot bactérien est repris dans 1 ml de MgCl₂ 0,1M froid, puis centrifugé de nouveau 30s à 13000 rpm. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 1 ml de TG-Salt (CaCl₂ 75 mM, MgCl₂ 6 mM, glycérol 15% (m/v)) froid et laissées sur glace 10 min. Après une dernière étape de centrifugation de 30s à 13000 rpm, les bactéries sont remises en suspension dans 200 µl de TG-Salt et laissées au repos 15 min sur glace au contact du plasmide d'intérêt (100 à 200ng). Puis un choc thermique est effectué au bain-marie, 2 min à 37°C. 500 µL de LB sont ajoutées au mélange puis les cultures sont mises à pousser 1h à 200 rpm à 37°C. Pour finir, les bactéries sont étalées sur des boîtes PIA sélectives.

Les cellules d'*E. coli* ultra compétentes TOP10 (Invitrogen) sont conservées à -80°C, dans des tubes individuels (50 µL). Une fois décongelées, elles sont maintenues sur glace et mises en contact de 100 ng d'ADN pendant 30 min. Le choc thermique se déroule à 42°C pendant 30s. Après avoir ajouté 250µl de milieu S.O.C (milieu riche), la culture est laissée 1h à 200 rpm puis la totalité est étalée sur un milieu LB sélectif.

Conjugaison triparentale (Smith *et al.*, 1985)

Cette technique est utilisée pour introduire dans *P. aeruginosa* des plasmides mobilisables non réplicatifs de type mini-CTX (plasmide mobilisable et intégratif) que j'ai utilisé pour transformer les souches. Pour cela, 30 µL de culture de 16h de deux souches *E. coli*, une donneuse (pCTX, Tc^R) et une contenant le plasmide helper (pRK2013) sont mises en contact, d'abord entre elles (2 h) puis 5-6 h avec la souche receveuse *P. aeruginosa* (préalablement incubée 2h à 42°C) sur boîte LB. Grâce au plasmide helper, le mini-CTX va être mobilisé dans *P. aeruginosa*; comme il porte un site *attP*, il va pouvoir s'intégrer dans le génome de *P. aeruginosa* dans un site *attB* par l'intermédiaire d'une intégrase codée par lui-même. Les bactéries sont remises en suspension dans 300 µL de LB et étalées sur PIA_{Tc200}. Après purification des clones, ces derniers sont ensuite transformés avec le plasmide pFLP2 (Cb^R), exprimant la recombinase Flp de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce plasmide permet l'élimination des marqueurs Tc^R, *int* et *oriT* du génome de *P. aeruginosa*, localisés entre des sites cibles FRT de la recombinase. Les clones obtenus sont ensuite sélectionnés sur PIA Cb₅₀₀ puis étalés sur PIA Saccharose 5%. Seules poussent les bactéries ayant perdu le plasmide car pFLP2 contient le gène *sacB* qui en présence de saccharose produit la lévane saccharase, qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en fructose et glucose. Ce fructose va polymériser et former du lévane, produit létal pour les bactéries. Ainsi, seul demeure dans la bactérie le gène inséré.

Electroporation d'après le protocole décrit dans (Choi and Schweizer. 2006)

(Tout se fait à température ambiante)

Des cellules compétentes sont préalablement préparées : une culture de 6 mL de *P. aeruginosa* est répartie dans 4 tubes eppendorf stériles (1,5 mL/tube) et centrifugée 2 min à 16000g. Pour chaque tube, le surnageant est éliminé et le culot repris dans 1mL de saccharose 300mM à température ambiante. Après une seconde centrifugation, le surnageant est de nouveau éliminé et le culot repris dans 1mL de saccharose. Après une dernière centrifugation, l'ensemble des culots est repris dans 200µL de saccharose. Ceci équivaut à la quantité de cellules suffisantes pour deux électroporations.

50 ng du plasmide mini Tn7T et du plasmide helper pTNS2 à transférer sont déposés au fond de la cuve d'électroporation (2 mm). 100µL de cellules compétentes sont rajoutées délicatement dans la cuve. Le choc électrique est réalisé (25µF, 200 ohms, 2,5kV) et 1 mL de LB est immédiatement ajouté pour récupérer les

cellules et transféré dans un tube de culture. Après 1h30 à 37°C à 200rpm, la culture est étalée sur boîte PIA avec l'antibiotique adéquat.

c) Fusions

Les fusions *lacZ* traductionnelles et transcriptionnelles classiques sont les mêmes que celles décrites dans (Brennic and Lory. 2009). Brièvement, les régions 5'UTR de *fha1* et *magA* et leurs 8 premiers codons respectifs, soit 429pb et 536pb, ont été amplifiés et clonés soit dans miniCTX-*lacZ* (fusion transcriptionnelle), soit dans un pUC18mTN7TGm-*lacZ20* (fusion traductionnelle).

***pexoS* (CHA)**

Pour la fusion traductionnelle *gfp*, un fragment de 264 pb d'*exoS* a été amplifié à partir d'ADNg de CHA avec les primers PExoS-S1 et PExoSsh. Le produit PCR a été cloné dans le plasmide PCR-blunt-TOPO II (pTOPO) et séquencé. Après une digestion *EcoRI*/*BamHI*, *exoS* (262 pb : la région promotrice + 9 premiers codons) a été cloné dans pIA101* Δ RBSgfp préalablement digéré par *EcoRI* et *BamHI*.

***pfha1* (PAO1)**

Pour la fusion traductionnelle *gfp*, un fragment de 429 pb (région 5' UTR + 8 codons) de *fha1* a été amplifié à partir d'ADNg de PAO1 avec les primers tradfha1true F et tradfha1true R. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *EcoRI*/*BamHI*, *fha1* a été cloné dans pIA101* Δ RBSgfp préalablement digéré par *EcoRI* et *BamHI*.

Pour la fusion transcriptionnelle modifiée, le plasmide miniCTX*pfha1-lacZ* a été digéré par *BamHI* et *AvrII*, encadrant le site de reconnaissance à la RNase III. Ce plasmide a été déposé sur gel, purifié et puis après obtention d'un bout franc grâce à la Klenow, il a été re-circularisé : ce miniCTX*fha1A Δ RIII-lacZ* ne possède plus le site de reconnaissance à la RNase.

***Pmag* (PAO1)**

Pour la fusion traductionnelle *gfp*, un fragment de 536 pb (région 5' UTR + 8 codons) de *magA* a été amplifié à partir d'ADNg de PAO1 avec les primers tradPA4492 F et tradPA4492 R. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *EcoRI*/*BamHI*, *mag* a été cloné dans pIA101* Δ RBSgfp préalablement digéré par *EcoRI* et *BamHI*.

Pour la fusion transcriptionnelle modifiée portée par le miniCTX*pmag Δ RIII-lacZ*, le plasmide miniCTX*pmag-lacZ* a été traité de la même façon que le miniCTX*pfha1-lacZ* afin de lui retirer son site de reconnaissance à la RNase III.

***pexsCEBA* (pIA60)**

Le fragment *pexsCEBA* de 1,8 kb a été récupéré par digestion *SmaI*/*HindIII* du plasmide pIA60 et sous-cloné dans le plasmide pUC18 (digestion *SmaI*/*XhoI*-*Sall*). Après une digestion *SmaI*/*HindIII*, *pexsCEBA* a été cloné dans pUC18mTn7T-GmlacZ20.

d) Constructions génétiques

- Pour le plasmide de complémentation de *gacS*, une région de 2847pb du gène *gacS* a été amplifiée par PCR à partir d'ADNg de PAO1 avec les amorces GacS-SmaI-F et GacS-XbaI-R. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *SmaI-XbaI*, *gacS* a été sous-cloné dans le plasmide pJN105 coupé par *SmaI* sous le contrôle du promoteur inductible à l'arabinose, pBAD.

- Pour le plasmide de complémentation chromosomique de *gacS* avec son propre promoteur, une région de 3041pb a été amplifiée en utilisant les amorces p-GacS-F et p-GacS-R. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *SmaI-HindIII*, *p-gacS* a été sous-cloné dans le plasmide pUC18mTn7T-GmlacZ20 préalablement digéré par *SmaI* et *HindIII*. Une électroporation a été réalisée pour transformer la souche CHA.

- Pour l'intégration chromosomique de *gacS* et *gacS** fusionné à la séquence codant à l'épitope VSV-G, l'épitope a été rajouté en phase en 3' de *gacS* et *gacS** par SOE-PCR avant insertion dans le chromosome. Deux fragments de 418 et 428 pb du gène *gacS* ont été respectivement amplifiés par PCR à partir d'ADNg de PAO1 avec les amorces GacS VSV-G-F1 et GacS VSV-G-R1 et les amorces GacS VSV-G-F2 et GacS VSV-G-R2. Deux fragments de 390 et 395 pb ont été respectivement amplifiés par PCR à partir d'ADNg de CHA avec les amorces CHAGacS VSV-G-F1/CHAGacS VSV-G-R1 et les amorces CHAGacS VSV-G-F2/CHAGacS VSV-G-R2. Chacun des deux fragments a été utilisé pour une troisième PCR avec les amorces GacS VSV-G-F1 et GacS VSV-G-R2 pour PAO1 et CHAGacS VSV-G-F1 et CHAGacS VSV-G-R2 pour CHA. Les produits PCR de 813 et 752 pb ont été clonés dans pTOPO et séquencés. GacS-VSV-G et GacS*-VSV-G ont été sous-clonés dans le plasmide-suicide pEX100T (Schweizer and Hoang. 1995). Une conjugaison triparentale a été réalisée pour transformer les souches CHA et PAO1. Après une sélection sur sucrose, les clones portant l'épitope ont été identifiés par PCR en utilisant les amorces GacS VSV-G-F1 et GacS VSV-G-R2 et CHAGacS VSV-G-F1 et CHAGacS VSV-G-R2. La présence de l'épitope VSV-G a été confirmée par séquençage du fragment PCR.

- Concernant la construction du mutant RsmA, le gène *rsmA* (954 pb) a été amplifié à partir d'ADN génomique de CHA avec les amorces Mut-RsmA-F1 et Mut-RsmA-F2. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Une région de 846pb (délétion de 111 pb) du gène *rsmA* a été amplifiée par SOE-PCR du plasmide pTOPO-*rsmA* au moyen des amorces Mut-RsmA-F1 et Mut-RsmA-R1, puis Mut-RsmA-F2 et Mut-RsmA-R2. Enfin, la délétion a été réalisée au moyen des amorces mut-RsmA-F1 et Mut-RsmA-R2. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Mut-RsmA a été sous-clonée dans le plasmide-suicide pEX100T (Schweizer and Hoang. 1995). Une conjugaison triparentale a été réalisée pour transformer la souche CHA. Après une sélection sur saccharose, les clones mutants sont identifiés en utilisant les amorces Mut-RsmA-F1 et Mut-RsmA-R2.

Pour obtenir la mutation dans *retS* (80% du gène délété), le gène *retS* a été amplifié à partir de l'ADNg de PAO1 avec les amorces RetS-F1 (F) et RetS-F2 (R). Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Une région de 595 pb du gène *retS* a été amplifiée par SOE-PCR de pTOPO-*retS* en utilisant les amorces RetS-F1 (F) et RetS-R1 (R), puis avec RetS-F2 (F) et RetS-R2 (R) et finalement RetS-F1 (F) et RetS-R2 (R). Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *SmaI*, Mut-RetS a été sous-cloné dans pEX100T. Une conjugaison triparentale a été réalisée pour transformer la souche PAO1 et CHA.

Pour la complémentation du mutant $\Delta rsmA$, une séquence de 230pb du gène *rsmA* a été amplifiée par PCR à partir d'ADNg de PAO1 avec les amorces PSE-RsmA-F et PSE-RsmA-R. Le produit PCR a été cloné dans pTOPO et séquencé. Après une digestion *HindIII-XbaI*, *rsmA* a été sous-cloné dans le plasmide pVLT31 sous le contrôle du promoteur inductible à l'IPTG *plac*

Mutagenèse aléatoire

Une conjugaison triparentale est réalisée entre la souche *E. coli* portant le plasmide « helper » pRK2013, celle portant le vecteur pBT20 du transposon et la souche PAO1F que l'on veut muter. Deux patchs de culture O/N (30µL-30µL) de chaque souche d'*E. coli* sont déposés sur des boîtes LB sèches et laissées à incuber 2h à 37°C. Pendant ce temps, la souche PAO1F*pexoS-lacZ/pexoS-lux* est elle aussi mise à incuber à 42°C. Au bout des

2h, 60µL de la culture PAO1F sont rajoutés sur les deux patchs secs et les boîtes sont remises à incuber pendant 4h à 37°C. Une banque glycérolée de 2 mL est réalisée avec la totalité des patchs récupérés (3/4 bactérie, ¼ glycérol 80%) et 6, 50 et 100µL de cette banque sont étalés sur trois boîtes LB Gm50 et Irgazan 25. Ces boîtes laissées O/N à 37°C serviront au dénombrement des événements de transposition : le nombre de colonies sur chaque boîte multiplié par le facteur de dilution et ramené au volume de la banque nous donne une estimation de la taille de notre banque. Le reste de la banque est étalée sur des boîtes LB Gm50, Irg 25µg/mL, X-gal 40µg/mL et CaCl₂ 5mM de 135mm au moyen de billes en faisant en sorte qu'il n'y ait pas plus de 150-200 colonies par boîtes de 135mm. Après incubation à 37°C sur la nuit, les boîtes sont mises à 4°C pour intensifier la coloration des colonies. Les clones intéressants sont sélectionnés et purifiés sur LBGm50-X-gal. La mesure de luminescence *pexoS-lux* de chaque clone est ensuite effectuée et comparée à son activité β-galactosidase. Les clones dont l'activité est confirmée être modifiée par le transposon sont utilisés pour une étape de PCR semi-arbitraire afin de localiser la zone d'insertion du transposon. Le premier round de PCR a été fait avec le couple d'amorce ARB1-Ausubel/ MCL211 avec la TaqPCRx DNA polymerase (Roche) suivant le programme suivant : 6 cycles à 25°C et 5 cycles à 40°C avec pour matrice l'ADNg purifié (0,5 µL d'un stock à 2µg). Le second round de PCR est réalisé à l'aide des amorces ARB2A-Ausubel/MCL226 et a pour matrice le mix de la première dilué au 1/5^e. Il s'agit de 35 cycles à 45°C. Les fragments amplifiés ont été sous-clonés puis séquencés.

e) Biochimie

- **Mesure d'activité β-galactosidase**

o Méthode de miller

500µL de culture ont été prélevées aux DO indiquées et perméabilisées par addition de 20µL de SDS 0,1% et 20µL de chloroforme, suivi d'un vortex d'1 min.

Les essais d'activité β-galactosidase sont réalisés suivant le protocole de Miller, avec 100µL de cellules, dans 900µL de tampon Z (0,1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50mM 2- β mercaptoethanol, pH 7,0) à 28°C. La réaction est initiée en ajoutant 200µL d'OrthonitrophenylD-galactopyranoside (ONPG) à 4mg/mL et stoppée avec 500µL de Na₂CO₃ 1M. L'absorbance à 420nm est mesurée après sédimentation des débris cellulaires (5min à 13000 rpm) et les activités exprimées en Unités Miller [(A₄₂₀x1000)/(tps (min) x Vo (mL) x A₆₀₀)]. Les valeurs reportées pour les activités enzymatiques sont la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes réalisées en triplicat.

o Lecture au β-glo

Les souches O/N sont diluées à une DO de 0,1 dans un erlen de 30 mL LB. Le SST3 de la souche PAO1/pIAPGlac-Z est induit avec 5mM EGTA et 20mM MgCl₂. Après une croissance de 3h à 300 rpm et 37°C, 90µL de chaque culture bactérienne est ajoutée aux plaques de molécules préalablement diluées. Les plaques sont remises 2h sous agitation à 225 rpm et 37°C. A la fin des 2h, chaque plaque-mère est diluée au 1/10^e (10µL de culture dans 90µL de LB) dans une plaque ordinaire, puis au 1/100^e dans une plaque blanche greiner (conçue pour la lecture en luminescence avec le β-glo) à partir de la plaque précédente. Puis à partir de la même plaque 1/10^e, une dilution au 1/100^e est effectuée dans une plaque ordinaire et une autre au 1/1000^e dans une plaque blanche Greiner. 100µL de β-glo sont ajoutés aux plaques blanches qui sont agitées pendant 30 s à 400 rpm puis incubées 30 min sans lumière à 22°C. A la fin des 30 min, la luminescence est mesurée par fluorimètre.

- **Mesure de fluorescence (Fluoroskan)**

Les souches O/N sont diluées à une DO_{600nm} de 0,1 +/- EGTA-MgCl₂. 90µl de la culture bactérienne sont ajoutées aux molécules préalablement diluées dans des plaques Greiner noires. La fluorescence est mesurée au Fluoroskan avec le programme suivant :

- 37°C, 60 rpm (vitesse d'agitation)
- Mesure de fluorescence toutes les 15 min pendant 4h (longueur d'onde d'excitation et de lecture : 485-527nm)

Les mesures sont ensuite enregistrées sur ordinateur pour être traitées.

- **Western blot**

L'analyse de la production et de la sécrétion d'Hcp1 a été réalisée suivant le protocole préalablement décrit dans (Casabona *et al.*, 2013). Brièvement, des cultures O/N ont été diluées à une DO de 0,05 et incubées sous agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle (entre 0,8 et 1). Puis, 250µL de cellules ont été recueillis par centrifugation et remis en suspension dans 50 µl de tampon de charge pour analyse de la production d'Hcp1. Pour celle de la sécrétion, 1250µL de surnageant de culture ont été précipités en se servant de la méthode TCA-Sarkosyl (Chevallet *et al.*, 2007). Les échantillons sont concentrés 50 fois et 15µL de surnageant sont déposés pour réaliser un western blot.

Pour l'induction *in vitro* du SST3, les cultures O/N ont été diluées à une DO de 0,1 dans du LB contenant 5mM EGTA et 20 mM MgCl₂ et placées sous agitation à 37°C (conditions induites du SST3). Les conditions non induites correspondent au seul milieu de culture. Une fois la DO de 1 atteinte, les cultures ont été centrifugées (8000 rpm, 10min, 4°C) et 20µL du surnageant a été déposé sur gel SDS-PAGE 12% et analysé par western-blot avec des anticorps anti-PopB, anti-PopD et anti PcrV dilués respectivement au 1/2000^e, 1/3000^e et 1/5000^e (sécrétion du SST3). Pour la synthèse, 1mL de culture à une DO de 1 est prélevé et centrifugé 5 min à 8000 rpm à 4°C. Le culot est repris dans 100µL d'une solution de Tris-HCl, NaCl 200mM (pH 8) et soniqué 30 s. Après ajout du bleu de charge, 5 µL d'échantillon sont déposés sur gel pour faire un western blot.

Pour l'analyse de GacS-VSV-G et GacS*-VSV-G, 100µL de culture à une DO de 2,8-3 ont été recueillies et analysées comme « cellules totales ». Le reste des cultures a été centrifugé, traité au lysozyme et cassé par sonication. Après une ultracentrifugation, les membranes ont été lavées et 2µg de protéines ont été utilisés pour l'analyse par SDS-PAGE et western-blot.

Les anticorps suivants ont été utilisés: les anticorps polyclonaux anti-Hcp1 dilués au 1/5000^e déjà décrits (Casabona *et al.*, 2013); les anticorps polyclonaux anti-VSV-G (Sigma-Aldrich); les anticorps monoclonaux anti-RpoA (neoclone); anti-Omp86, obtenus après immunisation de lapins avec HIS-Tev-o-Omp86 (G629-N752) et utilisés au 1/2000^e. Les anticorps secondaires commerciaux (anti-rabbit-HRP, anti-guinea-pig-HRP, anti-mouse HRP) ont été utilisés suivant les recommandations des fournisseurs.

Tableau 10 : Souches utilisées dans cette étude

Souches	Caractéristiques	références
<i>E. coli</i>		
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16</i> <i>rpsL(Str^R) endA1 λ</i>	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Isolée d'une blessure, souche de laboratoire	J. Mougous
PAO1F	PAO1 de laboratoire sélectionnée	A. Riestch
CHA	Souche mucoïde CF	(Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
TB (TBCF10839)	Souche clinique CF	(Tummler <i>et al.</i> , 1991)
LES400	Souche CF épidémique	(Salunkhe <i>et al.</i> , 2005)
KK1	Souche clinique CF	(Bastonero <i>et al.</i> , 2009)
CF6	Souche clinique CF	(Dacheux <i>et al.</i> , 2000)
PA7	Souche clinique (blessure)	(Roy <i>et al.</i> , 2010)
PAK	Souche clinique	Lab collection
PAO1 Δ <i>retS</i>	Souche PAO1 délétée du gène <i>retS</i>	(Mougous <i>et al.</i> , 2007)
CHA Δ <i>retS</i>	Souche CHA délétée du gène <i>retS</i>	S. Elsen non publié
CHA Δ <i>exsA</i>	Souche CHA délétée du gène <i>exsA</i> (Gm ^s)	(Dacheux <i>et al.</i> , 1999)
CHA Δ <i>rsmA</i>	Souche CHA délétée du gène <i>rsmA</i>	Cette étude
CHA Δ <i>vfr</i>	Souche CHA délétée du gène <i>vfr</i>	B Toussaint
CHA-pGacS	Souche CHA contenant <i>gacS</i> et sa région promotrice intégré au site <i>attTn7</i> . Gm ^r	Cette étude
CHA Δ <i>retS</i> -pGacS	Souche CHA Δ <i>retS</i> contenant <i>gacS</i> et sa région	Cette étude

	promotrice intégrés au site <i>attTn7</i> . Gm ^r	
CHA-GacS*-VSVG	Souche CHA dont le gène <i>gacS</i> *endogène est fusionné en 3' à une séquence codant pour un tag VSV-G	Cette étude
PAO1-GacS-VSV-G	Souche PAO1 dont le gène <i>gacS</i> endogène est fusionné en 3' à une séquence codant pour un tag VSV-G	Cette étude
PAO1miniCTX <i>pfha1-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pfha1-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>pfha1-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> contenant <i>pfha1-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> .Tc ^r	Cette étude
PAO1miniCTX <i>pfha1</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pfha1-lacZ</i> délété de sa région de reconnaissance à la RNase III, intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>pfha1</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> contenant <i>pfha1-lacZ</i> délété de sa région de reconnaissance à la RNase III, intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1miniTn7T <i>pfha1-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pfha1-lacZ</i> intégré au site <i>attTn7</i>	Cette étude
CHAmiiniCTX <i>pfha1-lacZ</i>	Souche CHA contenant <i>pfha1-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1miniCTX <i>pmagA-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pmagA-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>pmagA-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> avec <i>pmagA-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1miniCTX <i>pmagA</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pmagA-lacZ</i> délété de sa région de reconnaissance à la RNase III, intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>pmagA</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> contenant <i>pmagA-lacZ</i> délété de sa région de reconnaissance à la RNase III, intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1miniTn7T <i>pmagA-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pmagA-lacZ</i> intégré au site <i>attTn7</i> . Gm ^r	Cette étude
PAO1miniCTX <i>phsiA2-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>phsiA2-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>phsiA2-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> contenant <i>phsiA2-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1miniCTX <i>phsiB3-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>phsiB3-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1Δ <i>retS</i> miniCTX <i>phsiB3-lacZ</i>	Souche PAO1Δ <i>retS</i> contenant <i>phsiB3-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
CHAmiiniCTX <i>pexoS-lacZ</i>	Souche CHA contenant <i>pexoS-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i>	Cette étude

CHAΔ <i>exsA</i> miniCTX <i>pexoS-lacZ</i>	Souche CHAΔ <i>exsA</i> contenant <i>pexoS-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i>	Cette étude
CHAmiNiTN7T <i>pexsCEBA-lacZ</i>	Souche CHA contenant <i>exsCEBA</i> intégrée au site <i>attTn7</i> . Gm ^r	Cette étude
PAO1miniTN7T <i>pexsCEBA-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>exsCEBA</i> intégrée au site <i>attTn7</i> . Gm ^r	Cette étude
PAO1FminiCTX <i>pexoS-lacZ</i>	Souche PAO1 contenant <i>pexoS-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> . Tc ^r	Cette étude
PAO1F <i>pexoS-lacZ/pexoS-lux</i>	Souche PAO1F contenant <i>pexoS-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> et <i>pexoS-lux</i> intégré au site <i>attTn7</i>	Cette étude
CHAmTn7T-Hpt WT	Souche CHA contenant <i>ptac-hpt</i> intégré au site <i>attTn7</i> , Hpt le domaine natif de GacS (histidine conservée) Gm ^r	Cette étude
CHAmTn7t-Hpt mut	Souche CHA contenant <i>ptac-hpt</i> intégré au site <i>attTn7</i> , Hpt le domaine muté de GacS (histidine mutée en glutamine) Gm ^r	Cette étude
CHAΔ <i>retS</i> SmTn7T-Hpt WT	Souche CHAΔ <i>retS</i> contenant <i>ptac-hpt</i> intégré au site <i>attTn7</i> , Hpt le domaine natif de GacS (histidine conservée) Gm ^r	Cette étude
CHAΔ <i>retS</i> SmTn7t-Hpt mut	Souche CHAΔ <i>retS</i> contenant <i>ptac-hpt</i> intégré au site <i>attTn7</i> , Hpt le domaine muté de GacS (histidine mutée en glutamine) Gm ^r	Cette étude

Tableau 11 : Plasmides utilisés dans cette étude

Nom	Caractéristiques	références
pRK2013	Km ^r , <i>oriT</i> helper	(Figurski and Helinski. 1979)
pFLP2	Ap ^r , <i>sacB</i> , vecteur d'expression à large spectre d'hôte, recombinaison FLP	(Hoang et al., 2000)
pCR-Blunt II-TOPO (pTOPO)	vecteur de clonage de sélection positive; Km ^r Ap ^r	Invitrogen
pTNS2	Ap ^r , R6K <i>Ori</i> , mini-Tn7-T plasmide helper, codant pour le complexe TnsABC + transposase D pour catalyser une insertion à haute fréquence	(Choi et al., 2005)
pBT20	Vecteur du transposon marinier pour la mutagenèse	(Kulasekara et al., 2005)
pEX100T	Ap ^R , vecteur de remplacement de gène issu de pUC19	(Schweizer and Hoang. 1995)

pEX Δ retS	pEX100T contenant le fragment SOE-PCR de <i>retS</i>	S. Elsen, non publié
pEX Δ rsmA	pEX100T contenant le fragment SOE-PCR de <i>rsmA</i>	Cette étude
pEX-GacS-VSV-G	pEX100T contenant le fragment SOE-PCR de <i>gacS</i> fusionné à la séquence codant à l'épitope VSV-G	Cette étude
pEX-GacS*-VSV-G	pEX100T contenant le fragment SOE-PCR de <i>gacS*</i> fusionné à la séquence codant à l'épitope VSV-G	Cette étude
pJN105	Gm ^r , vecteur d'expression inductible par arabinose	(Newman and Fuqua, 1999)
pJN-GacS	Gène <i>gacS</i> fusionné à <i>pBAD</i> inductible par arabinose	Cette étude
pMP220	IncP, mob, <i>lacZ</i> sans promoteur, Tc ^r	(Zaat et al., 1987)
pMP-pRsmY	Fusion transcriptionnelle <i>pRsmY-lacZ</i>	(Bordi et al., 2010)
pMP-pRsmZ	Fusion transcriptionnelle <i>pRsmZ-lacZ</i>	(Bordi et al., 2010)
pBBR-MCS4	Plasmide d'expression à large spectre, Ap ^r	(Kovach et al., 1995)
pBBR-LadS	Gène <i>ladS</i> fusionné à <i>plac</i>	(Ventre et al., 2006)
pVLT31	Vecteur pour fusion transcriptionnelle <i>plac</i> ; Tc ^r	(de Lorenzo et al., 1993)
pVLT-rsmA	Fusion transcriptionnelle <i>plac-rsmA</i>	Cette étude
pVLT-Vfr	Fusion transcriptionnelle <i>plac-vfr</i>	Cette étude
miniCTX- <i>lacZ</i>	Vecteur pour integration d'une copie du rapporteur <i>lacZ</i> dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i> au site <i>attB</i>	(Becher and Schweizer, 2000)
mCTX p <i>pfha1-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>pfha1-lacZ</i>	Brencic
mCTX p <i>pfha1</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>pfha1-lacZ</i> (délétion du site RNaseIII)	Cette étude
mCTX p <i>magA-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>pmag-lacZ</i>	brencic
mCTX p <i>magA</i> Δ <i>RIII-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>pmag-lacZ</i> (délétion du site RNaseIII)	Cette étude
mCTX p <i>psiA2-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>psiA2-lacZ</i>	Cette étude
mCTX p <i>psiB3-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>psiB3-lacZ</i>	Cette étude

mCTX <i>pexoS-lacZ</i>	Fusion transcriptionnelle <i>pexoS-lacZ</i>	Cette étude
pUC18miniTn7T	Vecteur mini-Tn7 avec des arrest de transcription et un site de clonage multiple	(Choi and Schweizer. 2006)
pUC18mTN7TGm-lacZ20	mini-Tn7T pour la construction de fusions β -galactosidase (phase2) Gm ^r	(Choi and Schweizer. 2006)
pUC18mTN7TpexsCEBA-lacZ	Fusion traductionnelle <i>pexsCEBA-lacZ</i>	Cette étude
pUC18mTN7Tpfha1-lacZ	Fusion traductionnelle <i>pfha1-lacZ</i>	brencic
pUC18mTN7Tpmag-lacZ	Fusion traductionnelle <i>pmag-lacZ</i>	brencic
pUC18mTN7T-pGacS	Promoteur et séquence entière du gène <i>gacS</i> clonés dans le vecteur	Cette étude
pUC18mTN7T-Hpt WT	Séquence du domaine Hpt de GacS fusionnée à <i>ptac</i> clonée dans le vecteur	Roux <i>et al</i> , soumis
pUC18mTN7T-Hpt mut	Séquence du sous domaine Hpt de GacS avec l'histidine conservée mutée en glutamine fusionnée à <i>ptac</i> clonée dans le vecteur	Roux <i>et al</i> , soumis
pUC18mTn7TGm-lux	Vecteur de fusion transcriptionnelle <i>luxCDABE</i> sur le mini-Tn7T; Gm ^r	(Choi and Schweizer. 2006)
pUC18mTN7TpexoS-lux	Fusion transcriptionnelle <i>pexoS-lux</i>	Cette étude
pIA101 Δ RBS-gfp	Plasmide d'expression de fusion traductionnelle <i>gfp</i> , Cb ^r	I. Attrée, non publié
pIA101 <i>pexoS-gfp</i>	Fusion traductionnelle <i>pexoS-lacZ</i>	Cette étude
pIA101 <i>pfha1-gfp</i>	Fusion traductionnelle <i>pfha1-gfp</i>	Cette étude
pIA101 <i>pmagA-gfp</i>	Fusion traductionnelle <i>pmag-gfp</i>	Cette étude
pIApG-lacZ	Fusion transcriptionnelle du promoteur <i>pcrG</i> du SST3 fusionné à <i>lacZ</i>	S. Elsen, non publié

Tableau 12 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude

Noms des oligos	Séquences
PExoS _{sh} (R)	5'-GGATCCGACGGACTCTGCTGA AGCGAT T-3'
PSE-exoS1 (F)	5'-GAATTCTGGTGGATGGCGGCCGG-3'
ExsCEBA-F	5'-GAATCCGCAGAGCCAGAAGCAGAAGG-3'

ExsCEBA-R	5'- <u>GGATCC</u> GGAAATCCAGAGTATTCGGCTG-3'
Fha1-F	5'- <u>GAATCC</u> GCCAGCAAAACGGGTACATCC-3'
Fha1-R	5'- <u>GGATCC</u> GGTGATGGTCAATCGCAGCGGC-3'
Mag-F	5'- <u>GAATCCT</u> GCCGAAGCTGCTGGAGCTG-3'
Mag-R	5'- <u>GGATCC</u> GGCACTCGAACCGAAGATACGC-3'
GacS-SmaI-F	5'- <u>CCCGGG</u> GAGCGTCGGCCATC-3'
GacS-XbaI-R	5'- <u>TCTAGA</u> AGAACAGGATGCGCATGGTC-3'
Mut-RsmA-F1	5'- <u>CCCGGG</u> AAGCCATCGGCGACACCAAC-3'
Mut-RsmA-R1	5'- <u>CCGGTGTACGGCGACTTCTCA</u> CATTCTTTCTCTCACGCGAA-3'
Mut-RsmA-F2	5'-GAAGTCGCCGTACACCGGGAG-3'
Mut-RsmA-R2	5'- <u>CCCGGG</u> GAGGATTCGAACCTCCGACC-3'
Mut-RsmA-R3	5'-CCGACCCGACGAGTCAGAATC-3'
RetS-F1 (F)	5'- <u>CCCGGG</u> ACTTCGCCGTGGTACGG-3'
RetS-R1 (R)	5'- <u>GAAGTCGCTCGGCAGGCT</u> CGCGACTCGCCGGTGTGC-3'
RetS-F2 (F)	5'-GAGCCTGCCGAGCGACTTCC-3'
RetS-R1 (R)	5'- <u>CCCGGG</u> CAGGGCGTCGCCCTG-3'
PSE-RsmA-F	5'-GGT <u>TCTAGA</u> AATATTCGCGTGAGGAGAAAGG-3'
PSE-RsmA-R	5'-CCA <u>AGCTTA</u> ATTAATGGTTTGGCTCTTGATC-3'
GacS VSV-G-F1	5'- <u>GCCCCGG</u> GCCGAGCTCGGCCAGTTGA-3'
GacS VSV-G-R1	5'- <u>TAATCTATTCA</u> TTCAATATCTGTATAGAGTTCGCTGGA GTCGAGGCT-3'
GacS VSV-G-F2	5'- <u>TATACAGATATTGAAATGAATAGATTAGGAAAATGA</u> CCATGCGCATCCTGTTCTTC-3'
GacS VSV-G-R2	5'- <u>GCCCCGG</u> GCGGGTCCGGTTGTAGGCGC-3'
CHAGacS VSV-G-F1	5'- <u>GCCCCGG</u> TAGTGCTGAAGTGGACCGG-3'
CHAGacS VSV-G-R1	5'- <u>TTTTCTAATCTATTCA</u> TTCAATATCTGTATAGGCCGA CCGCGTGCTCGG-3'
CHAGacS VSV-G-F2	5'- <u>TAT ACA GAT ATT GAA ATG AAT AGA TTA GGA AAA</u> <u>TGAT</u> CCTGA CGCTCAACCGGC-3'

CHAGacS VSV-G-R2	5'- <u>GCCCCGGG</u> ATCAGCATCGCGCCGGGTTT-3'
P-GacS-F	5'- <u>CCCCGGGC</u> AGTGTCTGGATCGTCCTCGAT-3'
P-GacS-R	5'- <u>CCAAGCTT</u> GGTCAGAGTTCGCTGGAGTCG-3'
ARB1-Ausubel	5'-GGCCAGGCCTGCAGATGATGNNNNNNNNNGTAT-3'
MCL211	5'-AAGCTGTGGTATGGCTGTGCA-3'
ARB2A-Ausubel	5'-GGCCAGGCCTGCAGATGATG-3'
MCL226	5'-AATTGTGAGCGGATAACAATTT-3'

Les bases soulignées indiquent les sites des enzymes de restriction, N symbolise n'importe quelle base A,T,G ou C et les séquences en gras représentent les séquences permettant les ajouts ou les délétions des SOE-PCR.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Ader, F., Le Berre, R., Faure, K., Gosset, P., Epaulard, O., Toussaint, B. et al. (2005) Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect Immun* **73**: 4263-4271.
- Aiello, D., Williams, J.D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N.P., Huang, J. et al. (2010) Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1988-1999.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H., and Shaw, J.F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**: 534-552.
- Alarcon, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2009) The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 2237-2244.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S. et al. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114-1128.
- Amiel, E., Lovewell, R.R., O'Toole, G.A., Hogan, D.A., and Berwin, B. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect Immun* **78**: 2937-2945.
- Anderson, G.G., Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A., and O'Toole, G.A. (2008) In vitro analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infect Immun* **76**: 1423-1433.
- Anthouard, R., and DiRita, V.J. (2013) Small-molecule inhibitors of toxT expression in *Vibrio cholerae*. *MBio* **4**.
- Armstrong, D.S., Grimwood, K., Carzino, R., Carlin, J.B., Olinsky, A., and Phelan, P.D. (1995) Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* **310**: 1571-1572.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156-163.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002) A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**: 475-485.
- Ballister, E.R., Lai, A.H., Zuckermann, R.N., Cheng, Y., and Mougous, J.D. (2008) In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3733-3738.

- Balloy, V., Verma, A., Kuravi, S., Si-Tahar, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2007) The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **196**: 289-296.
- Barbieri, J.T., and Sun, J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.
- Bardoel, B.W., van der Ent, S., Pel, M.J., Tommassen, J., Pieterse, C.M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2011) *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog* **7**: e1002206.
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J., and Mekalanos, J.J. (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* **483**: 182-186.
- Bastonero, S., Le Priol, Y., Armand, M., Bernard, C.S., Reynaud-Gaubert, M., Olive, D. et al. (2009) New microbicidal functions of tracheal glands: defective anti-infectious response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *PLoS One* **4**: e5357.
- Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., and Mattick, J.S. (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 3605-3613.
- Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *Biotechniques* **29**: 948-950, 952.
- Berg, H.C., and Anderson, R.A. (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* **245**: 380-382.
- Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gueguen, E., and Cascales, E. (2010) Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *J Bacteriol* **192**: 3850-3860.
- Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gavioli, M., Lloubes, R., and Cascales, E. (2011) Regulation of type VI secretion gene clusters by sigma54 and cognate enhancer binding proteins. *J Bacteriol* **193**: 2158-2167.
- Berthelot, P., Attree, I., Plesiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B., and Grattard, F. (2003) Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis* **188**: 512-518.
- Bezuidt, O.K., Klockgether, J., Elsen, S., Attree, I., Davenport, C.F., and Tummeler, B. (2013) Intracolonial genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics* **14**: 416.
- Bhuwan, M., Lee, H.J., Peng, H.L., and Chang, H.Y. (2012) Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *J Biol Chem* **287**: 1903-1914.

- Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., and Ribbeck, K. (2013) The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog* **9**: e1003526.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2005) Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **187**: 3898-3902.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**: 534-543.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027-3030.
- Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6507-6513.
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., and Mogk, A. (2009) Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J* **28**: 315-325.
- Bordi, C., Lamy, M.C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S. et al. (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* **76**: 1427-1443.
- Borlee, B.R., Geske, G.D., Blackwell, H.E., and Handelsman, J. (2010a) Identification of synthetic inducers and inhibitors of the quorum-sensing regulator LasR in *Pseudomonas aeruginosa* by high-throughput screening. *Appl Environ Microbiol* **76**: 8255-8258.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R. (2010b) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* **75**: 827-842.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Benjamin, D.K., Jr., Bradley, J., Guidos, R.J., Jones, R.N. et al. (2013) 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **56**: 1685-1694.
- Boucher, R.C. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* **23**: 146-158.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**: 104.
- Bradley, D.E. (1980) A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**: 146-154.

- Bragonzi, A., Worlitzsch, D., Pier, G.B., Timpert, P., Ulrich, M., Hentzer, M. et al. (2005) Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* **192**: 410-419.
- Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lore, N.I. et al. (2012) Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLoS One* **7**: e52330.
- Brencic, A., and Lory, S. (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* **72**: 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**: 434-445.
- Brutinel, E.D., and Yahr, T.L. (2008) Control of gene expression by type III secretory activity. *Curr Opin Microbiol* **11**: 128-133.
- Bucior, I., Pielage, J.F., and Engel, J.N. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog* **8**: e1002616.
- Bull, C.T., Duffy, B., Voisard, C., Defago, G., Keel, C., and Haas, D. (2001) Characterization of spontaneous gacS and gacA regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 327-336.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O'Gara, F. (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**: 405-418.
- Bush, K., and Macielag, M.J. (2010) New beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat* **20**: 1277-1293.
- Cabral, D.A., Loh, B.A., and Speert, D.P. (1987) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* **22**: 429-431.
- Carmeli, Y., Troillet, N., Karchmer, A.W., and Samore, M.H. (1999) Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* **159**: 1127-1132.
- Casabona, M.G., Silverman, J.M., Sall, K.M., Boyer, F., Coute, Y., Poirel, J. et al. (2013) An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **15**: 471-486.
- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H., and Dove, S.L. (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18947-18952.

- Cattoir, V., Narasimhan, G., Skurnik, D., Aschard, H., Roux, D., Ramphal, R. et al. (2013) Transcriptional response of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory mucus. *MBio* **3**: e00410-00412.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., and Bally, M. (1997) Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **24**: 1169-1178.
- Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., and Georgellis, D. (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**: 2009-2012.
- Chevallet, M., Diemer, H., Van Dorssealer, A., Villiers, C., and Rabilloud, T. (2007) Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics* **7**: 1757-1770.
- Chiang, P., and Burrows, L.L. (2003) Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 2374-2378.
- Choi, K.H., and Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**: 153-161.
- Choi, K.H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.R., and Schweizer, H.P. (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* **2**: 443-448.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., and Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**: 30829-30837.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P. (2002) Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**: 762-763.
- Chung, J.C., Rzhepishevskaya, O., Ramstedt, M., and Welch, M. (2013) Type III secretion system expression in oxygen-limited *Pseudomonas aeruginosa* cultures is stimulated by isocitrate lyase activity. *Open Biol* **3**: 120-131.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E., and Hoiby, N. (2005) Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2276-2282.
- Close, D.M., Ripp, S., and Sayler, G.S. (2009) Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors (Basel)* **9**: 9147-9174.
- Coggan, K.A., and Wolfgang, M.C. (2012) Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol* **14**: 47-70.
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C. et al. (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* **14**: 1913-1928.

- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., and Lea, S.M. (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G.R. (2010) The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular 'toxin' delivery. *Biol Chem* **391**: 745-751.
- Coulon, C., Vinogradov, E., Filloux, A., and Sadovskaya, I. (2010) Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One* **5**: e14220.
- Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C.F., and Tummeler, B. (2011) Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol* **13**: 1690-1704.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 6164-6167.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**: 76-85.
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**: 2916-2924.
- Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I. et al. (2002) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. *Infect Immun* **70**: 3973-3977.
- Dandekar, A.A., and Greenberg, E.P. (2013) Microbiology: Plan B for quorum sensing. *Nat Chem Biol* **9**: 292-293.
- Das, T., and Manfield, M. (2013) Phenazine production enhances extracellular DNA release via hydrogen peroxide generation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun Integr Biol* **6**: e23570.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2004) A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**: 297-308.
- Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G.W., and Yahr, T.L. (2006) Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* **74**: 3334-3341.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E., and Ramphal, R. (2002) fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **184**: 5240-5250.

- Davenport, C.F., Wiehlmann, L., Reva, O.N., and Tummeler, B. (2009) Visualization of *Pseudomonas* genomic structure by abundant 8-14mer oligonucleotides. *Environ Microbiol* **11**: 1092-1104.
- Davies, J.A., Harrison, J.J., Marques, L.L., Foglia, G.R., Stremick, C.A., Storey, D.G. et al. (2007) The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 32-46.
- de Bentzmann, S., Giraud, C., Bernard, C.S., Calderon, V., Ewald, F., Plesiat, P. et al. (2012) Unique biofilm signature, drug susceptibility and decreased virulence in *Drosophila* through the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system PprAB. *PLoS Pathog* **8**: e1003052.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., and Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- de Pace, F., Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M.P., Guedes Stehling, E. et al. (2011) Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology* **157**: 2954-2962.
- Delhaes, L., Monchy, S., Frealte, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S. et al. (2012) The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One* **7**: e36313.
- Delic-Attree, I., Toussaint, B., Froger, A., Willison, J.C., and Vignais, P.M. (1996) Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. *Microbiology* **142** (Pt 10): 2785-2793.
- DePamphilis, M.L., and Adler, J. (1971a) Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **105**: 384-395.
- DePamphilis, M.L., and Adler, J. (1971b) Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **105**: 376-383.
- Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L. et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**: 87-96.
- Dong, Y.H., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. (2013) The global regulator Crc plays a multifaceted role in modulation of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen* **2**: 161-172.
- Dubnau, D., and Losick, R. (2006) Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* **61**: 564-572.
- Duffy, B.K., and Defago, G. (2000) Controlling instability in gacS-gacA regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3142-3150.

- Duncan, M.C., Linington, R.G., and Auerbuch, V. (2012) Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 5433-5441.
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., and Filloux, A. (2001) The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* **262**: 147-153.
- Elsen, S., Ragno, M., and Attree, I. (2011) PtrA is a periplasmic protein involved in Cu tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**: 3376-3378.
- Elsen, S., Efthymiou, G., Peteinatos, P., Diallinas, G., Kyritsis, P., and Moulis, J.M. (2010) A bacteria-specific 2[4Fe-4S] ferredoxin is essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **10**: 271.
- Engel, J., and Eran, Y. (2011) Subversion of mucosal barrier polarity by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **2**: 114.
- Falagas, M.E., and Kasiakou, S.K. (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40**: 1333-1341.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A.R. (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**: 2659-2669.
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 1648-1652.
- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570-1583.
- Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1998) Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* **180**: 6224-6231.
- Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G. et al. (2011) Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* **79**: 1176-1186.
- Flashner, Y., Mamroud, E., Tidhar, A., Ber, R., Aftalion, M., Gur, D. et al. (2004) Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. *Infect Immun* **72**: 908-915.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623-633.

- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Hoiby, N., and Molin, S. (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**: 841-851.
- Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaefer, V., Camara, M., Visca, P., and Imperi, F. (2013) The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.
- Frank, D.W. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**: 621-629.
- Friedman, L., and Kolter, R. (2004) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 675-690.
- Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Jones, A.K., Fulcher, N.B., Urbanowski, M.L., Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* **192**: 3553-3564.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133-154.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T. et al. (2004) The ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT contributes to its biological activities. *Infect Immun* **72**: 546-558.
- Georg, J., and Hess, W.R. (2011) cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 286-300.
- Gloag, E.S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L.M. et al. (2013) Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11541-11546.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., and Lory, S. (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**: 745-754.
- Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., and Lory, S. (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* **23**: 249-259.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**: 4741-4750.
- Gripenland, J., Netterling, S., Loh, E., Tiensuu, T., Toledo-Arana, A., and Johansson, J. (2010) RNAs: regulators of bacterial virulence. *Nat Rev Microbiol* **8**: 857-866.
- Guzzo, J., Murgier, M., Filloux, A., and Lazdunski, A. (1990) Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 942-948.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.
- Hancock, R.E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**: S93-99.
- Harrison, F. (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**: 917-923.
- Hauser, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**: 654-665.
- Hauser, A.R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Valles, J., Engel, J.N., and Rello, J. (2002) Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* **30**: 521-528.
- Hausler, S., Tummler, B., Weissbrodt, H., Rohde, M., and Steinmetz, I. (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* **29**: 621-625.
- Hayes, C.S., Aoki, S.K., and Low, D.A. (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* **44**: 71-90.
- Hayes, F. (2003) Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet* **37**: 3-29.
- He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T. et al. (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2530-2535.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **184**: 1046-1056.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D. et al. (2006) Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* **355**: 1026-1036.
- Henriksson, M.L., Sundin, C., Jansson, A.L., Forsberg, A., Palmer, R.H., and Hallberg, B. (2002) Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem J* **367**: 617-628.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**: 59-72.
- Hogardt, M., and Heesemann, J. (2010) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**: 557-562.
- Hogardt, M., Hoboth, C., Schmoldt, S., Henke, C., Bader, L., and Heesemann, J. (2007) Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **195**: 70-80.

- Hoiby, N. (1977) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*: 1-96.
- Hoiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.O. et al. (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* **3**: 55-65.
- Holloway, B.W. (1955) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **13**: 572-581.
- Hong, Y.Q., and Ghebrehiwet, B. (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* **62**: 133-138.
- Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R. et al. (2010) A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **7**: 25-37.
- Hsu, F., Schwarz, S., and Mougous, J.D. (2009) TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **72**: 1111-1125.
- Hsu, J.L., Chen, H.C., Peng, H.L., and Chang, H.Y. (2008) Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* **283**: 9933-9944.
- Hunter, R.C., Klepac-Ceraj, V., Lorenzi, M.M., Grotzinger, H., Martin, T.R., and Newman, D.K. (2012) Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**: 738-745.
- Imperi, F., Ciccocanti, F., Perdomo, A.B., Tiburzi, F., Mancone, C., Alonzi, T. et al. (2009) Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics* **9**: 1901-1915.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T., and Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol* **78**: 158-172.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jarvis, W.R. (2003) Benchmarking for prevention: the Centers for Disease Control and Prevention's National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system experience. *Infection* **31 Suppl 2**: 44-48.
- Jing, X., Jaw, J., Robinson, H.H., and Schubot, F.D. (2010) Crystal structure and oligomeric state of the RetS signaling kinase sensory domain. *Proteins* **78**: 1631-1640.

- Jones, A.K., Fulcher, N.B., Balzer, G.J., Urbanowski, M.L., Pritchett, C.L., Schurr, M.J. et al. (2010) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through mucA mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *J Bacteriol* **192**: 5709-5717.
- Juhas, M., Eberl, L., and Tummeler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**: 459-471.
- Kanack, K.J., Runyen-Janecky, L.J., Ferrell, E.P., Suh, S.J., and West, S.E. (2006) Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology* **152**: 3485-3496.
- Kanamaru, S. (2009) Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4067-4068.
- Kang, Y., Nguyen, D.T., Son, M.S., and Hoang, T.T. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 beta-oxidation operon. *Microbiology* **154**: 1584-1598.
- Kang, Y., Lunin, V.V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M.J., and Hoang, T.T. (2009) The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion exsCEBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **73**: 120-136.
- Kapitein, N., and Mogk, A. (2013) Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Curr Opin Microbiol* **16**: 52-58.
- Kauppi, A.M., Nordfelth, R., Hagglund, U., Wolf-Watz, H., and Elofsson, M. (2003) Salicylanilides are potent inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol* **529**: 97-100.
- Kay, E., Dubuis, C., and Haas, D. (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17136-17141.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**: 634-644.
- Kesarwani, M., Hazan, R., He, J., Que, Y.A., Apidianakis, Y., Lesic, B. et al. (2011) A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS Pathog* **7**: e1002192.
- Kim, J., Ahn, K., Min, S., Jia, J., Ha, U., Wu, D., and Jin, S. (2005) Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**: 3575-3587.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., and Tummeler, B. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol* **2**: 150.
- Kohler, T., Perron, G.G., Buckling, A., and van Delden, C. (2010) Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **6**: e1000883.

- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M.G., Shen, L., and Duan, K. (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol Microbiol* **88**: 784-797.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kresse, A.U., Dinesh, S.D., Larbig, K., and Romling, U. (2003) Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol Microbiol* **47**: 145-158.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A. et al. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kulasekara, B.R., Kulasekara, H.D., Wolfgang, M.C., Stevens, L., Frank, D.W., and Lory, S. (2006) Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 4037-4050.
- 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. *Mol Microbiol* **55**: 368-380.
- Kung, V.L., Ozer, E.A., and Hauser, A.R. (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 621-641.
- Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A., and Rooijackers, S.H. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* **188**: 386-393.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H., and Haas, D. (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**: 241-253.
- Lapouge, K., Sineva, E., Lindell, M., Starke, K., Baker, C.S., Babitzke, P., and Haas, D. (2007) Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Microbiol* **66**: 341-356.
- Laskowski, M.A., and Kazmierczak, B.I. (2006) Mutational analysis of RetS, an unusual sensor kinase-response regulator hybrid required for *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Infect Immun* **74**: 4462-4473.
- Laskowski, M.A., Osborn, E., and Kazmierczak, B.I. (2004) A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **54**: 1090-1103.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146.

- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**: 599-606.
- Laursen, J.B., and Nielsen, J. (2004) Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev* **104**: 1663-1686.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Defago, G., Keel, C., and Haas, D. (1998) Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **180**: 3187-3196.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S. et al. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**: R90.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S. et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4154-4159.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., and Rahme, L.G. (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* **155**: 2845-2855.
- Letoffe, S., Redeker, V., and Wandersman, C. (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol* **28**: 1223-1234.
- Letoffe, S., Nato, F., Goldberg, M.E., and Wandersman, C. (1999) Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol* **33**: 546-555.
- Linares, J.F., Lopez, J.A., Camafeita, E., Albar, J.P., Rojo, F., and Martinez, J.L. (2005) Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1384-1391.
- Lory, S., Merighi, M., and Hyodo, M. (2009) Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 51-52.
- Lujan, A.M., Macia, M.D., Yang, L., Molin, S., Oliver, A., and Smania, A.M. (2011) Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One* **6**: e27842.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.
- Lykken, G.L., Chen, G., Brutinel, E.D., Chen, L., and Yahr, T.L. (2006) Characterization of ExsC and ExsD self-association and heterocomplex formation. *J Bacteriol* **188**: 6832-6840.

- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J. (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* **5**: e1000354.
- MacGregor, C.H., Wolff, J.A., Arora, S.K., and Phibbs, P.V., Jr. (1991) Cloning of a catabolite repression control (*crc*) gene from *Pseudomonas aeruginosa*, expression of the gene in *Escherichia coli*, and identification of the gene product in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 7204-7212.
- MacGregor, C.H., Arora, S.K., Hager, P.W., Dail, M.B., and Phibbs, P.V., Jr. (1996) The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *pyrE-crc-rph* region and the purification of the *crc* gene product. *J Bacteriol* **178**: 5627-5635.
- Mackman, N., Nicaud, J.M., Gray, L., and Holland, I.B. (1985) Genetical and functional organisation of the *Escherichia coli* haemolysin determinant 2001. *Mol Gen Genet* **201**: 282-288.
- Marden, J.N., Diaz, M.R., Walton, W.G., Gode, C.J., Betts, L., Urbanowski, M.L. et al. (2013) An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 15055-15060.
- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P.W., Campbell, J.I., Jensen, P. et al. (1999) Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **145** (Pt 6): 1349-1357.
- Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., and Thomashow, L.S. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **183**: 6454-6465.
- Mavrodi, D.V., Parejko, J.A., Mavrodi, O.V., Kwak, Y.S., Weller, D.M., Blankenfeldt, W., and Thomashow, L.S. (2013) Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environ Microbiol* **15**: 675-686.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**: 508-515.
- McDermott, J.E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E.D. et al. (2011) Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infect Immun* **79**: 23-32.
- McIsaac, S.M., Stadnyk, A.W., and Lin, T.J. (2012) Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J Leukoc Biol* **92**: 977-985.
- Mern, D.S., Ha, S.W., Khodaverdi, V., Gliese, N., and Gorisch, H. (2010) A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators. *Microbiology* **156**: 1505-1516.

- Meshulam, T., Verbrugh, H.A., and Verhoef, J. (1982) Opsonization and phagocytosis of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Eur J Clin Microbiol* **1**: 112-117.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., and Filloux, A. (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **13**: 1666-1681.
- Morales, D.K., Jacobs, N.J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J.R., and Hogan, D.A. (2010) Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol* **78**: 1379-1392.
- Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martinez, J.L., and Rojo, F. (2004) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**: 1337-1344.
- Morris, E.R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R.V., Lovelock, L. et al. (2013) Structural Rearrangement in an RsmA/CsrA Ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* Creates a Dimeric RNA-Binding Protein, RsmN. *Structure* **21**: 1659-1671.
- Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13**: 3128-3138.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., and Mekalanos, J.J. (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol* **9**: 797-803.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A. et al. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526-1530.
- Mulcahy, H., and Lewenza, S. (2011) Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS One* **6**: e23307.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **4**: e1000213.
- Narbad, A., Hewlins, M.J., Gacesa, P., and Russell, N.J. (1990) The use of ¹³C-n.m.r. spectroscopy to monitor alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **267**: 579-584.
- Newman, J.R., and Fuqua, C. (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene* **227**: 197-203.
- Nguyen, D., and Singh, P.K. (2006) Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8305-8306.

- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3281-3285.
- O'Callaghan, J., Reen, F.J., Adams, C., and O'Gara, F. (2011) Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY. *Microbiology* **157**: 3417-3428.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**: 91-109.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., and Jung, R. (2004) National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4606-4610.
- Oliver, A., Baquero, F., and Blazquez, J. (2002) The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **43**: 1641-1650.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., and Blazquez, J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1254.
- Pamp, S.J., Gjermansen, M., Johansen, H.K., and Tolker-Nielsen, T. (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol* **68**: 223-224.
- Pan, N., Lee, C., and Goguen, J. (2007) High throughput screening for small-molecule inhibitors of type III secretion in *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol* **603**: 367-375.
- Papanikou, E., Karamanou, S., and Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**: 839-851.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., and Zhou, W.W. (1990) Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **58**: 3009-3014.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**: 715-727.
- Pedersen, S.S., Hoiby, N., Espersen, F., and Koch, C. (1992) Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* **47**: 6-13.
- Pell, L.G., Kanelis, V., Donaldson, L.W., Howell, P.L., and Davidson, A.R. (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4160-4165.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3127-3132.

- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2011) SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Bacteriol* **193**: 6614-6628.
- Petrova, O.E., Schurr, J.R., Schurr, M.J., and Sauer, K. (2012) Microcolony formation by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* requires pyruvate and pyruvate fermentation. *Mol Microbiol* **86**: 819-835.
- Phillips, R.M., Six, D.A., Dennis, E.A., and Ghosh, P. (2003) In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **278**: 41326-41332.
- Pier, G.B. (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8822-8828.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 38-55.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C. et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528-1533.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.
- Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M. et al. (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* **189**: 4223-4233.
- Rao, J., Damron, F.H., Basler, M., Digiandomenico, A., Sherman, N.E., Fox, J.W. et al. (2011) Comparisons of Two Proteomic Analyses of Non-Mucoid and Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Cystic Fibrosis Patient. *Front Microbiol* **2**: 162.
- Rappas, M., Bose, D., and Zhang, X. (2007) Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 110-116.
- Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4885-4890.
- Rau, M.H., Hansen, S.K., Johansen, H.K., Thomsen, L.E., Workman, C.T., Nielsen, K.F. et al. (2010) Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition

- from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ Microbiol* **12**: 1643-1658.
- Read, R.C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T. et al. (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* **72**: 2271-2277.
- Reva, O.N., and Tummler, B. (2004) Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns. *BMC Bioinformatics* **5**: 90.
- Rietsch, A., and Mekalanos, J.J. (2006) Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**: 807-820.
- Rietsch, A., Wolfgang, M.C., and Mekalanos, J.J. (2004) Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **72**: 1383-1390.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8006-8011.
- Robert-Genthon, M., Casabona, M.G., Neves, D., Coute, Y., Ciceron, F., Elsen, S. et al. (2013) Unique features of a *Pseudomonas aeruginosa* alpha2-macroglobulin homolog. *MBio* **4**.
- Robertson, H.M., and Lampe, D.J. (1995) Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol Biol Evol* **12**: 850-862.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498-504.
- Rodriguez-Rojas, A., Mena, A., Martin, S., Borrell, N., Oliver, A., and Blazquez, J. (2009) Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiology* **155**: 1050-1057.
- Romling, U., Greipel, J., and Tummler, B. (1995) Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Mol Microbiol* **17**: 323-332.
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q. et al. (2010) Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* **5**: e8842.
- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* **475**: 343-347.
- Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A. et al. (2013) Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* **496**: 508-512.

- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W. et al. (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6712-6717.
- Salunkhe, P., Smart, C.H., Morgan, J.A., Panagea, S., Walshaw, M.J., Hart, C.A. et al. (2005) A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J Bacteriol* **187**: 4908-4920.
- Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E. et al. (2012) The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J Biol Chem* **287**: 27095-27105.
- Sargent, F. (2007) The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* **35**: 835-847.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K. et al. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**: 2959-2969.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* **22**: 4957-4967.
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F.C., Jelesarov, I., Haas, D., and Allain, F.H. (2007) Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 807-813.
- Schurr, M.J. (2013) Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, Psl or alginate? *J Bacteriol* **195**: 1623-1626.
- Schuster, M., and Greenberg, E.P. (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**: 73-81.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**: 973-985.
- Schweizer, H.P., and Hoang, T.T. (1995) An improved system for gene replacement and xyleE fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **158**: 15-22.
- Shen, D.K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., and Toussaint, B. (2006) PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**: 1121-1129.
- Shen, D.K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D. et al. (2008) Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci* **21**: 103-109.
- Silo-Suh, L., Suh, S.J., Sokol, P.A., and Ohman, D.E. (2002) A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis

- shows AlgT (sigma-22) and RhlR contribute to pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15699-15704.
- Silverman, J.M., Austin, L.S., Hsu, F., Hicks, K.G., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2011) Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion activation. *Mol Microbiol* **82**: 1277-1290.
- Silverman, M., and Simon, M. (1974) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**: 73-74.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A. et al. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8487-8492.
- Smith, H., Wiersma, K., Venema, G., and Bron, S. (1985) Transformation in *Bacillus subtilis*: further characterization of a 75,000-dalton protein complex involved in binding and entry of donor DNA. *J Bacteriol* **164**: 201-206.
- Son, M.S., Matthews, W.J., Jr., Kang, Y., Nguyen, D.T., and Hoang, T.T. (2007) In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* **75**: 5313-5324.
- Sonnleitner, E., and Haas, D. (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 63-79.
- Sorger-Domenigg, T., Sonnleitner, E., Kaberdin, V.R., and Blasi, U. (2007) Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA RsmY. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 769-773.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., and Bleves, S. (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 3124-3132.
- Stevens, A.M., Schuster, M., and Rumbaugh, K.P. (2012) Working together for the common good: cell-cell communication in bacteria. *J Bacteriol* **194**: 2131-2141.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J. et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Suarez, G., Sierra, J.C., Erova, T.E., Sha, J., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. (2010) A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol* **192**: 155-168.
- Sun, J., and Barbieri, J.T. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**: 32794-32800.

- Sundin, C., Wolfgang, M.C., Lory, S., Forsberg, A., and Frithz-Lindsten, E. (2002) Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **33**: 265-277.
- Takase, H., Nitantai, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **68**: 1834-1839.
- Tempel, R., Lai, X.H., Crosa, L., Kozlowicz, B., and Heffron, F. (2006) Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun* **74**: 5095-5105.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009) Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem* **284**: 15762-15770.
- Thomas, N.A., Ma, I., Prasad, M.E., and Rafuse, C. (2012) Expanded roles for multicargo and class 1B effector chaperones in type III secretion. *J Bacteriol* **194**: 3767-3773.
- Tischler, A.D., and Camilli, A. (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* **53**: 857-869.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416-421.
- Tremblay, J., and Deziel, E. (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* **48**: 509-515.
- Tummler, B., Koopmann, U., Grothues, D., Weissbrodt, H., Steinkamp, G., and von der Hardt, H. (1991) Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **29**: 1265-1267.
- Urbanowski, M.L., Brutinel, E.D., and Yahr, T.L. (2007) Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **75**: 4432-4439.
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6911-6916.
- Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1999) Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect Immun* **67**: 914-920.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., and Haas, D. (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* **50**: 1361-1379.
- Valverde, C., Lindell, M., Wagner, E.G., and Haas, D. (2004) A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* **279**: 25066-25074.

- van den Broek, D., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B. (2005a) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1686-1697.
- van den Broek, D., Chin, A.W.T.F., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J. (2005b) Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *J Bacteriol* **187**: 593-600.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S. et al. (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 171-176.
- Vincent, F., Round, A., Reynaud, A., Bordi, C., Filloux, A., and Bourne, Y. (2010) Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environ Microbiol* **12**: 1775-1786.
- West, S.E., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* **176**: 7532-7542.
- Whiteley, M., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 4356-4360.
- Wihlmann, L., Cramer, N., Ulrich, J., Hedtfeld, S., Weissbrodt, H., and Tummeler, B. (2012) Effective prevention of *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis centre - results of a 10-year prospective study. *Int J Med Microbiol* **302**: 69-77.
- Wihlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G. et al. (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8101-8106.
- Wilder, C.N., Allada, G., and Schuster, M. (2009) Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun* **77**: 5631-5639.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9792-9797.
- Wilhelm, S., Tommassen, J., and Jaeger, K.E. (1999) A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986.
- Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010) *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* **15**: 1037-1056.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003a) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**: 253-263.
- Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q. et al. (2003b) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and

- environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8484-8489.
- Wu, W., and Jin, S. (2005) PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol* **187**: 6058-6068.
- Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H.V., and Jin, S. (2004) MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 7575-7585.
- Wurtzel, O., Yoder-Himes, D.R., Han, K., Dandekar, A.A., Edelheit, S., Greenberg, E.P. et al. (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* **8**: e1002945.
- Yabuuchi, A.O.a.E. (1972) Characterization of "Pyomelanin"-Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *INTERNATIONAL JOURNAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* **22**: 53-64.
- Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2006) Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **62**: 631-640.
- Yahr, T.L., Goranson, J., and Frank, D.W. (1996) Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* **22**: 991-1003.
- Yahr, T.L., Hovey, A.K., Kulich, S.M., and Frank, D.W. (1995) Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* **177**: 1169-1178.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.
- Zaat, S.A., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., van Brussel, A.A., Okker, R.J., and Lugtenberg, B.J. (1987) Induction of the nodA promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J Bacteriol* **169**: 198-204.
- Zhang, J.H., Chung, T.D., and Oldenburg, K.R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**: 67-73.
- Zheng, Z., Chen, G., Joshi, S., Brutinel, E.D., Yahr, T.L., and Chen, L. (2007) Biochemical characterization of a regulatory cascade controlling transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Biol Chem* **282**: 6136-6142.
- Zhou, H., Luo, M., Cai, X., Tang, J., Niu, S., Zhang, W. et al. (2011) Crystal structure of a novel dimer form of FlgD from *P. aeruginosa* PAO1. *Proteins* **79**: 2346-2351.
- Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G. et al. (2003) GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 634-644.

ANNEXES

Poster Présenté lors de la conférence « Pseudomonas 2013 » à Lausanne du 7 au 11 septembre 2013.

« Truncation of the GacS histidine kinase of the cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* CHA isolate shapes its virulence specificities »

Khady M. Sall¹, Maria G. Casabona¹, Christophe Bordi², Philippe Huber¹, Sophie de Bentzmann², Ina Attrée¹ and Sylvie Elsen¹

¹INSERM UMR-S1036; Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, ERL5261 CNRS, iRTSV, CEA/Grenoble, France

²CNRS-Aix Marseille University; Laboratory for Engineering of Macromolecular System, IMM, Marseille, France

Abstract :

Pseudomonas aeruginosa, a human opportunist, is capable of provoking acute and chronic infections that are associated with a defined set of virulence factors. During chronic infections, the bacterium accumulates mutations that silence some and activate other genes. Here we show that an isolate from a chronic infection in cystic fibrosis patient exhibits a unique phenotype due to a 426bp deletion in the 3' end of *gacS* encoding an essential regulatory protein. This mutation disturbs the Gac/Rsm pathway leading to depletion of small regulatory RNAs, and in consequence leads to permanent activation of Type Three Secretion System (T3SS), while switching off the expression of polysaccharide Pel, and the HSI-1 Type Six Secretion System (H1-T6SS). Having a mutation in the *mucA* gene, this strain exhibits high alginate synthesis which provides it with a mucoid phenotype. The strain exhibits also full ability to swim, swarm and twitch, due to active flagellum and type 4 pili that may contribute to its aggressive phenotype. Thus, unlike classical scheme of balance between virulence factors, clinical strains may adapt to local niche by expressing both aggressive virulence factors and exopolysaccharides that are required for biofilm formation.

Truncation of the GacS histidine kinase of the cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* CHA isolate shapes its virulence specificities

Khady M. Sall¹, Maria G. Casabona¹, Christophe Bordi², Philippe Huber¹, Sophie de Bentzmann², Ina Attrée¹ and Sylvie Elsen¹

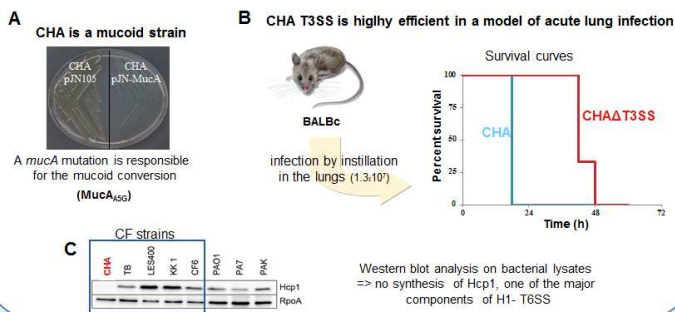
¹INSERM UMR-S1036; Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, ERL5261 CNRS, IRTSV, CEA/Grenoble, France

²CNRS-Aix Marseille University; Laboratory for Engineering of Macromolecular System, IMM, Marseille, France

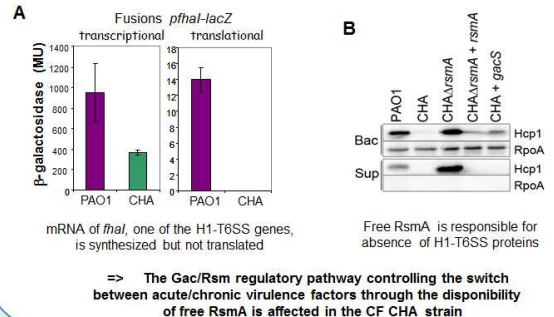
Abstract

Pseudomonas aeruginosa, a human opportunist, is capable of provoking acute and chronic infections that are associated with a defined set of virulence factors. During chronic infections, the bacterium accumulates mutations that silence some and activate other genes. Here we show that an isolate from a chronic infection in cystic fibrosis patient exhibits a unique phenotype due to a 426bp deletion in the 3' end of *gacS* encoding an essential regulatory protein. This mutation disturbs the Gac/Rsm pathway leading to depletion of small regulatory RNAs, and in consequence leads to permanent activation of Type Three Secretion System (T3SS), while switching off the expression of polysaccharide Pel, and the HSI-1 Type Six Secretion System (H1-T6SS). Having a mutation in the *mucA* gene, this strain exhibits high alginate synthesis which provides it with a mucoid phenotype. The strain exhibits also full ability to swim, swarm and twitch, due to active flagellum and type 4 pili that may contribute to its aggressive phenotype. Thus, unlike classical scheme of balance between virulence factors, clinical strains may adapt to local niche by expressing both aggressive virulence factors and exopolysaccharides that are required for biofilm formation.

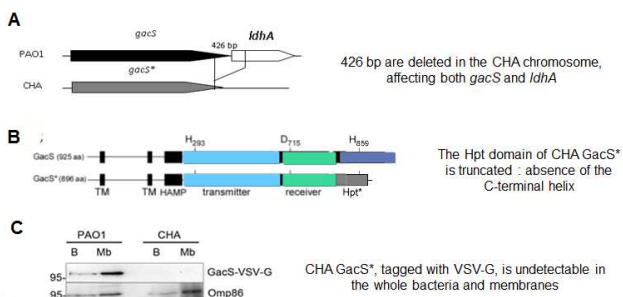
A CF mucoid strain with high T3SS cytotoxicity and no T6SS-1 activity



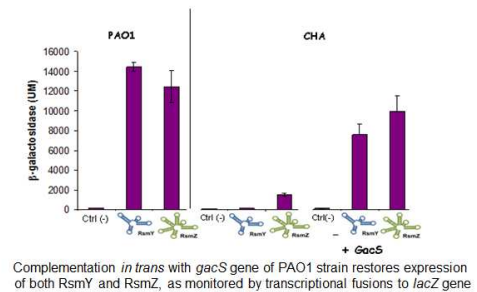
RsmA exerts a constant inhibition of H1-T6SS mRNA translation



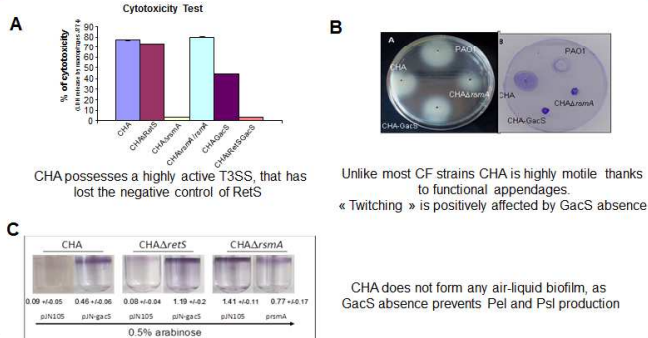
Deletion in *gacS* leads to absence of the Histidine kinase



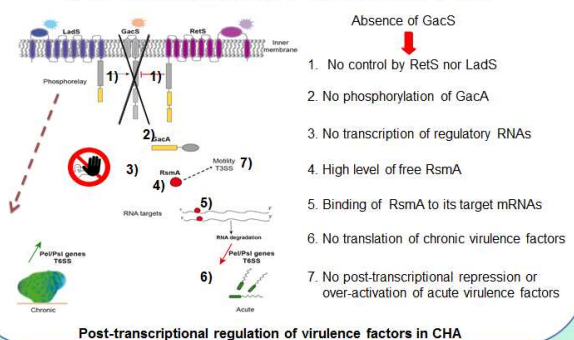
Absence of GacS strongly affects the expression of the two small regulatory RNAs RsmY and RsmZ



Impacts of GacS absence on virulence traits of CHA



The switch between chronic and acute infection, orchestrated by the Gac/Rsm pathway, is not functional in CHA



Take-home messages :

- CHA, a CF strain that displays a unique virulence phenotype : high expression of both T3SS and alginates
- A genomic deletion leads to the absence of both the GacS kinase and the two small regulatory RNAs RsmY and RsmZ
- => the GacS/Rsm pathway is disconnected from the negative control of the master regulatory gene RetS occurring during chronic infection
- => free RsmA can continuously exert an over-repression on its targets.

Publications

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

**A *gacS* deletion in *Pseudomonas aeruginosa*
cystic fibrosis isolate CHA shapes its virulence**

Khady Mayebine Sall,^{1,2,3,4} Maria Guillermina Casabona,^{1,2,3,4} Christophe Bordi,⁵ Philippe
Huber,^{1,2,3,4} Sophie de Bentzmann,⁵ Ina Attree,^{1,2,3,4} Sylvie Elsen,^{1,2,3,4,#}

¹INSERM, UMR-S 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France;²CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France;³UJF-Grenoble 1, F-38041 Grenoble, France. ⁴CEA, DSV/iRTSV, F-38054 Grenoble, France ; ⁵Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, UMR 7255 CNRS - Aix Marseille University, Marseille, France.

Running title: *gacS* mutation shapes CF strain virulence

Correspondent footnote: Address correspondence to Sylvie Elsen, sylvie.elsen@cea.fr

29 **ABSTRACT**

30

31 *Pseudomonas aeruginosa*, a human opportunist, is capable of provoking acute and
32 chronic infections that are associated with a defined set of virulence factors. During
33 chronic infections, the bacterium accumulates mutations that silence some and activate
34 other genes. Here we show that a mucoid strain, named CHA, isolated from a cystic
35 fibrosis patient exhibits a unique virulence phenotype featuring an active Type III
36 Secretion System (T3SS, hallmark of acute infections) and no synthesis of Type VI
37 Secretion System (H1-T6SS) involved in bacterial competition in multi-species
38 biofilms. This virulence profile is due to a 426bp deletion in the 3' end of the *gacS* gene
39 encoding an essential regulatory protein. The resulting absence of GacS disturbs the
40 Gac/Rsm pathway leading to depletion of small regulatory RNAs, and in consequence to
41 permanent activation of T3SS, while switching off the expression of H1-T6SS and Pel
42 polysaccharides. The CHA isolate also exhibits full ability to swim and twitch, due to
43 active flagellum and type IVa pili. Thus, unlike classical scheme of balance between
44 virulence factors, clinical strains may adapt to local niche by expressing both aggressive
45 virulence factors and alginate exopolysaccharide that promotes persistence.

46

47

48

49 **INTRODUCTION**

50 *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram negative bacterium, able to trigger either
51 severe acute or chronic human infections, depending on environmental signals it encounters.
52 The persistence of the bacterium during decades in the lungs of individuals with cystic
53 fibrosis (CF) is associated with massive and inefficient inflammation contributing to airway

54 epithelium destruction, decline of lung function and frequent death due to respiratory failure
55 (1). During chronic infection, *P. aeruginosa* has to survive and adapt to the stressful
56 environment encountered in the CF lungs where it is indeed continuously exposed to
57 antibiotics, oxidative and osmotic stresses as well as active host immune system. The CF
58 respiratory mucus has been shown to directly impact bacterial gene transcription, a response
59 which differs whether strains are or not CF-adapted (2, 3). In the PAK reference strain, CF
60 airway fluid leads to a decreased synthesis of flagellin, a well-known pro-inflammatory
61 element, and promotes a Rhl-dependent Quorum Sensing (QS) response, relying on C4-HSL
62 autoinducer molecule (2). A CF mucoid strain triggers in response to CF niche synthesis of
63 enzymes protecting the bacteria against oxidative stress and activation of genes encoding
64 HSI-1 Type VI Secretion (H1-T6SS), a cell-cell contact system that targets Gram-negative
65 bacteria and plays a role in bacterial competition (4-6). The CF mucus also unexpectedly
66 represses alginate production (3). In addition, expression of two small RNAs (PA2G_03487.1
67 and PA2G_05393.1) with putative regulatory roles was affected, pointing out the major effect
68 of contact with CF mucus on bacterial physiology (3).

69 Besides these immediate adaptive responses, *P. aeruginosa* is also prone to
70 accumulate point mutations and/or significant genomic rearrangements induced by extrinsic
71 and intrinsic factors associated with CF chronic disease (1, 7). Mutations in global regulatory
72 genes, such as *lasR*, *vfr*, *rpoS*, or other regulatory genes such as *mucA*, are frequently
73 observed in CF isolates that profoundly affect virulence gene expression (1, 8). The most
74 obvious phenotypic changes of *P. aeruginosa* along CF disease course are mucoidy
75 conversion, Small Colony Variants (SCV) emergence, antibiotic multi-resistance, loss of
76 motility and QS-dependent regulation (7, 9). Conversion to mucoidy is proposed to be a major
77 survival mechanism promoting the persistence of the bacterium in CF lungs; it mostly results
78 from the over-expression of the alginate polysaccharide by the alternative sigma factor AlgU,

79 desequestered from its inner membrane anti-sigma partner MucA due to *mucA* mutations (10,
80 11). More aggressive virulence factors secreted by Type II (T2SS) and Type III (T3SS)
81 secretion are switched off, thus leading to CF-adapted strains usually less virulent in animal
82 models than the primary infecting ones (9). However, while sharing some generally-accepted
83 traits, adaptative evolution and resulting diversity of CF isolates can vary widely (1, 9).

84 The CHA strain is a good example of *P. aeruginosa* multifaceted adaptation in CF
85 disease. It has been isolated from a CF patient with a severe form of the disease (12). This is
86 an O6 serotype strain belonging to clone J, one common clonal group disseminated
87 worldwide (13). CHA is mucoid (14), a hallmark of chronicity, but at the same time, is a
88 highly efficient T3SS effector-producer fitting with acute infectious status (15-18).

89 Using extensive phenotypic and complementation experiments in parallel to genome
90 analysis, we report in the present study that virulence properties of CHA result from an
91 intrinsic genetic deletion leading to the absence of the histidine kinase (HK) GacS. In concert
92 with RetS and the LadS HKs which modulate GacS activity, the GacS/GacA two-component
93 regulatory system (TCS) controls expression of two small regulatory RNAs (sRNAs), RsmY
94 and RsmZ, and consequently of further target genes of the RNA-binding protein RsmA. The
95 RetS/LadS/Gac/Rsm cascade is known to be a master regulator of the virulence factors of *P.*
96 *aeruginosa*, controlling the switch in their expression during the acute/chronic phase
97 transition (19). Hence, mutations in this regulatory pathway profoundly impact the global
98 virulence traits, as illustrated with the CF isolate CHA.

99

100 **MATERIALS AND METHODS**

101 **Bacterial strains.** The *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* strains, as well as the plasmids
102 used in this study, are listed in Table 1. Cells were grown aerobically in Luria Bertani (LB)
103 medium at 37 °C with agitation. *P. aeruginosa* was also cultured on *Pseudomonas* Isolation

104 Agar plates (PIA; Difco). Antibiotics were added at the following concentrations (in µg/ml):
105 100 (ampicillin), 25 (gentamycin), 25 (kanamycin) and 10 (tetracyclin) for *E. coli*, 500 (CHA)
106 or 200 (PAO1) (carbenicillin), 400 (CHA) and 200 (PAO1) (gentamycin) and 200
107 (tetracyclin) for *P. aeruginosa*.

108 **Genetic constructions.** Mutagenesis of *rsmA* and *retS* – The DNA fragments needed for
109 deletion experiments were amplified by the Splicing by Overlap Extension-Polymerase Chain
110 Reaction (SOE-PCR). The upstream and downstream flanking regions of *rsmA* and *retS* were
111 amplified using CHA genomic DNA and both couples of primers: Mut-RsmA-F1 (*SmaI* site
112 at its 5')/Mut-RsmA-R1 and Mut-RsmA-F2/Mut-RsmA-R2 (*SmaI* site at its 5') for *rsmA*,
113 RetS-F1 (*SmaI* site at its 5')/RetS-R1 and RetS-F2/RetS-R2 (*SmaI* site at its 5') for *retS*. Each
114 of the two fragments (453 bp and 411 bp for *rsmA*, 431 bp and 421 bp for *retS*) were used for
115 a third PCR step using Mut-RsmA-F1/Mut-RsmA-R2 or RetS-F1/RetS-R2. The resulting 846
116 bp and 834 bp fragments were cloned into pCR-Blunt II-TOPO vector and sequenced. After
117 cleavage with *SmaI*, the SOE-PCR fragments were inserted into the suicide plasmid pEX100-
118 T giving pEXΔRsmA and pEXΔRetS. These plasmids contain the counter-selectable *sacB*
119 marker from *Bacillus subtilis*, which confers sensitivity to sucrose. The two pEX100-T
120 derived plasmids were introduced into *P. aeruginosa* CHA strain by triparental mating, using
121 the conjugative properties of the helper plasmid pRK2013. Co-integration events were
122 selected on PIA plates containing carbenicillin. Single colonies were then plated on PIA
123 medium containing 5% sucrose to select for the loss of plasmid: the resulting strains were
124 checked for carbenicillin sensitivity and for *rsmA* or *retS* (wild-type or deleted gene) genotype
125 by PCR.

126 Chromosomal fusion of VSV-G epitope to *gacS* – The sequence coding for VSV-G was
127 introduced in-frame at the 3' end of PAO1 *gacS* or CHA *gacS** using SOE-PCR strategy. The
128 upstream and downstream flanking 3' regions of *gacS* and *gacS** were amplified using PAO1

129 or CHA genomic DNA, respectively, and both couples of primers : GacS VSV-G-F1 (*Sma*I
130 site at its 5')/GacS VSV-G-R1 and GacS VSV-G-F2/GacS VSV-G-R2 (*Sma*I site at its 5') for
131 *gacS*, CHAGacS VSV-G-F1 (*Sma*I site at its 5')/ CHAGacS VSV-G-R1 and CHAGacS VSV-
132 G-F2/ CHAGacS VSV-G-R2 (*Sma*I site at its 5') for *gacS**. Each of the two fragments (418
133 bp and 428 bp for *gacS*, 390 bp and 395 bp for *gacS**) were used for a third PCR step using
134 GacS VSV-G-F1/ GacS VSV-G-R2 or CHAGacS VSV-G-F1/ CHAGacS VSV-G-R2. The
135 resulting 813 bp and 752 bp fragments were cloned into pCR-Blunt II-TOPO vector and
136 sequenced. After cleavage with *Sma*I, the SOE-PCR fragments were inserted into the suicide
137 plasmid pEX100-T giving pEX-GacS VSV-G and pEX-GacS* VSV-G. Allelic replacement
138 was performed as described above. The presence of VSV-G-encoding sequences in the PAO1
139 and CHA genomes was identified by PCR and confirmed by sequencing of PCR fragments.

140 Complementation - For *rsmA* complementation, a 230 bp region encompassing *rsmA* gene
141 was amplified by PCR from PAO1 genomic DNA using PSE-RsmA-F and PSE-RsmA-R
142 primers. The PCR product was cloned into pCR-Blunt II-TOPO and sequenced. The *Xba*I-
143 *Hind*III fragment was then excised and cloned into the plasmid pVLT31 cut with the same
144 enzymes: *rsmA* expression is driven by IPTG-inducible *plac* promoter. For *gacS*
145 complementation, a 2847 bp region encompassing the entire *gacS* sequence was amplified by
146 PCR from PAO1 genomic DNA using GacS-*Sma*I-F and GacS-*Xba*I-R primers. The PCR
147 product was cloned into pCR-Blunt II-TOPO and sequenced. The *Sma*I-*Xba*I fragment was
148 then excised and cloned into *Sma*I-*Xba*I-cut pJN105: *gacS* expression is driven by arabinose-
149 inducible *pBAD* promoter. The two expression vectors were introduced in *P. aeruginosa* by
150 transformation (32).

151 An integrative plasmid was also constructed to complement *gacS* mutation with one
152 copy of the gene driven by its own promoter and integrated into the genome. A 3041 bp
153 region, comprising the 245 bp sequence upstream from *gacS* and the entire gene, was

154 amplified by PCR using P-GacS-F and P-GacS-R primers and PAO1 genomic DNA as a
155 matrix. The *SmaI-HindIII* fragment was excised and cloned into pUC18-miniTn7T-Gm-
156 LacZ20 previously cut with the same enzymes. The resulting plasmid was electroporated into
157 the CHA strain along with the pTNS2, as described (26), leading to the CHA-GacS strain.

158 The sequences of all primers will be given on request.

159 **β -Galactosidase assays.** β -Galactosidase activity was assayed according to Miller as
160 already described(33).

161 **Animals.** All protocols in this study were conducted in strict accordance with the
162 French guidelines for the care and use of laboratory animals. The protocol for mouse infection
163 was approved by the animal research committee of the institute (CETEA). Pathogen-free
164 BALB/c male mice (8-10 weeks) were obtained from Harlan Laboratories and housed in the
165 CEA animal care facilities.

166 ***P. aeruginosa*-induced lung injury.** Bacteria were grown to an optical density of 1.0
167 at 600 nm (A_{600}) in LB, at 37°C. They were centrifuged and resuspended in sterile PBS at 1.7
168 $\times 10^8$ per ml as evaluated by spectrometry. Mice were anesthetized by intraperitoneal
169 administration of a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg). Then, 30 μ l of
170 bacterial suspension (*i.e.* 5×10^6 bacteria) were deposited into mouse nostrils. For survival
171 curves, time of mouse death was noted and presented as Kaplan-Meyer curves (n = 10 per
172 condition). Statistical differences were established by Log-Rank test. For investigation of
173 bacterial dissemination (n = 5 per condition), mice were euthanized by CO₂ inhalation 15 h
174 later. Blood was withdrawn in the heart and spleens were dissected and homogenized with a
175 Polytron in 2 ml PBS. Colony-forming units in each tissue were counted after serial dilutions
176 and spreading on PIA plates. In uninfected mice, no CFU were observed. Statistical
177 differences were established by Mann-Whitney test.

178 **T3SS-dependent cytotoxicity assay.** Bacteria were grown in LB to an A_{600} 1.0 and
179 added to macrophage cell line J774 at a multiplicity of infection (MOI) of 5. Cell death was
180 assessed at 3 h post-infection by using a cytotoxicity detection kit (lactate dehydrogenase
181 LDH; Roche) as described (15).

182 **Sample preparation, antibodies and immunoblot analysis.** H1-T6SS Hcp1
183 production and secretion was assessed as described (34). For GacS-VSV-G and GacS*-VSV-
184 G analysis, 100 μ l of cultures at A_{600} of 2.8-3.0 were harvested and analyzed as the total
185 bacterial fraction. The rest of each culture was centrifuged, treated by lysozyme, and
186 disrupted by sonication. After ultracentrifugation, the membranes were washed and 2 μ g of
187 proteins were submitted to SDS-PAGE and immunoblotting analysis.

188 The following antibodies were used: polyclonal antibodies anti-Hcp1 already
189 described (34); polyclonal antibodies anti-VSV-G (Sigma Aldrich); monoclonal antibodies
190 anti-RpoA (Neoclone); anti-Opr86 polyclonal antibodies, obtained after immunization of
191 rabbits with HIS-Tev-o-Opr86 (G629-N752) and used at 1:2000. The commercial secondary
192 antibodies (anti-rabbit-HRP, anti-guinea pig-HRP, anti-mouse-HRP) were used as
193 recommended by the manufacturers.

194 **Motility assays.** Motilities were assayed on media as described (35). All plates were
195 inoculated with bacteria from overnight cultures on LB agar using sterile toothpicks.

196 **Air-liquid biofilm.** The *P. aeruginosa* adherence assay was performed in individual
197 plastic tubes as described (36).

198 **(q)RT-PCR.** For RT-PCR experiments, total RNA from 500 μ l of PAO1 and CHA
199 cultures (A_{600} of 1.0) was extracted with the TRIzol Plus RNA Purification Kit (Invitrogen)
200 then treated with DNase I (Amplification Grade, Invitrogen). Complementary DNA synthesis
201 was carried out on 400 ng of RNA with SuperScript III First-Strand Synthesis System
202 (Invitrogen) in presence or not of the SuperScript III RT enzyme to assess the absence of

203 genomic DNA. PCR amplifications were performed using *Taq*PCRx DNA Polymerase
204 (Invitrogen), with 1 μ l of cDNA in a 20 μ l final volume, following the Basic PCR protocol
205 described by the manufacturer. Calibration of the PCR amplification steps was done by
206 varying number of cycles with primers targeting either the *gacS* gene or 16S RNA as a
207 reference transcript. For qRT-PCR experiments, the CHA strains harboring pJN-GacS
208 plasmid or the corresponding pJN105 empty vector were grown at 37°C under agitation in LB
209 supplemented with 5mM EGTA and 20 mM MgCl₂, conditions of *in vitro* T3SS induction.
210 When *A*₆₀₀ reached 4, total cellular RNA from 10 ml of cultures was isolated, using the
211 PureYield RNA Midiprep System (Promega), cleaned up and concentrated using the RNeasy
212 kit (Qiagen). Yield, purity and integrity of RNA were further evaluated on Nanodrop and by
213 agarose gel migration. Reverse transcription was performed on 2 μ g of RNA by using the
214 SuperScript III first strand synthesis system. The real-time PCR runs were carried out on a
215 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Cycling parameters of the real time PCR were 98 °C
216 for 2 min, following by 45 cycles of 98 °C for 5 s and 60 °C for 10 s, ending with a melting
217 curve from 65 °C to 95 °C to assess the specificity of the amplification. To determine the
218 amplification kinetics of each product, the fluorescence derived from the incorporation of
219 EvaGreen into the double-stranded PCR products was measured at the end of each cycle using
220 the SsoFast EvaGreen Supermix 2X Kit (Biorad). The results were analyzed using the Bio-
221 Rad CFX Manager Software 3.0 (Bio-Rad). The relative mRNA quantity of each gene under
222 GacS production as compared to absence of production was analyzed using the Relative
223 Expression Software Tool REST2009 (Qiagen) with a pair wise fixed reallocation
224 randomization test coupled to a standard error (SE) calculated via a Taylor algorithm. The
225 *16S* gene was used as reference for normalization. The sequences of all primers will be given
226 on request.

227

228 **RESULTS**

229 **Expression of T3SS and H1-T6SS in virulent CHA strain.** As CF strains usually exhibit a
230 decreased toxicity compared to strains triggering acute infection (9), we compared the
231 virulence of CHA to that of the PAO1F reference strain, a wound isolate. The CHA strain,
232 which is an efficient T3SS effector-producer, was clearly more virulent than the PAO1F strain
233 in a murine acute model of lung infection (Fig. 1A); this was associated with an increased
234 dissemination of the bacteria both in blood and spleen compared to PAO1F (Fig. 1B). As
235 expected, the CHA T3SS-deficient strain exhibited a reduced toxicity in the model (not
236 shown) which is in agreement with a previous report pointing to T3SS being a major actor in
237 the virulence of CHA (16).

238 We then examined the expression of H1-T6SS, known to be active during chronic
239 infection (4, 5) and secreting bacterial toxins used for killing and competing with other
240 species in the crowded biofilm community. Surprisingly, H1-T6SS production was
241 undetectable in CHA as compared to other strains, notably CF strains TB, LES400, KK1 and
242 CF6, or reference strains PAO1, PA7 and PAK as assessed by the production of the Hcp1
243 component of the T6SS apparatus (Fig. 2A). The transcriptional fusion of *fhaI* (*PA0081*) gene
244 made of its promoter fused to *lacZ* reporter was transcribed in CHA, albeit 2.4 fold less than
245 in PAO1, while the corresponding translational fusion exhibited no reporter activity in CHA
246 (Fig. 2B). These results strongly suggested that CHA was incapable of H1-T6SS synthesis
247 due to a default of mRNA stability and/or protein translation rather than a significant altered
248 *hsi-1* gene transcription.

249 **Levels of RsmA and RsmY/Z are perturbed in CHA.** T3SS and the H1-T6SS are
250 known to be in opposite manner modulated by RsmA, a translational regulator. RsmA binding
251 to its target mRNAs is prevented by interaction with two regulatory small RNAs (sRNAs),
252 RsmY and RsmZ, whose expression is controlled by the Gac/Rsm cascade (27, 37). Therefore,

253 we examined in CHA the *rsmY* and *rsmZ* expression. In PAO1, the two sRNAs were
254 efficiently expressed, with higher level of *rsmY* expression compared to that of *rsmZ* (Fig. 3),
255 as already reported (3, 38). However, the *rsmY* gene was not expressed in CHA, and only a
256 slight expression of *rsmZ* was observed, mainly in overnight culture (Fig. 3). These data
257 strongly suggested that amounts of RsmY and RsmZ sRNAs were not sufficient to efficiently
258 titrate RsmA and to relieve its effect on its target mRNAs.

259 This hypothesis was confirmed by the high amount of Hcp1 protein produced in the
260 supernatant and whole cell extracts of the CHA Δ *rsmA* mutant, phenotype corrected by
261 introduction of the *rsmA* wild-type gene *in trans* (Fig. 4A). Additionally, highly active T3SS
262 of CHA was completely abolished by *rsmA* deletion and further re-induced by *rsmA*
263 complementation (Fig. 4B).

264 Taken together, the defective H1-T6SS synthesis in the CHA strain, resulting from a
265 constant translational inhibition exerted by RsmA on H1-T6SS mRNAs, and the highly active
266 T3SS, indirectly activated by RsmA, are both related to a defective *rsmY/Z* gene expression.

267 **A 426 bp chromosomal deletion led to a truncated and unstable GacS**

268 We then investigated the other regulatory players that could be involved in this deregulation.
269 Examination of genome sequence of CHA identified a 426 bp deletion in the chromosome
270 that affects the 3' extremity (last 146 nucleotides) of *gacS* and the 5' extremity (first 278
271 nucleotides) of the downstream gene *ldhA*, encoding a lactate dehydrogenase (Fig. 5A) (39).
272 This *gacS* deletion generates a putative truncated protein GacS* possessing 19 unrelated
273 residues in place of the 48 C-terminal residues of the PAO1 GacS protein (Fig. 5B). The three
274 phosphorylation sites (residues His, Asp and His) are conserved (Fig. 5C) but the fifth helix
275 of the Histidine PhosphoTransfer (Hpt) domain is missing (Fig. 5D).

276 To test whether this deletion impacts the stability and/or functionality of GacS*, we
277 first provided *in trans* the Hpt domain of PAO1 GacS protein (40), which although produced,

278 did not complement the GacS* function (not shown). In agreement with this absence of
279 complementation, GacS*-VSV-G could not be detected in CHA, neither in the membranes
280 nor in the whole cells, although GacS-VSV-G was clearly present in the membrane of the
281 PAO1 strain (Fig. 5E). We ruled out the possibility that the absence of GacS* was a
282 consequence of a transcription defect or an effect of the genomic deletion on mRNA stability
283 by comparing the level of *gacS* transcripts in both PAO1 and CHA strains using RT-PCR (Fig.
284 5F). Altogether, these results strongly suggested that truncation of GacS* C-terminus in CHA
285 led to a translational defect or an unstable protein.

286 We next provided to the CHA strain the PAO1 *gacS* gene cloned under the control of
287 the *pBAD* promoter. Introduction of functional *gacS* gene increased amounts of *rsmY* and
288 *rsmZ* transcripts as assessed by qRT-PCR (Fig. 6), data corroborated by the restoration of
289 *rsmY/Z* promoter expression (Fig. 3). GacS also increased quantity of *PA0094* transcripts,
290 *PA0094* being a part of the H1-T6SS-encoding cluster (Fig. 6), as well as synthesis of Hcp1
291 (Fig. 4A). Introducing a *gacS* version in CHA also reduced significantly the level of *exoS*
292 transcription, thus affecting the T3SS-dependent cytotoxicity on J774 macrophages (Fig. 4B).
293 However, even though *retS* deletion did not affect T3SS activity, introducing *gacS* in the
294 CHA Δ *retS* background abolished it completely (Fig. 4B), indicating that absence of GacS
295 may allow CHA to escape from the negative control exerted by RetS on T3SS during chronic
296 infection.

297 Taken together, these results demonstrated that the truncation of GacS in CHA is
298 responsible for defect in *rsmY/Z* gene expression as well as for regulation exerted on T3SS
299 and H1-T6SS synthesis.

300 **The physiological absence of GacS shapes the phenotype of the clinical isolate**

301 Approximately 500 genes are modulated, directly or indirectly, by the Gac/Rsm cascade (27,
302 38, 41), so we wondered what could be the impact of *gacS* inactivation on other virulence

303 traits. Among them, RsmA positively affects genes involved in formation of type IV pili and
304 function of the flagellum (41); these extracellular appendages are fundamental for motility,
305 biofilm formation, and efficient injection of T3SS toxins into eukaryotic cells as this process
306 requires cell adherence (42-44). A way to assess their presence and activity is to observe the
307 swimming and swarming motilities of the *P. aeruginosa* strains (35). CHA clearly possesses
308 functional flagellum and Type IVa pili as it is able to swim comparably to PAO1 and exhibits
309 even a better twitching motility (Fig. 7A). As expected, *rsmA* mutation in CHA resulted in a
310 decrease in the two motilities. Introduction of a functional copy of *gacS* in the chromosome of
311 CHA did not substantially change its swimming motility, and only twitching was affected and
312 down-regulated in our laboratory conditions (Fig. 7A). Thus, unlike most CF-adapted strains
313 (7), CHA is a motile CF strain, with efficient flagellum and Type IVa pili which may
314 contribute to its aggressive phenotype.

315 Since synthesis of Pel and Psl exopolysaccharides is known to be under the control of
316 the Gac/Rsm post-transcriptional cascade and to mediate biofilm formation (37, 44), we next
317 examined the ability of CHA and different mutants to form biofilm and synthesize Pel
318 exopolysaccharide beside constitutive alginate production. CHA did not form biofilm rings in
319 static growth conditions and inactivation of *rsmA* gene in CHA led to a hyperbiofilm
320 phenotype (Fig. 7B). Introduction of a wild-type *gacS* gene *in trans* restored the ability of
321 CHA to produce biofilm and triggered a 8.3 increase in *pelA* transcript level (Fig. 6), while it
322 further enhanced biofilm production in a CHA Δ *retS* strain (Fig. 7B).

323 Interestingly, different from the blue-green color of PAO1, the CHA strain exhibits a
324 reddish color on PIA plate, resulting from a diffusible molecule (Fig. 7C). This phenotype
325 was not due to pyomelanin production, since inactivation of the *hpd* gene encoding the
326 enzyme synthesizing HGA pyomelanin precursor (45) did not affect pigmentation (not
327 shown). We showed that production of this pigment is under control of the Gac/Rsm pathway.

328 Indeed, inactivation of *rsmA* abolished the red pigmentation to a level comparable to the one
329 observed when wild-type *gacS* was introduced in a *CHAΔretS* background (Fig. 7C).
330 Complementation of CHA with *gacS* affected only slightly the phenotype. These data
331 indicated that production of this red pigmentation should escape from the negative control of
332 RetS during chronic infection. It is known that RsmA controls synthesis of pigments like
333 pyocyanin (41, 46), and *P. aeruginosa* is able to synthesize other phenazines, as two red
334 pigments called aeruginosins A and B, whose biological relevance is not known (47).
335 Therefore the coloration may rely on specific combination and quantities of these pigments. It
336 is important to point out that phenazines are pigments with redox properties that contribute to
337 bacterial pathogenicity in both acute and chronic models of infection. Furthermore, identity
338 and amount of phenazines are crucial for toxicity as well as biofilm formation ((48) and
339 references herein). For example, the precursor of pyocyanin, called 5MPCA, was shown to
340 be more efficient for yeast killing than pyocyanin itself (47). Therefore, identifying the nature
341 of the pigment(s) produced by CHA due to a dysregulation of the Gac/Rsm pathway would
342 help to measure the physiological impact of this pigmentation reprogramming.

343 All these data indicated that a deletion in *gacS* shapes pathogenic ability of the CHA
344 clinical isolate by blocking the Gac/Rsm pathway. Indeed, CHA is a mucoid and motile
345 strain expressing acute virulence factors that has lost the ability to switch from acute to
346 chronic lifestyle. This is due to absence of GacS protein, whose activity cannot be modulated
347 by RetS or LadS.

348

349 **DISCUSSION**

350 Particular environmental conditions found in chronic infection, such as in CF, force *P.*
351 *aeruginosa* to adapt in order to survive. In this work, by combining genomic and extensive
352 phenotypic analyses, we found that an intrinsic genomic deletion in the CF strain CHA equips

353 bacteria with virulence factors that are considered to be more aggressive and are in general
354 associated with acute infections. Indeed, one of the key regulatory pathways, the
355 RetS/LadS/Gac/Rsm pathway, proposed to control the transition between acute and chronic
356 infection-associated phenotypes (37, 49), is impaired by a genomic deletion that affects the
357 *gacS* gene region leading to an unstable truncated form of GacS. The same signalling pathway
358 was found affected by mutations either in *ladS* (50) or in *retS* (51) in two other clinical strains
359 isolated from acute and chronic infection, respectively. However, inactivation of GacS, the
360 master regulator of this pathway, impacts more strongly the read-outs than that of LadS and
361 RetS, by blocking the switch orchestrated by the Gac/Rsm pathway.

362 Spontaneous mutations in *gacS* and/or *gacA* represent the most important mechanism
363 responsible for phenotypic variation of many pseudomonads species, as observed in
364 rhizosphere-associated *Pseudomonas* (52). Thus, *Pseudomonas* sp. strain PCL1171 undergoes
365 phase variation which is characterized by different production of secondary metabolites and
366 exoenzymes. The switch was reported to be caused by spontaneous and reversible mutations
367 in *gacS* and *gacA* genes, probably generated randomly by an inefficient MutS-dependent
368 repair of replication-related mismatches (52, 53). One of these *gacS* mutations, a spontaneous
369 307 bp deletion event, implied as a prerequisite for the recombination rearrangement a
370 mutation leading to a perfect 10 bp-direct repeat (53). A similar mechanism might have
371 occurred in CHA genome to generate the deletion between the two 11-tandem imperfect
372 repeats (5'-CGGCCTGCCA/GG) flanking the 3' end of *gacS* and the 5' end of *ldhA* in PAO1
373 genome (Fig. 5A).

374 Numerous *P. aeruginosa* phenotypic variants are retrieved from the CF lungs, as the
375 genome indeed constantly accumulates mutations (1, 7) and even short-term growth in
376 biofilm was shown to generate high genetic diversity in *P. aeruginosa* communities (54).
377 Interestingly, *gacS* mutants in PA14 are prone to generate stable SCVs when growing in

378 biofilm or exposed to stresses (55) as well as *in vivo* (56). When CHA was grown in static
379 conditions *in vitro*, we also observed the emergence of stable SCV-like colonies (not shown).
380 These observations suggest that the absence of GacS might have conferred to the CHA
381 bacterium further advantage for persistence in CF lung by providing it the capacity to convert
382 to stress-tolerant SCVs.

383 Clone CHA strains were isolated worldwide from rivers in Germany, soil in Japan,
384 and from several CF patients in Central Europe (13). In addition to the original clone used in
385 this study, two other clone CHA strains, one isolated from environment and another from
386 sputum of a CF patient with normal lung function, were sequenced (39). Interestingly, only
387 the here-characterized CHA strain harbors a *gacS* deletion that affects so strongly its virulence
388 properties. Genome examination did not highlight any other genetic event that could explain
389 such deregulation (39). This indicates that strains of the same clonal group isolated from such
390 diverse environments do not necessarily share the same infective properties (39). Analysis of
391 numerous CF strains with the same T6SS/T3SS pattern of expression will help determining
392 whether this genetic mechanism of turning a bacterium to hypervirulence is an isolated
393 phenomenon or if it is a widespread alternative among CF lung isolates.

394 The CHA strain over-expresses *alg* genes and overproduces alginate (14); this mucoid
395 phenotype is due to one mutation in *mucA* leading to replacement of Ala5 residue by Gly in
396 the anti-sigma MucA protein (39) (Supplemental Fig. S1). Several reports indicated that *mucA*
397 mutation negatively affects flagellum motility (11, 57), leads to a reduced expression of T3SS
398 (58) as well as of other traits of acute virulence like elastase (59), suggesting that mucoidy
399 correlates with reduced virulence (60, 61). However, despite a mucoid phenotype, CHA is
400 endowed with efficient T3SS and also motility appendages that may contribute to its
401 aggressive phenotype. Furthermore, the cAMP/Vfr-dependent signalling (CVS) pathway,
402 known to activate synthesis of the virulence factors associated with acute disease such as the

403 T3SS, was shown to be turned-off in *mucA*-mutant strains by a mechanism involving AlgU
404 and AlgR; this pathway thus activates alginate synthesis and reduces T3SS-dependent
405 virulence (60). However, inactivation of *vfr* does not affect T3SS in CHA (B. Toussaint,
406 personal communication). A cross-talk between CVS and Gac/Rsm pathways has been
407 unravelled, as *vfr* expression is positively controlled by RsmA, mechanism through which the
408 Gac/Rsm pathway could positively affect expression of acute virulence factors (19, 41).
409 However, unlike inactivation of *rsmA*, that of *vfr* does not impact T3SS in CHA, and could
410 not account for the RsmA positive control of T3SS genes in this isolate. Hence, neither the
411 Gac/Rsm pathway nor the CVS pathway modulates the highly active T3SS in this isolate.
412 Besides these pathways, other elements influence expression of virulence factors involved in
413 acute and persistent infections, such as the second messenger c-di-GMP, which has been
414 recently shown to regulate in opposite manner T6SS and T3SS expression (62). Interestingly,
415 the c-di-GMP dependent-switch is linked, at an unknown level, to the RetS/Gac/Rsm pathway
416 and requires the regulatory sRNAs. As no efficient amounts of sRNAs are synthesized in
417 CHA, the role of c-di-GMP in the regulation of virulence factors is not known. Probing the
418 role of this second messenger, understanding how the T3SS escapes from the Vfr regulation
419 and establishing the molecular link coupling T3SS and CVS pathway will be the topic of
420 future work. To conclude, these data clearly establish that adaptation in CF lungs generates
421 clones with profound deregulation in the intertwined pathways controlling pathogenicity and
422 their study can allow identifying the different molecular links connecting the essential
423 regulatory cascades and new therapeutic targets.

424

425 **ACKNOWLEDGMENTS**

426 K.M. Sall is a PhD student supported by the University of Grenoble. This study was in part
427 supported by grants from FINOVI and AVIESAN. We are grateful to Stephen Lory for the

428 PA0081-lacZ plasmids, Stéphanie Bouillot for technical assistance with mouse experiments
429 and Yann Denis (IMM transcriptome platform, Marseille) for qRT-PCR technical skills. We
430 also thank Sylvie Llopart and Elisabeth Blanc-Ferras, SCP-Biologics, and Guillaume
431 Mondesert, TSU-Infectious Diseases (Sanofi-Aventis Research and Development, Toulouse,
432 France) for providing the anti-Opr86 antibodies. Thanks also to Céline Miganeh from
433 Genostar for the bioinformatic analysis on CHA genomes.

434

435 REFERENCES

- 436 1. **Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S.** 2012.
437 Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary
438 perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**:841-851.
- 439 2. **Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S.** 2004. *Pseudomonas*
440 *aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid
441 from cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6664-6668.
- 442 3. **Cattoir V, Narasimhan G, Skurnik D, Aschard H, Roux D, Ramphal R, Jyot J,**
443 **Lory S.** 2013. Transcriptional response of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to human
444 respiratory mucus. *MBio* **3**:e00410-00412.
- 445 4. **Potvin E, Lehoux DE, Kukavica-Ibrulj I, Richard KL, Sanschagrin F, Lau GW,**
446 **Levesque RC.** 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for
447 high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ*
448 *Microbiol* **5**:1294-1308.
- 449 5. **Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL,**
450 **Joachimiak G, Ordonez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ.** 2006.
451 A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus.
452 *Science* **312**:1526-1530.
- 453 6. **Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, Trinidad RR, Silverman JM,**
454 **Ohlson BB, Hicks KG, Plemel RL, Li M, Schwarz S, Wang WY, Merz AJ,**
455 **Goodlett DR, Mougous JD.** 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonas*
456 *aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **7**:25-37.
- 457 7. **Rodriguez-Rojas A, Oliver A, Blazquez J.** 2012. Intrinsic and environmental
458 mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in
459 chronic lung infections. *J Infect Dis* **205**:121-127.
- 460 8. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA,**
461 **Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV.**
462 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis
463 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8487-8492.
- 464 9. **Hogardt M, Heesemann J.** 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during
465 persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**:557-562.
- 466 10. **Ramsey DM, Wozniak DJ.** 2005. Understanding the control of *Pseudomonas*
467 *aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections
468 in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**:309-322.

- 469 11. **Pulcrano G, Iula DV, Raia V, Rossano F, Catania MR.** 2012. Different mutations
470 in mucA gene of Pseudomonas aeruginosa mucoid strains in cystic fibrosis patients
471 and their effect on algU gene expression. *New Microbiol* **35**:295-305.
- 472 12. **Toussaint B, Delic-Attree I, Vignais PM.** 1993. Pseudomonas aeruginosa contains
473 an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun*
474 **196**:416-421.
- 475 13. **Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Kohler
476 T, van Delden C, Weinel C, Slickers P, Tummler B.** 2007. Population structure of
477 Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8101-8106.
- 478 14. **Delic-Attree I, Toussaint B, Froger A, Willison JC, Vignais PM.** 1996. Isolation of
479 an IHF-deficient mutant of a Pseudomonas aeruginosa mucoid isolate and evaluation
480 of the role of IHF in algD gene expression. *Microbiology* **142** (Pt 10):2785-2793.
- 481 15. **Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I.** 2000.
482 Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-
483 dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear
484 neutrophils. *Infect Immun* **68**:2916-2924.
- 485 16. **Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, Polack B,
486 Nowak E, Viget NB, Kipnis E, Guery BP.** 2005. Alveolar response to Pseudomonas
487 aeruginosa: role of the type III secretion system. *Infect Immun* **73**:4263-4271.
- 488 17. **Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O,
489 Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Veron W, Taupin L, Toussaint B,
490 Cornelis P, Wei Q, Shioya K, Deziel E, Feuilloley MG, Orange N, Dufour A,
491 Chevalier S.** 2011. Full virulence of Pseudomonas aeruginosa requires OprF. *Infect
492 Immun* **79**:1176-1186.
- 493 18. **Shen DK, Filopon D, Kuhn L, Polack B, Toussaint B.** 2006. PsrA is a positive
494 transcriptional regulator of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa.
495 *Infect Immun* **74**:1121-1129.
- 496 19. **Coggan KA, Wolfgang MC.** 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control
497 pseudomonas aeruginosa environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues
498 Mol Biol* **14**:47-70.
- 499 20. **Tummler B, Koopmann U, Grothues D, Weissbrodt H, Steinkamp G, von der
500 Hardt H.** 1991. Nosocomial acquisition of Pseudomonas aeruginosa by cystic fibrosis
501 patients. *J Clin Microbiol* **29**:1265-1267.
- 502 21. **Salunkhe P, Smart CH, Morgan JA, Panagea S, Walshaw MJ, Hart CA, Geffers
503 R, Tummler B, Winstanley C.** 2005. A cystic fibrosis epidemic strain of
504 Pseudomonas aeruginosa displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J
505 Bacteriol* **187**:4908-4920.
- 506 22. **Bastonero S, Le Priol Y, Armand M, Bernard CS, Reynaud-Gaubert M, Olive D,
507 Parzy D, de Bentzmann S, Capo C, Mege JL.** 2009. New microbicidal functions of
508 tracheal glands: defective anti-infectious response to Pseudomonas aeruginosa in
509 cystic fibrosis. *PLoS One* **4**:e5357.
- 510 23. **Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R,
511 Harkins D, Shay R, Watkins K, Mahamoud Y, Paulsen IT.** 2010. Complete
512 genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier Pseudomonas aeruginosa
513 PA7. *PLoS One* **5**:e8842.
- 514 24. **Schweizer HP, Hoang TT.** 1995. An improved system for gene replacement and xylE
515 fusion analysis in Pseudomonas aeruginosa. *Gene* **158**:15-22.
- 516 25. **Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of
517 plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad
518 Sci U S A* **76**:1648-1652.

- 519 26. **Choi KH, Schweizer HP.** 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7
520 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**:153-161.
- 521 27. **Brencic A, Lory S.** 2009. Determination of the regulon and identification of novel
522 mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* **72**:612-632.
- 523 28. **Newman JR, Fuqua C.** 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-
524 arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*
525 **227**:197-203.
- 526 29. **de Lorenzo V, Eltis L, Kessler B, Timmis KN.** 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene
527 products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional
528 phenotypes. *Gene* **123**:17-24.
- 529 30. **Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ.** 1987.
530 Promoters in the Nodulation Region of the *Rhizobium-Leguminosarum* Sym Plasmid
531 P_{rl1}ji. *Plant Molecular Biology* **9**:27-39.
- 532 31. **Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, Roche B, Bleves S,
533 Mejean V, Lazdunski A, Filloux A.** 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS
534 signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol*
535 **76**:1427-1443.
- 536 32. **Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP.** 2002. Benchtop and microcentrifuge
537 preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**:760, 762-
538 763.
- 539 33. **Thibault J, Faudry E, Ebel C, Attree I, Elsen S.** 2009. Anti-activator ExsD forms a
540 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol*
541 *Chem* **284**:15762-15770.
- 542 34. **Casabona MG, Silverman JM, Sall KM, Boyer F, Coute Y, Poirel J, Grunwald D,
543 Mougous JD, Elsen S, Attree I.** 2013. An ABC transporter and an outer membrane
544 lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in
545 *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **15**:471-486.
- 546 35. **Rashid MH, Kornberg A.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming,
547 swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U*
548 *S A* **97**:4885-4890.
- 549 36. **Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A.** 2001. The chaperone/usher
550 pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup)
551 and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6911-6916.
- 552 37. **Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S.** 2004. A
553 signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and
554 chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**:745-754.
- 555 38. **Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL, Lory S.**
556 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts
557 exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ
558 regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**:434-445.
- 559 39. **Bezuidt OK, Klockgether J, Elsen S, Attree I, Davenport CF, Tumbler B.** 2013.
560 Intracolonial genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC*
561 *Genomics* **14**:416.
- 562 40. **Roux L, Filloux A, Sivaneson M, de Bentzmann S, Bordi C.** The LadS hybrid
563 histidine kinase triggers *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection by forming a
564 multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two component
565 system. Submitted.
- 566 41. **Burrowes E, Abbas A, O'Neill A, Adams C, O'Gara F.** 2005. Characterisation of
567 the regulatory RNA RsmB from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol*
568 **156**:7-16.

- 569 42. **O'Toole GA, Kolter R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for
570 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
- 571 43. **Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aes-Jorgensen A, Molin S,**
572 **Tolker-Nielsen T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type,
573 flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**:1511-1524.
- 574 44. **Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A.** 2011. Key two-component regulatory
575 systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*
576 **13**:1666-1681.
- 577 45. **Hunter RC, Newman DK.** 2010. A putative ABC transporter, hatABCDE, is among
578 molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J*
579 *Bacteriol* **192**:5962-5971.
- 580 46. **Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D,**
581 **Williams P.** 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates
582 production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas*
583 *aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:6676-6683.
- 584 47. **Gibson J, Sood A, Hogan DA.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa*-*Candida albicans*
585 interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Appl Environ*
586 *Microbiol* **75**:504-513.
- 587 48. **Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS.**
588 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-
589 carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **183**:6454-6465.
- 590 49. **Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S,**
591 **Lazdunski A, Lory S, Filloux A.** 2006. Multiple sensors control reciprocal
592 expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc*
593 *Natl Acad Sci U S A* **103**:171-176.
- 594 50. **Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A.** 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* reference
595 strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One*
596 **6**:e29113.
- 597 51. **Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tummeler B.**
598 2011. Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and
599 PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol* **13**:1690-1704.
- 600 52. **van den Broek D, Bloemberg GV, Lugtenberg B.** 2005. The role of phenotypic
601 variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol* **7**:1686-1697.
- 602 53. **van den Broek D, Chin AWTF, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ.** 2005. Molecular
603 nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in
604 *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *J Bacteriol* **187**:593-600.
- 605 54. **Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** 2004. Self-generated diversity produces
606 "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16630-
607 16635.
- 608 55. **Davies JA, Harrison JJ, Marques LL, Foglia GR, Stremick CA, Storey DG,**
609 **Turner RJ, Olson ME, Ceri H.** 2007. The GacS sensor kinase controls phenotypic
610 reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*
611 PA14. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:32-46.
- 612 56. **Nelson LK, Stanton MM, Elphinstone RE, Helwerda J, Turner RJ, Ceri H.** 2010.
613 Phenotypic diversification in vivo: *Pseudomonas aeruginosa gacS*- strains generate
614 small colony variants in vivo that are distinct from in vitro variants. *Microbiology*
615 **156**:3699-3709.
- 616 57. **Tart AH, Wolfgang MC, Wozniak DJ.** 2005. The alternative sigma factor AlgT
617 represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of
618 *fleQ*. *J Bacteriol* **187**:7955-7962.

- 619 58. **Wu W, Badrane H, Arora S, Baker HV, Jin S.** 2004. MucA-mediated coordination
620 of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*
621 **186**:7575-7585.
- 622 59. **Mohr CD, Rust L, Albus AM, Iglewski BH, Deretic V.** 1990. Expression patterns of
623 genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two
624 virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol*
625 *Microbiol* **4**:2103-2110.
- 626 60. **Jones AK, Fulcher NB, Balzer GJ, Urbanowski ML, Pritchett CL, Schurr MJ,**
627 **Yahr TL, Wolfgang MC.** 2010. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU
628 regulon through mucA mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *J Bacteriol*
629 **192**:5709-5717.
- 630 61. **Rau MH, Hansen SK, Johansen HK, Thomsen LE, Workman CT, Nielsen KF,**
631 **Jelsbak L, Hoiby N, Yang L, Molin S.** 2010. Early adaptive developments of
632 *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent
633 colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ Microbiol*
634 **12**:1643-1658.
- 635 62. **Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A.** 2011. The *Pseudomonas*
636 *aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP
637 signalling. *Environ Microbiol* **13**:3128-3138.
- 638
639

640 **FIGURE LEGENDS**

641 **FIG 1** Survival rates and bacterial dissemination in CHA-infected mice. Acute pneumonia
642 was provoked in mice by nose instillation of a bacterial suspension ($5 \cdot 10^6$ CFU) of either
643 CHA or PAO1F. (A) Kaplan-Meyer survival curves were established from 10 infected mice
644 per strain. Statistical differences were calculated with LogRank test. (B) Mice were
645 euthanized 15 hours post-infection; blood and spleen were withdrawn and *P. aeruginosa* CFU
646 were determined in each tissue. Data represent the mean CFU + SEM calculated for total
647 tissue (n = 5 mice per strain). Statistical differences between strain dissemination: p = 0.009
648 (*) in blood and spleen as established by Mann-Whitney test.

649 **FIG 2** H1-T6SS is turned off in the CHA strain. (A) Western blot analysis of Hcp1 from
650 different *P. aeruginosa* CF and non-CF strains. The cytoplasmic RpoA protein is used as a
651 loading marker. (B) β -galactosidase activities measured at A_{600} of 1.5 from PAO1 and CHA
652 strains containing either a transcriptional or translational *pfha1-lacZ* fusions, as indicated. The
653 bars indicate the standard deviations.

654 **FIG 3** Expression of the regulatory sRNAs is affected in the CHA strains. The expression of
655 *prsmY::lacZ* and *prsmZ::lacZ* were measured in PAO1 and CHA at two different A_{600} . When
656 indicated, the pJN-GacS plasmid was introduced. The plasmid pMP220 is the promoter-free
657 *lacZ* plasmid used as a control. The reported values for enzyme activities are the average of at
658 least two independent experiments performed in triplicate. The bars indicate the standard
659 deviations. O/N: overnight culture.

660 **FIG 4** RsmA is responsible for absence of H1-T6SS and high T3SS activity in CHA. (A) The
661 Hcp1 synthesis and secretion were analysed by Western blot in the different strains as
662 indicated. The cytoplasmic RpoA protein was used as a loading marker. Bac: bacteria, sup:
663 supernatant. (B) T3SS-dependent cytotoxicity on J774 macrophages of wild-type, mutants
664 and plasmid-complemented strains. Cytotoxicity was measured after 3 hours of infection and
665 is expressed as a percentage of the total amount of LDH released from cells lysed with 1%
666 Triton X-100. All tests were performed in triplicate.

667 **FIG 5** A genomic deletion in CHA affects the GacS regulator. (A) Genetic organization of
668 *gacS* (PA0928, 2778 bp) and *ldhA* (PA0927, 990 bp) in PAO1. A 426 bp deletion in the CHA
669 chromosome leads to 3' truncated *gacS** and 5' truncated *ldhA* gene. The two 11-tandem
670 imperfect repeats located into the PAO1 genes are depicted as arrowheads. (B) Sequence
671 alignment of the Hpt (Histidine phosphotransfer) and Hpt* (truncated domain) domains of
672 PAO1 GacS and CHA GacS*, respectively. The 48 last amino acids of GacS Hpt are replaced
673 by unrelated 19 amino acids in Hpt*, at the position indicated by brackets. The star points to
674 the conserved phosphorylated Histidine 859 residue. (C) GacS* contains all the
675 phosphorylation sites but lacks the C-terminal part of Hpt domain. The length in amino acids
676 (aa) of the proteins is indicated in brackets. TM: transmembrane helix. (D) Modelisation of
677 Hpt and Hpt* domains of GacS and GacS*, respectively, using PyMol. One of the helices of
678 the four-helix bundle motif featuring the Hpt domain, that is indicated by an arrow, is missing

679 in the predicted Hpt* domain. (E) Western blot analysis of GacS-VSV-G and GacS*-VSV-G
680 in the whole bacteria (B) and in the membrane fraction (Mb) of PAO1 and CHA. The blots
681 were developed by antibodies specific to the VSV-G epitope and to the porin Opr86
682 (PA3648) (loading control) as indicated. Note the absence of GacS*-VSV-G. Localisation of
683 a molecular weight marker is indicated at the left (in kDa). (F) RT-PCR analysis of *gacS* gene
684 transcript in PAO1 and CHA. The indicated numbers of PCR cycles are indicated. 16S rRNA
685 (16S) transcript levels indicate equal loading. Samples lacking SuperScript III RT enzyme
686 during RT step (- RT) show that no DNA contamination was present.

687 **FIG 6** Complementation of CHA with *gacS* impacts sRNAs expression as well as amount of
688 major RsmA-target mRNAs, as assessed by qRT-PCR analysis. Relative mRNA quantity
689 compares CHA/pJN-GacS to CHA/pJN105. Positive values indicate that mRNA levels are
690 higher in *gacS*-complemented CHA. The p-values were calculated with REST2009 using Pair
691 Wise Fixed Reallocation Randomisation Test. * $p < 0.025$, ** : $p < 0.0015$; *** : $p < 0.0002$.

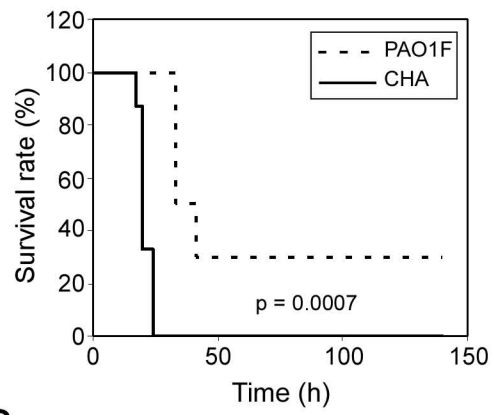
692 **FIG 7** Impact of *gacS* inactivation in CHA on different virulence traits. (A) Swimming (left)
693 and twitching (right) motilities of indicated strains. CHA-GacS contains the *gacS* gene
694 amplified from PAO1 integrated into the chromosome. The images of the plates are
695 representative with regard to both the extent of spreading and morphology of motile bacteria.
696 (B) Air-liquid biofilm assay of indicated strains, containing either the empty plasmid (control)
697 or the plasmid expressing the protein of interest, as indicated. For the assays with GacS, 0.5 %
698 arabinose was added in the medium. Biofilm was stained with crystal violet after 24 h at 30°C
699 and quantified. The means of each assay performed in quadruplicate and their standard
700 deviation are indicated below the corresponding pictures. (C) Pigment production in CHA is
701 strongly affected by *rsmA* mutation, and *retS* mutation when *gacS* is integrated into the
702 chromosome, as observed on PIA plate.

703 **Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this work
704

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wound isolate, sequenced laboratory strain	J. Mougous
PAO1F	Laboratory selected PAO1	A. Rietsch
TB (TBCF10839)	Cystic fibrosis (CF) isolate	(20)
LES400	CF epidemic strain	(21)
KK1	CF isolate	(22)
CF6	CF isolate	(15)
PA7	Wound isolate	(23)
PAK	Clinical isolate	D. Bradley
CHA	Mucoid CF isolate	(12)
CHA-GacS	CHA with wild-type <i>gacS</i> in the chromosome	This study
CHA Δ <i>rsmA</i>	CHA deleted of the <i>rsmA</i> gene	This study
CHA Δ <i>retS</i>	CHA deleted of the <i>retS</i> gene	This study
CHA Δ <i>retS</i> -GacS	CHA Δ RetS with wild-type <i>gacS</i> in the chromosome	This study
<i>E. coli</i>		
pCR-Blunt II-TOPO	Kn ^r ; commercial cloning vector	Invitrogen
pEX100-T	Ap ^r ; mobilisable vector, non-replicative in <i>P. aeruginosa</i>	(24)
pRK2013	Kn ^r ; helper plasmid with conjugative properties	(25)
pUC18-mini-Tn7T-lacZ20-Gm	Gm ^r ; translational fusion vector	(26)
pUC18-mini-Tn7T-pGacS	Promoter and entire <i>gacS</i> sequence of PAO1 cloned into the integrative vector	This study
pUC18-miniTn7T-PA0081-lacZ	<i>pfha1-lacZ</i> translational fusion in pUC18-mini-TN7T-lacZ20-Gm	(27)
pCTX-PA0081-lacZ	Tc ^r ; <i>pfha1-lacZ</i> transcriptional fusion in mini-CTX-lacZ	(27)
pJN105	Gm ^r ; <i>pBAD</i> transcriptional fusion vector	(28)
pJN-GacS	<i>pBAD-gacS</i> transcriptional fusion in pJN105	This study
pVLT31	Tc ^r ; <i>plac</i> transcriptional fusion vector	(29)
pVLT-RsmA	<i>plac-rsmA</i> transcriptional fusion in pVLT31	This study
pMP220	Tc ^r ; <i>lacZ</i> transcriptional fusion vector	(30)
pMP220- <i>rsmY-lacZ</i>	<i>prsmY-lacZ</i> transcriptional fusion in pMP220	(31)
pMP220- <i>rsmZ-lacZ</i>	<i>prsmY-lacZ</i> transcriptional fusion in pMP220	(31)

705
706
707

A



B

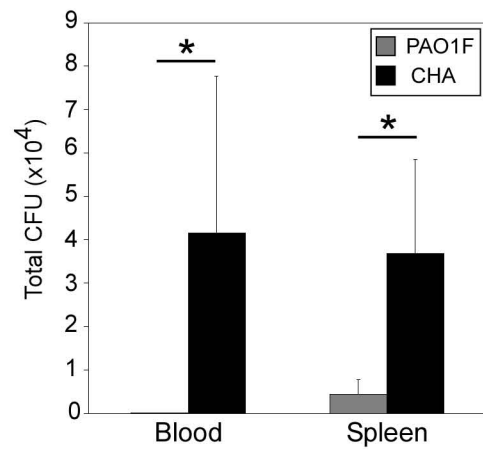


Figure 1

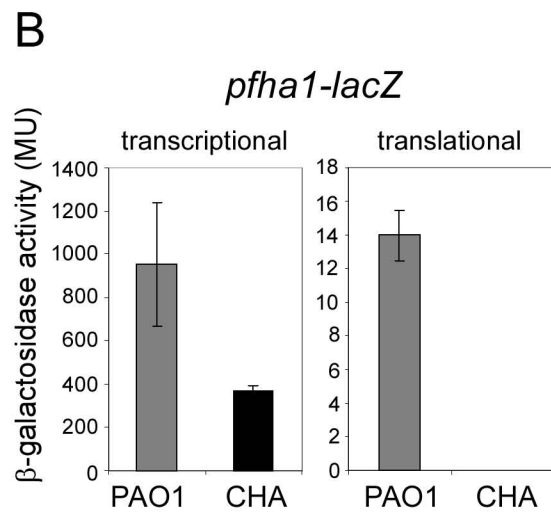
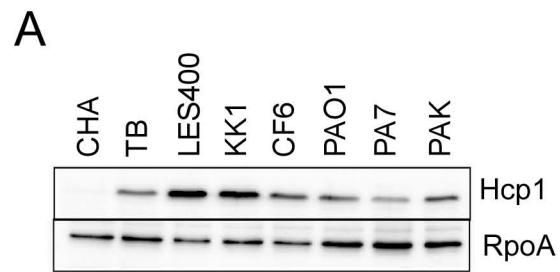


Figure 2

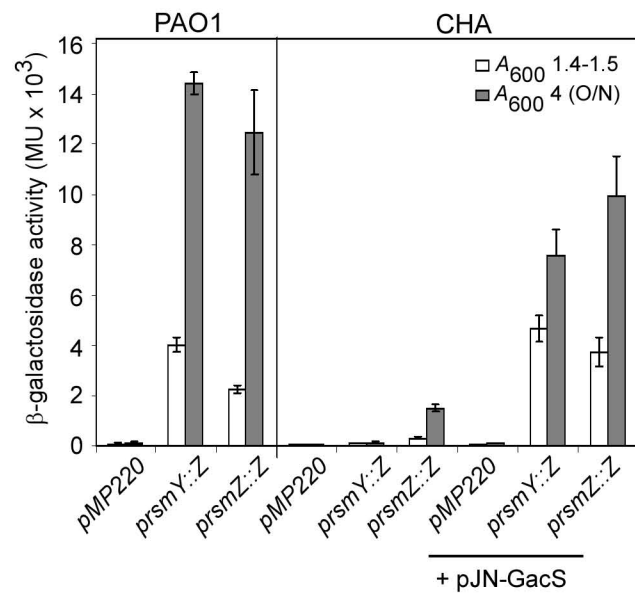
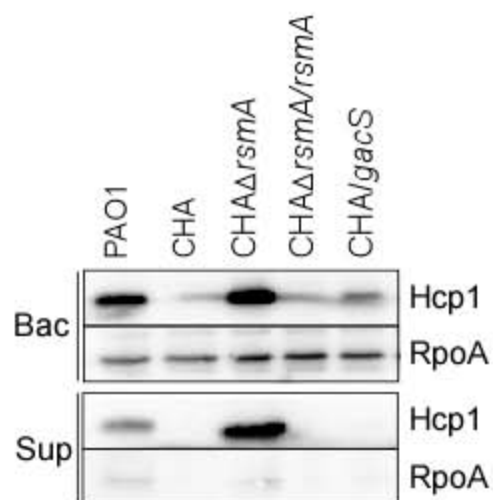


Figure 3

A



B

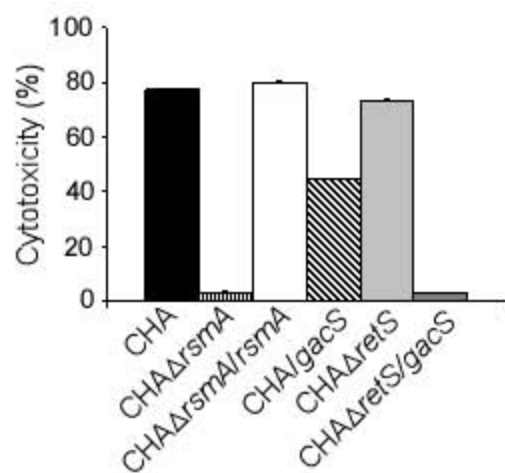


Figure 4

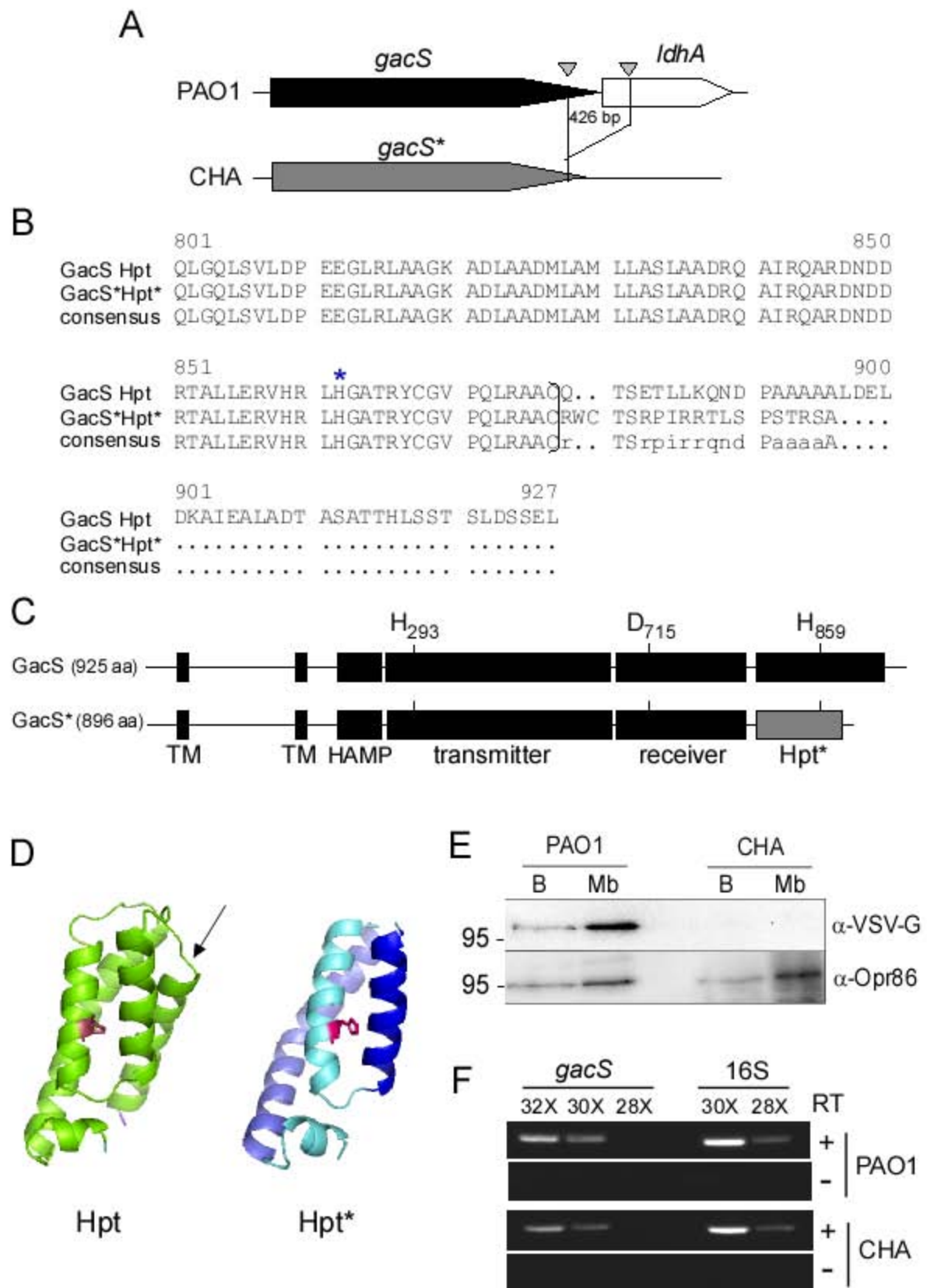


Figure 5

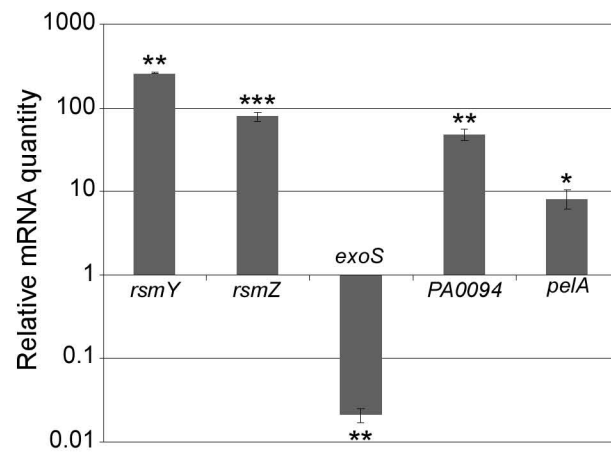


Figure 6

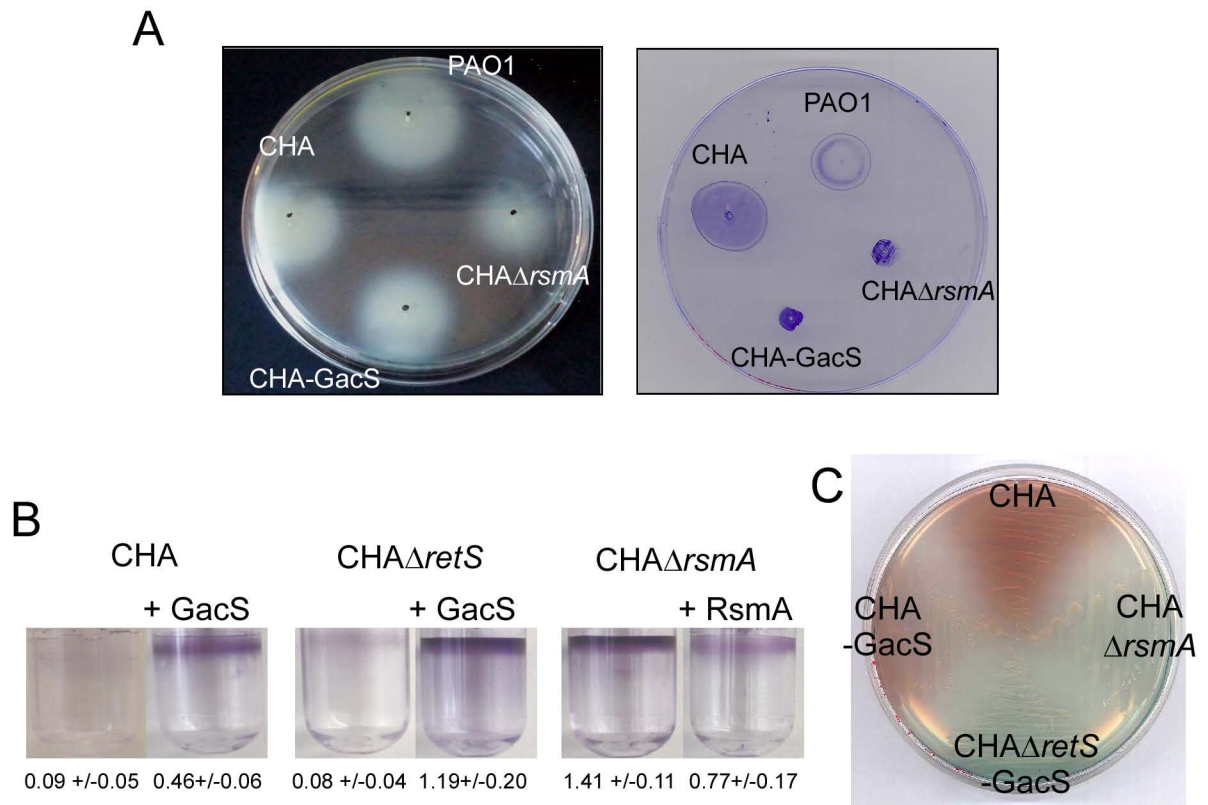


Figure 7



PIA - Gm₄₀₀ - arabinose 0.2 %

Supplemental Figure S1

The mucoid phenotype of CHA is complemented by a functional *mucA* copy.

CHA strains containing either pJN105 (empty vector) or pJN-MucA were plated on PIA plates containing gentamicin and arabinose, as indicated, for 16 hours at 37°C.

An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*

Maria G. Casabona,^{1,2,3,4†} Julie M. Silverman,^{5†}
Khady M. Sall,^{1,2,3,4} Frédéric Boyer,⁶
Yohann Couté,^{3,4,7} Jessica Poirel,^{1,2,3,4}
Didier Grunwald,^{1,2,3,4} Joseph D. Mougous,⁵
Sylvie Elsen^{1,2,3,4} and Ina Attree^{1,2,3,4*†}

¹INSERM, UMR-S 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France.

²CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France.

³UJF-Grenoble 1, F-38041 Grenoble, France.

⁴CEA, DSV/iRTSV, F-38054 Grenoble, France.

⁵Department of Microbiology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

⁶Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS 5553, Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France.

⁷INSERM, U1035, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France.

Summary

Pseudomonas aeruginosa is capable of injecting protein toxins into other bacterial cells through one of its three type VI secretion systems (T6SSs). The activity of this T6SS is tightly regulated on the posttranslational level by phosphorylation-dependent and -independent pathways. The phosphorylation-dependent pathway consists of a Threonine kinase/phosphatase pair (PpkA/PppA) that acts on a forkhead domain-containing protein, Fha1, and a periplasmic protein, TagR, that positively regulates PpkA. In the present work, we biochemically and functionally characterize three additional proteins of the phosphorylation-dependent regulatory cascade that controls T6S activation: TagT, TagS and TagQ. We show that similar to TagR, these proteins act upstream of the PpkA/PppA checkpoint and influence phosphorylation of Fha1 and, apparatus assembly and effector export. Localization studies demonstrate that TagQ is an outer membrane lipoprotein and TagR

is associated with the outer membrane. Consistent with their homology to lipoprotein outer membrane localization (Lol) components, TagT and TagS form a stable inner membrane complex with ATPase activity. However, we find that outer membrane association of T6SS lipoproteins TagQ and TssJ1, and TagR, is unaltered in a $\Delta tagTS$ background. Notably, we found that TagQ is indispensable for anchoring of TagR to the outer membrane fraction. As T6S-dependent fitness of *P. aeruginosa* requires TagT, S, R and Q, we conclude that these proteins likely participate in a trans-membrane signalling pathway that promotes H1-T6SS activity under optimal environmental conditions.

Introduction

Bacteria cope with their environment through an arsenal of secreted macromolecular products that are transported across the bacterial envelope by protein complexes called secretion systems. Gram-negative bacteria possess six secretion machineries, each of divergent composition and function (Desvaux *et al.*, 2009; Bleves *et al.*, 2010). *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic human pathogen associated with a variety of acute and chronic diseases, possesses five of these, including the types III and VI secretion systems (T3SS and T6SSs) (Bleves *et al.*, 2010). A defining feature of these two protein export machines is that they allow for the export of cargo proteins directly into eukaryotic and/or prokaryotic cells (Cornelis, 2010; Schwarz *et al.*, 2010). While the composition and mechanism of the T3SS has been studied in great detail (Galan and Wolf-Watz, 2006; Mattei *et al.*, 2010), the existence of T6SS has been described only recently and their function and composition are still largely unexplored.

T6SSs are encoded by genes organized in operons within genetic islands. In some instances, multiple T6SS are present in a given bacterial genome (Cascales, 2008; Filloux *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2009). Bioinformatics studies revealed that T6SSs are composed of 13 highly conserved core components and a set of additional proteins termed Tags (type six secretion-associated genes) (Shalom *et al.*, 2007; Boyer *et al.*, 2009). Two core components are similar to IcmF and DotU of type IV secretion

Received 1 December, 2011; revised 25 May, 2012; accepted 31 May, 2012. *For correspondence. E-mail iattreedelic@cea.fr; Tel. (+33) 438783483; Fax (+33) 438784499. †Present address: BCI, 'Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses', iRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France. ‡Contributed equally to this work.

system (T4SS) (Fronzes *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009), and one protein, ClpV, belongs to a family of AAA+ ATPases (Bonemann *et al.*, 2009). A hallmark of all T6SS is the presence of two conserved proteins, Hcp (haemolysin co-regulated protein) and VgrG (valine-glycine repeat protein G). These proteins share sequence and structural homology with tail tube and spike proteins of bacteriophage, respectively (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2007; 2009; Leiman *et al.*, 2009), and are proposed to form an injection device. Some specialized VgrG proteins possess C-terminal domains that contain eukaryotic cell effector activities. An example is VgrG-1 of *Vibrio cholerae*, which can cross-link host actin (Pukatzki *et al.*, 2007).

Hcp Secretion Islands I–III (HSI-I to III) of *P. aeruginosa* encode three potential T6SSs. The HSI-I-encoded T6SS (H1-T6SS) has been shown to be active in chronic *P. aeruginosa* infections, as sputum of chronically infected cystic fibrosis patients contains Hcp1 and the serum of these patients shows the presence of Hcp1-specific antibodies (Mougous *et al.*, 2006). Furthermore, a mutation in HSI-I operons affected the survival of *P. aeruginosa* in a rat model of chronic respiratory infection (Potvin *et al.*, 2003). The H1-T6SS specifically exports at least three proteins, Tse1, Tse2 and Tse3 (type VI secretion exported 1–3). These proteins are important for fitness in interbacterial competition assays (Hood *et al.*, 2010). While the target of Tse2 is not known, Tse1 and Tse3 are toxins targeting peptidoglycan of adjacent bacteria (Russell *et al.*, 2011).

As with other secretion systems of *P. aeruginosa*, the H1-T6SS is finely regulated at several levels. Goodman *et al.* have shown that HSI-I operons are posttranscriptionally regulated by the Gac/Rsm pathway. Two sensor kinase/response regulator hybrid proteins, RetS and LadS, reciprocally regulate the H1-T6SS through this pathway (Goodman *et al.*, 2004; Moscoso *et al.*, 2011). A second level of regulation is exerted directly on H1-T6SS activity and depends on a set of accessory genes within HSI-I (Fig. S1). Among the proteins encoded by these genes are a trans-membrane threonine protein kinase, PpkA, a PP2C-type phosphatase, PppA, and a periplasmic protein, TagR, which promotes dimerization-induced activity of the kinase (Mougous *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2009). The cytoplasmic target of PpkA is a Forkhead Associated domain (FHA)-harbouring protein, Fha1. Fha1 is in a complex with the ClpV1 ATPase, and upon phosphorylation of Fha1, effector export is triggered (Mougous *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2009). This regulatory pathway will be referred to hereafter as the threonine phosphorylation pathway (TPP; Silverman *et al.*, 2011). Reminiscent of T3SS activity, the intoxication of target cells by T6S effectors requires close cell–cell contact (Pettersson *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 2011). Interestingly, the TPP is stimulated when *P. aerugi-*

nosa is grown on a surface, as observed by increased levels of phosphorylated Fha1 and Hcp1 secretion (Silverman *et al.*, 2011). These findings suggest that the TPP responds to specific physiological stimuli. In addition to this pathway, TagF, a protein encoded upstream of *pppA*, has been reported to function as a negative posttranslational regulator of the H1-T6SS that acts independently of the TPP (Silverman *et al.*, 2011).

Three uncharacterized genes, *tagT*, *tagS* and *tagQ*, neighbour genes involved in the TPP. In the current study, we found that the proteins encoded by these genes act upstream of PpkA in the TPP and are required for efficient protein transport through the T6S machinery. We demonstrated that in a heterologous host, TagT and TagS form a membrane-bound complex with ATPase activity, features characteristic of bacterial ABC transporters. We also investigated the localization of TagQ and showed that its outer membrane localization requires a conserved cysteine within the lipo-box sequence. TagQ, but not TagTS, is required for association of the kinase activator, TagR, with the outer membrane fraction. These findings, together with *in silico* analysis of available genomes, illustrate the complexity and novelty of trans-membrane signalling that lead to tuning of H1-T6SS activity.

Results

TagT, *TagS* and *TagQ* participate in posttranslational regulation of the H1-T6SS

TagT, TagS and TagQ are non-conserved T6SS components (Boyer *et al.*, 2009) encoded within the HSI-I operon that contains each of the known posttranslational regulators of the system (*tagR*, *ppkA*, *pppA* and *tagF*) (Mougous *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2011). Furthermore, conserved synteny of *tag* genes with *ppkA* and *pppA* in *Pseudomonas* species, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina* and *Pseudomonas brassicacearum* (<http://www.pseudomonas.com/>), suggests their functional relationship (Fig. S1).

Our previous work on the H1-T6SS has shown that the basal activation of the system in wild-type cells is exceedingly low. Indeed, under planktonic conditions, the quantity of secreted Hcp1 is below standard detection levels. However, using more sensitive detection methods, we found that basal Hcp1 secretion levels can be distinguished from background levels observed in an H1-T6SS-inactive strain ($\Delta ppkA$) (Fig. 1A). In this study, we utilize this basal level of Hcp1 secretion as a means to investigate genes involved in H1-T6SS activation. To evaluate the contribution of TagT, TagS and TagQ to T6S activity, Hcp1 secretion levels were assayed in strains with *tagT*, *tagS* or *tagQ* deletions. Secreted Hcp1 levels of these strains were compared with strains that abrogate Hcp1 secretion ($\Delta ppkA$ and $\Delta tagR$). As shown in Fig. 1A,

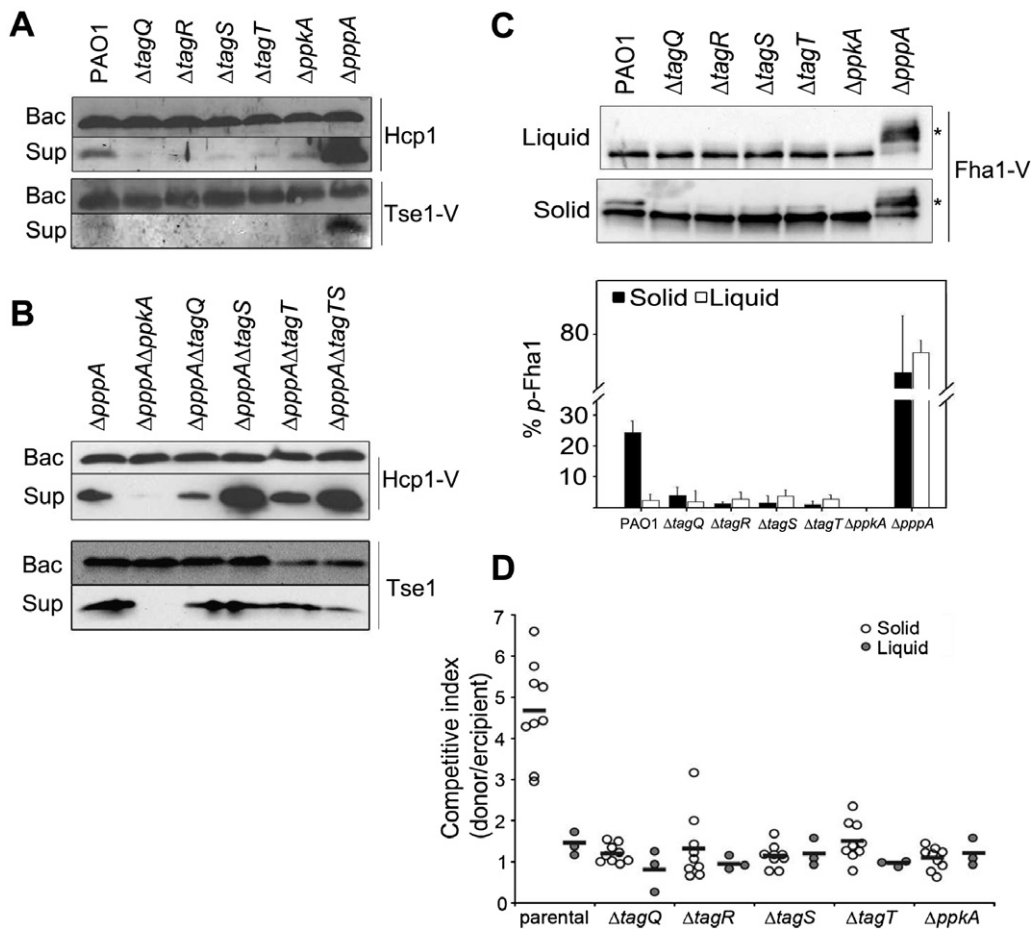


Fig. 1. TagT, TagS and TagQ are required for activation of the H1-T6SS.

A. Analysis of Hcp1 (structural component) and Tse1 (effector) export from strains containing in-frame deletions of *tag* genes.

B. Cellular and secreted Hcp1 and Tse1 from strains lacking $\Delta pppA$ and indicated *tag* gene.

C. Western blot analysis of Fha1 from indicated strains grown either in liquid or on solid medium. The band corresponding to phosphorylated Fha1 (*p*-Fha1) is indicated by an asterisk. Lower panel corresponds to the quantification of *p*-Fha1. Experiments were performed in triplicate (black = solid grown, white = liquid grown). Bac: bacteria, sup: supernatant.

D. *P. aeruginosa* requires *tagT*, *S*, *R* and *Q* for an H1-T6SS-dependent fitness advantage against competing bacteria. The competitive index is plotted for competitions between each indicated donor strain and a H1-T6SS-susceptible recipient strain of *P. aeruginosa* (PAO1 $\Delta tse2 \Delta tsi2$) (Hood *et al.*, 2010) (white = solid grown, gray = liquid grown).

individual isogenic PAO1 mutants ($\Delta tagT$, $\Delta tagS$ and $\Delta tagQ$) were impaired in Hcp1 export.

The H1-T6SS exports three low-molecular weight effectors encoded by genes outside of the HSI-I locus, Tse1, Tse2 and Tse3 (Hood *et al.*, 2010). To determine the effect of *tagT*, *tagS* and *tagQ* genes on Tse export, we analysed secretion levels of Tse1 in the mutant strains. To detect Tse1, a chromosomal fusion of vesicular stomatitis virus G encoding sequence (VSV-G) to *tse1* (Tse1-V) was used (Hood *et al.*, 2010). As in the case of Hcp1, the quantity of secreted Tse1-V was decreased in strains lacking *tagT*, *tagS* and *tagQ*. To gain information regarding the functional hierarchy of the Tag proteins relative to the TPP, we examined Hcp1 and Tse1 export in mutants prepared in the $\Delta pppA$ background. Strains lacking both the *tag* genes and *pppA* did not display a decrease in Hcp1 secretion

levels (Fig. 1B), suggesting that these proteins represent regulatory accessory components that act upstream of the kinase/phosphatase checkpoint. Interestingly, the deletion of *tagS* in strains lacking *pppA* reproducibly resulted in higher levels of exported Hcp1, but not Tse1, relative to *pppA* and the other *tag* genes. Possible explanations for this finding are discussed below.

Phosphorylation of Fha1 requires PpkA and is promoted by growing bacteria on solid medium (Silverman *et al.*, 2011). To determine if TagT, TagS and TagQ affect phosphorylation of Fha1, we assayed phosphorylated Fha1 (*p*-Fha1) levels in *tag* deletion strains. A chromosomal *fha1*-VSV-G fusion was used and *p*-Fha1 levels were detected by electrophoretic mobility shift (Fig. 1C). Consistent with previous studies, we observed an increase in *p*-Fha1 levels in the wild-type background

when grown on solid versus liquid media. Interestingly, individual *tag* deletion strains abrogated surface growth-dependent *p*-Fha1 levels. As expected, under liquid growth conditions, only low levels of *p*-Fha1 were detected in all strains containing PppA. Taken together with the secretion phenotypes observed, these results suggest that TagT, TagS and TagQ act upstream of PpkA in the TPP.

tagT, S and Q are required for T6S-dependent fitness

Previous studies have shown that the TPP activates the H1-T6SS during surface growth and therefore is required for H1-T6S-dependent fitness against competing bacteria (Silverman *et al.*, 2011). We hypothesized that if TagT, S and Q act upstream of PpkA in the TPP, these proteins should contribute to H1-T6SS-dependent fitness. Using growth competition assays, we assessed the fitness of donor strains containing in-frame deletion of *tagT*, S or Q relative to a Tse2-sensitive recipient strain ($\Delta tse2 \Delta tsi2$) (Fig. 1D). This experiment confirmed that *tagT*, S or Q are required for H1-T6SS-dependent fitness. As an additional control, we included a donor strain lacking TagR, a protein previously demonstrated to act upstream of PpkA in the TPP. This strain also displayed a loss of H1-T6SS-dependent fitness. Together with their involvement in promoting surface-dependent Fha1 phosphorylation, these findings support a critical role for TagT, S and Q in TPP activation during surface growth.

TagT and *TagS* form a membrane-bound complex with ATPase activity

TagT and TagS share sequence signatures with bacterial ABC transporters (Davidson *et al.*, 2008). The *tagT* gene encodes a protein of 26 kDa with Walker domains (Walker A and Walker B) and other conserved features of ATPases associated with ABC transporters as shown in Fig. 2A. The *tagS* gene encodes a protein of 42 kDa, predicted to be an integral membrane protein with four hydrophobic trans-membrane helices (TMH) and a long periplasmic segment of 233 amino acids between TMH1 and TMH2. BLAST analysis showed high homology of TagS and TagT with membrane components of the lipoprotein outer membrane localization (Lol) complex (Narita and Tokuda, 2006), sharing 56.0%/38.5% and 40.0% similarity with LolE/LolC and LolD of *P. aeruginosa*, respectively (Tanaka *et al.*, 2007) (Fig. 2A). Based on sequence homology, the predicted TagT protein belongs to a family of MecA/FtsE/SalX ATPases of bacterial ABC transporters (see also *Discussion*).

To investigate the mechanism by which TagT, S and Q regulate the H1-T6SS through the TPP, we purified the proteins and conducted biochemical analyses.

Co-production of TagT and TagS resulted in formation of a stable protein complex associated with *Escherichia coli* membranes that could be solubilized by a detergent and purified to homogeneity by affinity chromatography (Fig. 2B). As mentioned previously, TagT harbours all conserved signatures of classical ATPases. In order to test whether the TagTS complex is capable of ATP hydrolysis, the complex was incubated in the presence of ATP and magnesium and the formation of inorganic phosphate (Pi) was quantified by a malachite green method (Van Veldhoven and Mannaerts, 1987). Notably, the TagTS complex displayed significant ATPase activity varying, in three independent purifications, between 70 and 100 nmolPi min⁻¹ mg⁻¹. The specific activities of the TagTS complex was consistent with activities of several bacterial ABC transporters reported to date (Ravaud *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2009). Moreover, the ATPase activity of the complex was sensitive to orthovanadate (Fig. 2C), a small organic molecule that impedes ATP hydrolysis by interfering with binding of ATP to the Walker A motif (Pezza *et al.*, 2002). Finally, to confirm that ATP hydrolysis was due to the TagTS complex, we replaced a conserved amino acid within the Walker A motif of TagT (K/A: Lys 44 to Ala) and purified the complex (Fig. 2B). The K/A mutation abolished ATPase activity of the TagTS complex (Fig. 2C). In conclusion, these results clearly show that the TagTS complex possesses ATPase activity that is dependent on the conserved Walker A motif within the TagT ATPase.

TagQ encodes an outer membrane lipoprotein

The last gene of the operon, *tagQ*, encodes a 31.7 kDa protein with a stretch of hydrophobic and uncharged amino acids at the N-terminus. This sequence is characteristic of a signal peptide and conserved lipo-box with an invariable Cysteine, a sequence recognized by signal peptidase II (Babu *et al.*, 2006) (Fig. 3A). In order to study the localization of TagQ in *P. aeruginosa*, we created a fusion protein between TagQ and the red fluorescent protein mCherry, and examined its localization by confocal microscopy using green fluorescent protein (GFP)-expressing *P. aeruginosa* strains (GFP TagQ-mCherry). TagQ-mCherry was readily detected and localized around the periphery of bacterial cells (Fig. 3A). To gain information on the precise localization of TagQ, *P. aeruginosa* cells were treated with lysozyme to create spheroplasts, bacterial cells lacking the peptidoglycan layer. *P. aeruginosa* spheroplasts, while maintaining an intact internal membrane, appear to have a crescent-shaped external membrane as it begins to dissociate from the rest of the spheroplast (Lewenza *et al.*, 2008). When *P. aeruginosa* GFP TagQ-mCherry was treated to obtain spheroplasts, the majority of cells retained mCherry fluorescence in the

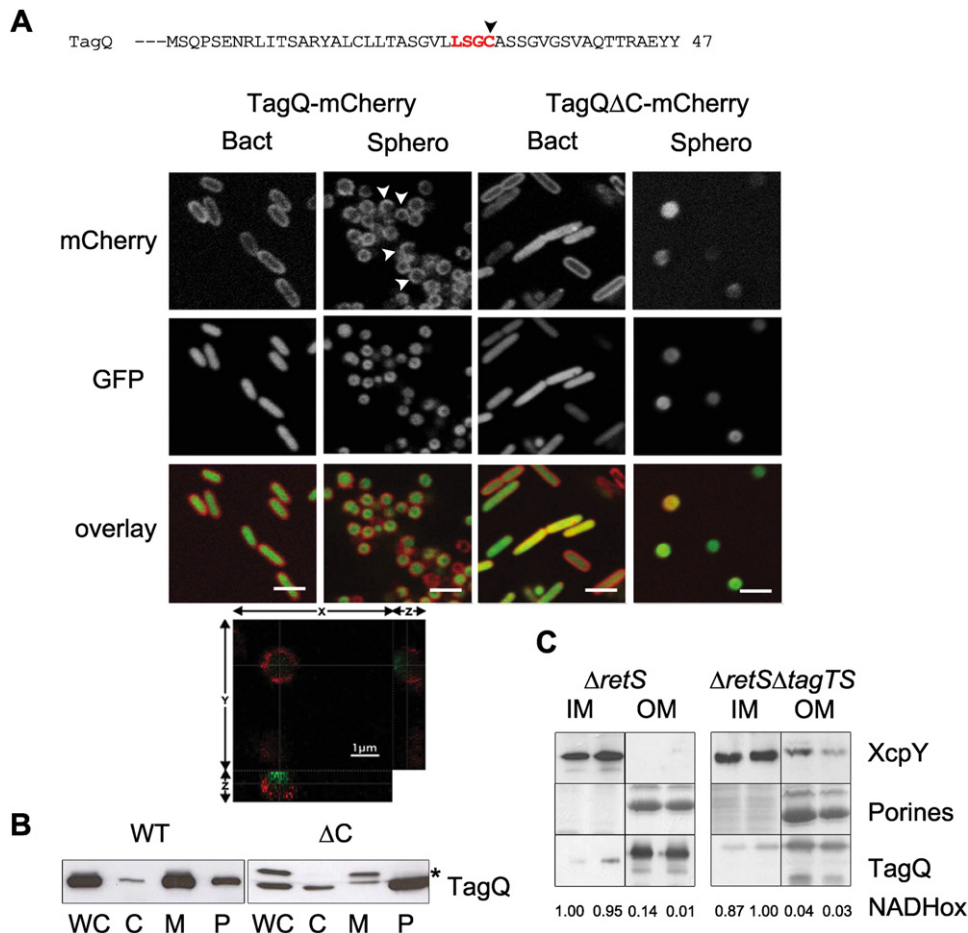


Fig. 3. TagQ is an outer membrane lipoprotein that localizes independent of TagTS.

A. The N-terminal sequence and lipo-box (in red) of TagQ is shown. The mutated cysteine is indicated by an arrow. Confocal microscopy images of PAO1 Δ retS-GFP producing TagQ-mCherry or TagQ Δ Cys-mCherry. TagQ-mCherry is localized at the bacterial periphery. White arrows on spheroplast images indicate the crescent-shape labelling of the OM. The bar represents 2 μ m. Bact: bacteria; Sphero: spheroplasts. The confocal image in XYZ confirms the presence of the protein in the OM.

B. Subcellular fractionation of PAO1 Δ tagQ complemented with a plasmid encoding TagQ (WT) or TagQ Δ Cys (Δ C). Whole cells (WC), cytosol (C), membranes (M) and periplasm (P) were analysed by Western blot using specific antibodies against TagQ. Δ Cys mutation results in partial processing of the protein (indicated with an asterisk) and its accumulation in the periplasm.

C. Discontinuous sucrose gradient separation of inner and outer membranes in PAO1 Δ retS and PAO1 Δ retS Δ tagTS. Fractions were characterized by NADH oxidase (NADHox) activity, SDS-PAGE and Western blotting using anti-TagQ antibodies. NADH oxidase activity is represented relative to the fraction with the highest level activity (noted as 1.0). XcpY was used as an IM marker and porines visualized in Coomassie blue stained gels as an OM marker. The representative IM and OM fractions are indicated. The analysis of the whole gradient is shown in Fig. S2.

brane labelling, strongly suggesting that in most cases the protein had lost its lipid anchor and was released by lysozyme treatment (Fig. 3A). These observations were immuno-quantified by fractionation of membranes and periplasm of Δ tagQ strains ectopically expressing wild-type tagQ or tagQ Δ Cys (Fig. 3B). The deletion of Cys30 resulted in partial processing of the protein, as two anti-TagQ-specific polypeptides were visualized in total bacterial extracts. In addition, while the majority of wild-type TagQ was found to be associated with membrane fractions, the majority of the mutated protein was recovered in periplasmic fractions, in concordance with confocal microscopy observations.

The Lol-like TagTS complex is dispensable for OM localization of TagQ and TssJ1

As the TagTS complex shows significant homology with lipoprotein recycling systems of *E. coli* and *P. aeruginosa*, we first hypothesized that this complex is involved in the transport of specific lipoproteins of the H1-T6SS. To compare membrane distribution of TagQ in different strains, we set up membrane fractionation experiments on discontinuous sucrose gradients coupled to immunodetection. These experiments were performed using *P. aeruginosa* Δ retS background to obtain higher expression of the whole HSI-I locus. The quality of separation

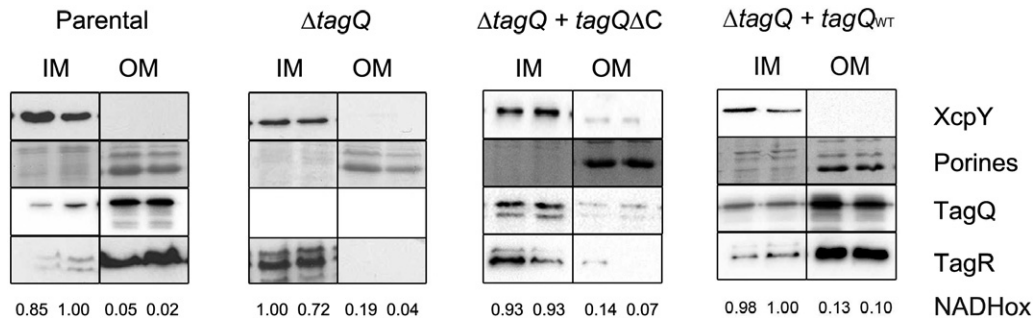


Fig. 4. Outer membrane localized TagQ is required for outer membrane anchoring of TagR. Membrane separations and analysis were performed as described in Fig. 3C. Strains used were: PAO1 (parental), PAO1 Δ tagQ and PAO1 Δ tagQ expressing either TagQ Δ Cys or TagQ_{WT}. Only the representative IM and OM fractions are shown. TagR and TagQ were detected by specific antibodies.

between inner (IM) and outer membranes (OM) was systematically determined by measuring the activity of NADH oxidase and by Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels of each recovered fraction. As shown in Fig. 3C, in accordance with microscopy experiments, the majority of TagQ was found in OM fractions. In order to determine whether the Lol-like ABC transporter TagTS was involved in localization of TagQ, we fractionated membranes of Δ retS Δ tagTS in an identical manner and detected no significant difference of TagQ distribution between the two strains (Figs 3C and S2 for complete gradients). The second lipoprotein of the H1-T6SS is TssJ1 (PAO080). TssJ1 shares 50% similarity with OM lipoprotein SciN involved in assembly of the Sci-1 T6SS of enteroaggregative *E. coli* (Aschtgen *et al.*, 2008). To ascertain whether TssJ1 is targeted to the OM in *P. aeruginosa*, we constructed a fusion between TssJ1 and mCherry, and examined its localization by confocal microscopy (not shown) and by fractionation on discontinuous sucrose gradients. Similar to our findings with TagQ, TssJ1-mCherry associated with the OM and its localization was not significantly altered in the tagTS mutant (Fig. S3). Together these results show that the ABC transporter TagTS, despite its strong homology to the Lol system, does not participate in membrane targeting of two H1-T6SS-specific lipoproteins.

TagQ is required for TagR association with the OM

Preliminary nanoLC/LC mass spectrometry data performed on inner and outer membrane fractions (M.G. Casabona and Y. Couté, unpublished) indicated the presence of TagR, a positive regulator of the TPP, in OM fractions. This result was intriguing, as TagR is predicted to be a soluble protein and was shown to fractionate with the periplasm, wherefrom it promotes dimerization and activation of PpkA (Hsu *et al.*, 2009). To further address the localization of TagR, we raised anti-TagR antibodies and analysed fractionated membranes from wild-type

PAO1, confirming that at least one portion of TagR associated with outer membranes (Fig. 4). This association was significant, as a soluble periplasmic protein, DsbA, was not found in any of the membrane fractions (not shown). Whereas TagR OM localization was not altered in a tagTS mutant (Fig. S4), the absence of tagQ clearly influenced the distribution of TagR between inner and outer membrane fractions (Fig. 4). In accordance, a strain expressing tagQ Δ Cys *in trans*, resulted in TagR mislocalization, demonstrating that OM-anchored TagQ is essential for OM localization of TagR. Of note, TagR was found dispensable for OM localization of the TagQ lipoprotein (Fig. S5).

In silico genome wide analysis of TagTSR-like systems

Participation of the TagTS complex in trans-membrane signalling involving a periplasmic protein TagR and an inner membrane-bound Ser/Thr kinase prompted us to perform *in silico* analysis of all available complete bacterial genomes to search for homologues of these proteins. Both TagT and TagS attributed COGs (COG1136-COG4591) are frequently adjacent to other ABC transporter-specific COGs involved in peptide and drug transport, specifically COG0845 and COG0577 which are membrane components of the AcrA and SalY family of multidrug efflux pumps and antimicrobial peptides transport systems, respectively. We found also two strong associations between COG1136-COG4591 tandem and regulatory partners. In 90 *Firmicutes*, ABC transporters are encoded adjacent to homologues of the OmpR family two-component regulatory system (COG0642 and COG0745). In addition, in 100 *Enterobacteriaceae*, ABC transporters are encoded upstream of NagC (COG1940), a transcriptional regulator involved in sugar transport. This observation suggests a more general functional relationship between the TagTS family of ABC transporters with trans-membrane signalling and regulation. Finally, we examined the local organization of chromosomal regions

encoding the ATPase component (TagT, COG1136), the predicted permease component (TagS, COG4591) and COG1262 (TagR) in all available microbial genomes. TagQ was excluded from this screen as it lacks an attributable COG number. As shown by a maximum likelihood tree (Fig. 5), *tagT*, *S* and *R* are predominately found within T6SS-encoding loci in *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *P. fluorescens*, *P. brassicacearum*). We found that in *Rhodobacter sphaeroides*, an α -proteobacterium that possess a T6SS locus with similar gene content of HSI-I, *tagT*, *S* and *R* are neighbouring genes coding for PpkA and PppA homologues. However, *tagT*, *S* and *R* are not exclusively found in bacterial genomes encoding T6SS, suggesting that these components may play a role in different cellular processes.

Discussion

Our current study identified TagT, TagS and TagQ as new components of a posttranslational regulatory pathway that modulates the activity of the H1-T6SS of *P. aeruginosa*. We found that these components participate in a phosphorelay system that is stimulated by surface growth conditions. Phosphorelay systems are classical ways for bacteria to regulate adaptive cellular responses induced by external stimuli; however, to our knowledge, this is the first example of an ABC transporter complex, TagTS, participating in trans-membrane signalling that involves a Ser/Thr kinase-dependent phosphorylation pathway.

Some parallels can be made with a large family of 'co-sensor' ABC transporters that interact with membrane-integrated histidine kinases (HK) (Tetsch *et al.*, 2008; Tetsch and Jung, 2009). These proteins clearly play a regulatory role in adaptive responses to certain environmental stimuli (Tetsch *et al.*, 2008). This is well illustrated by the ABC transporter PstSCAB of *E. coli* that is linked to sensing inorganic phosphate in phosphate-limiting conditions. It has been proposed that the membrane components of this ABC transporter transmit the signal towards the membrane-integrated HK, PhoR, which signals to a transcriptional regulator (response regulator, RR) (Makino *et al.*, 1989). A role for related systems in resistance against antimicrobial peptides was recently proposed (Coumes-Florens *et al.*, 2011; Dintner *et al.*, 2011). For example, it has been experimentally demonstrated in *Staphylococcus aureus* that the detection of, and response to, antibiotic peptide bacitracin requires the interplay between two ABC transporters, BraD/BraE and VraD/VraE, and the HK/RR system BraS/BraR (Hiron *et al.*, 2011). Interestingly, our *in silico* analysis showed that genes encoding TagTS-like proteins (COG1136-COG4591) frequently co-occur with genes encoding proteins that participate in two

component-regulatory systems. In addition, our *in silico* analysis highlights the association of TagTS-like proteins with NagC, a transcriptional regulator involved in the response to *N*-acetylglucosamine and peptidoglycan in *E. coli* and *P. aeruginosa* (Pennetier *et al.*, 2008; Korgonkar and Whiteley, 2011), further implying their participation in signal recognition and transmission. It is worth noting that in at least one non-*Pseudomonas* T6SS, *Vibrio anguillarum*, an inner membrane polypeptide belonging to a major facilitator superfamily of transporters is required for regulating Hcp export and two additional periplasmic proteins contribute to this signalling (Weber *et al.*, 2009).

The TagTS complex could be involved in export or import of a small molecule required for activating the H1-T6SS, or it may play a structural role by stabilizing other Tag proteins. Future experiments aim to determine whether TagT ATPase activity and a long periplasmic loop present in TagS are required for its role in signalling. The apparent conflicting effects on Hcp1 export between $\Delta pppA \Delta tagS$ versus $\Delta pppA \Delta tagTS$ (Fig. 1) suggest a possible second role for the integral inner membrane domain of TagS, independent of its ATPase partner, TagT. Interestingly, a long periplasmic loop present in TagS-related proteins, LolC and BraB, mediates the detection of cognate substrates, lipoproteins and bacitracin respectively, and it was proposed, for BraB, to interact through the inner membrane with the HK partner.

Outer membrane-localized TagQ is a top candidate for signal detection. The region from amino acids 68 to 114 of TagQ is annotated as PF05433, a family of proteins that include several *Rickettsia* genus specific 17 kDa surface antigens, annotated also as a conserved trans-membrane alpha-helical region containing glycine zipper motifs (<http://pfam.sanger.ac.uk>). There is rising evidence that OM lipoproteins play crucial roles in trans-membrane signalling in bacteria. A well-characterized example is the Rcs phosphorelay in *E. coli*, which reflects envelope stress response activated by peptidoglycan stress and antibiotics. In this complex system, RcsF, an OM lipoprotein, is proposed to transmit the signal to the IM-located HK sensor and allow further signal transduction from the cell envelope to the cytoplasm (Farris *et al.*, 2010; Leverrier *et al.*, 2011).

What may be the link between IM TagTS, OM TagQ and the IM PpkA-kinase? The finding that some portion of TagR is also associated with the OM indicates that TagTS, TagR and TagQ may represent a unique complex participating in trans-membrane signalling. Taking into account the sequence predictions for TagR, its role in signal transduction, and our current findings, we hypothesize that TagR associates with membranes through interactions with other OM proteins, such as TagQ. The distribution of TagR between inner and outer membranes was clearly

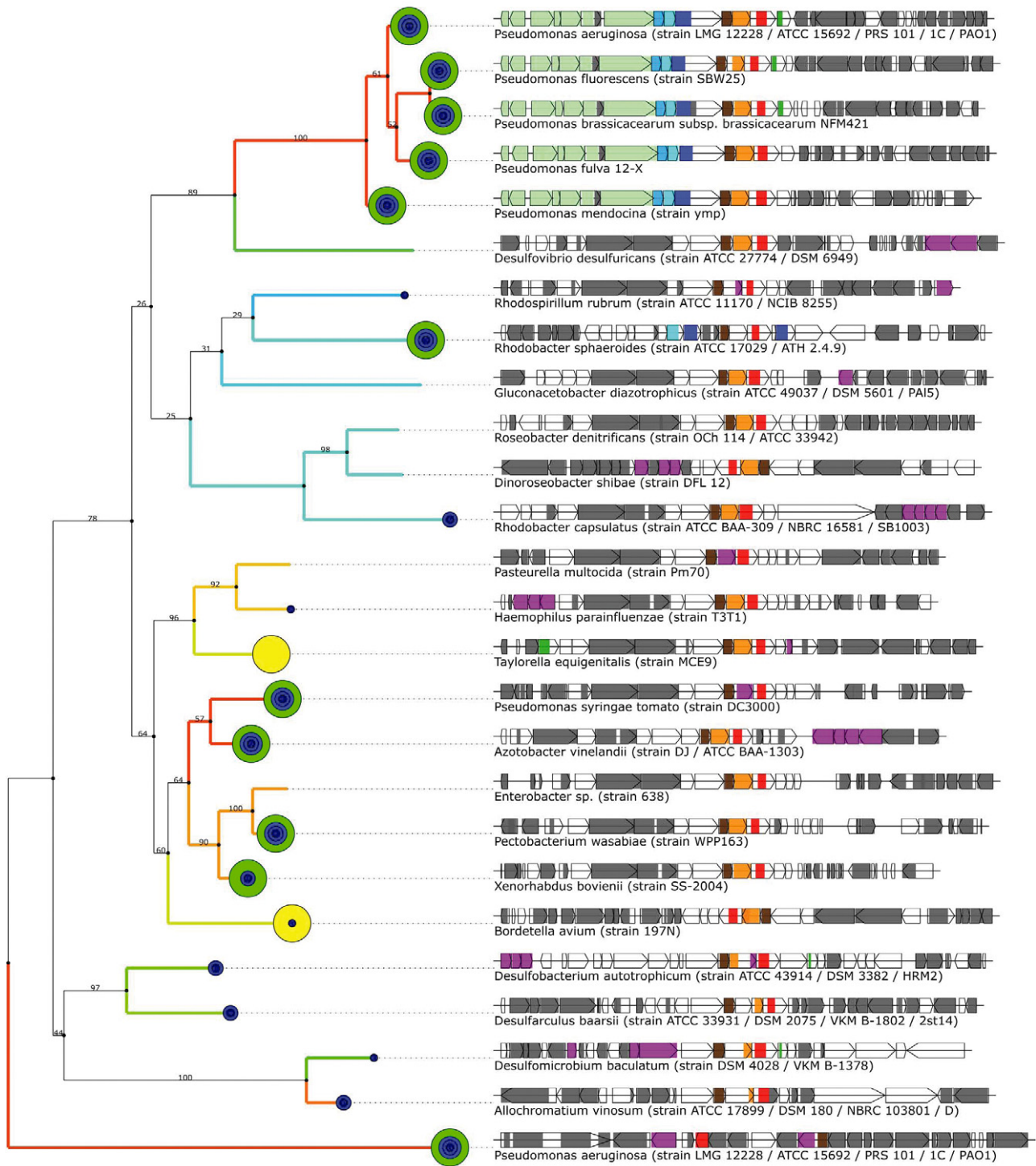


Fig. 5. *In silico* analysis of *tagTSP*-like genes. Maximum likelihood tree of TagR and TagR-like proteins (matching COG1262) with genomic context of the associated genes, together with the periplasmic PvdO protein of *P. aeruginosa* involved in pyoverdine maturation (Yeterian *et al.*, 2010) (and its genomic context) used as outgroup. Green and yellow circles indicate genomes with complete or incomplete T6SS respectively. Inside of circles, blue points indicate the presence of *pppA/ppkA/fha1*. Coloured boxes represent hits on the COG database; colours are according to Fig. S1, except for purple boxes representing hits on ABC transporter related COGs.

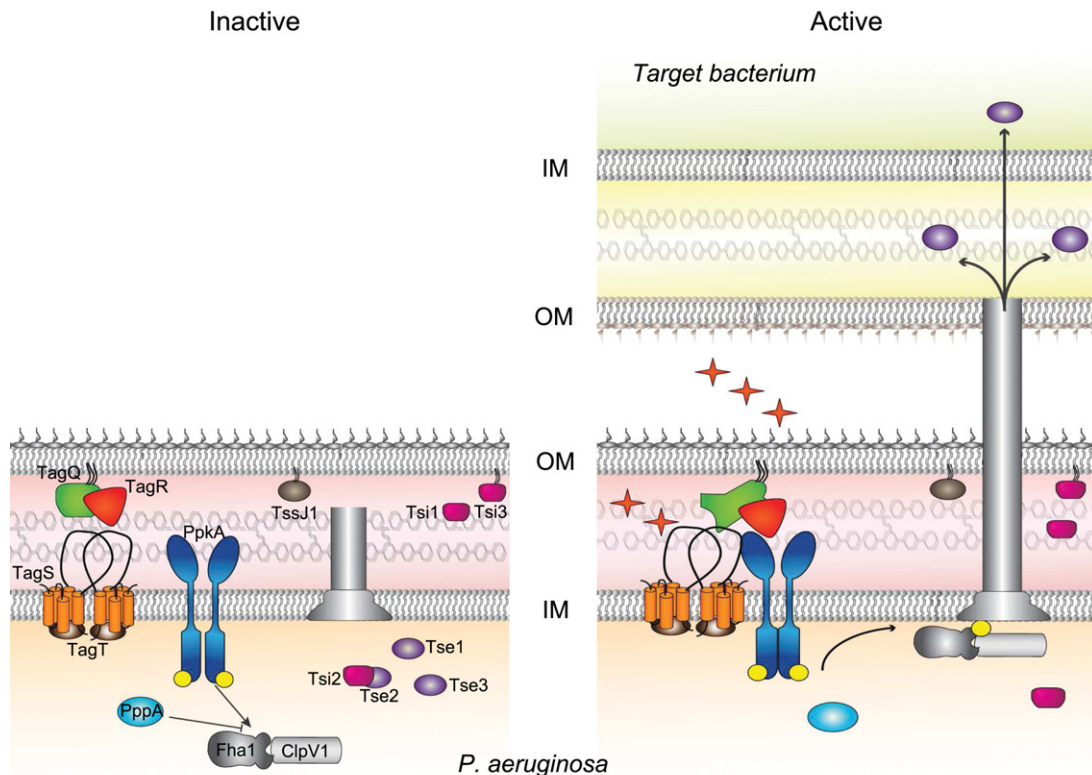


Fig. 6. Model for trans-membrane signalling leading to H1-T6SS activation. The H1-T6S machinery is represented as a single tunnel. Tse1–3 are T6S exported effectors. Molecular players biochemically characterized in this study are: TagQ (OM lipoprotein, *Pseudomonas* specific), TagS and TagT (ABC transporter), TagR (OM associated protein) and TssJ1 (conserved OM lipoprotein). The Ser/Thr kinase, PpkA, and the phosphatase, PppA, as well as the phosphorylation target protein Fha1, are represented. A putative signal is designated by red stars. Proteins are represented using the same colour code as the ORFs in Fig. S1, and yellow spheres indicate phosphorylation. IM and OM of *P. aeruginosa* and the target bacterium are shown.

affected by the absence of TagQ, leaving open the possibility that TagQ may correctly position TagR to interact with the kinase.

Finally, what is the nature of the signal(s) that activate the H1-T6SS? Silverman *et al.* discovered that surface growth of *P. aeruginosa* induces the TPP (Silverman *et al.*, 2011), and, here, we show that *tagQ*, *tagR*, *tagS* and *tagT* are important in surface-induced phosphorylation of Fha1. Moreover, using growth competition assays we showed that the fitness of Tag mutants was impaired. All together these results imply that the predicted ABC transporter, TagTS, and the OM lipoprotein TagQ are essential players in intrabacterial communication through H1-T6SS activity. The rapid detection of neighbouring cells may thus be essential to turning on the injection device.

Although we have no evidence yet demonstrating direct interactions between the four Tag proteins (except for TagT and TagS) and the kinase, PpkA, we propose a model (Fig. 6) in which TagTS and TagQ participate in detection and transmission of an environmental signal to PpkA, by modulating either localization or conformation of the kinase activator TagR, leading to rapid response of

«attacking» bacteria in highly competitive multi-species niches, such as infecting tissue. Our future work will aim at discovering the signal nature and deciphering the connections between Tag proteins and their link with other components of trans-membrane signalling in T6SS.

Experimental procedures

Genetic constructions

Genes of interest were PCR amplified using PAO1 genomic DNA as a template, cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) and sequenced before cloning into final destination vectors. The list of oligonucleotides with appropriate restriction sites is given in Table S1. For overexpression, *tagT* and *tagTS* were amplified and cloned into pETDuet-1. In the pETDuet-*tagTS* bicistronic vector, only *tagT* is fused to a histidine tag encoding sequence. For Hcp1 overexpression, the gene was cloned into pET52b giving Hcp1-Strep fusion. The *tagQ* gene was amplified so that it lacks the sequence encoding the first 29 amino acids and the predicted lipo-box (TagQ Δ 2-30). It was cloned into pET15b by fusing *tagQ* to a sequence encoding hexa-histidine tag on N-terminus. For TagR overproduction, the *tagR* gene was amplified and

cloned into pET52b resulting into TagR-His10 protein. All fusions to *mCherry* were constructed using pJN105-derived plasmids, which contain an arabinose inducible promoter. The gene encoding mCherry was amplified and cloned into *Xba*I and *Sac*I sites of pJN105 (Newman and Fuqua, 1999) giving pJN-*mCherry*. The DNA sequence containing the ribosome binding site of *tagQ* and the whole gene was cloned upstream of *mCherry*-encoding gene using *Eco*RI and *Xba*I sites, giving pJN-*tagQ-mCherry*. *tssJ1*-encoding sequence was amplified and cloned in the same manner to give pJN-*tssJ1-mCherry*. Site-directed mutagenesis (QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene) was employed to generate TagT^{K/A}S mutant and TagQΔCys, using pETDuet-*tagTS* and pJN-*tagQ-mCherry* as templates respectively. The TGA stop codon was introduced between TagQ and mCherry encoding sequence by site directed mutagenesis using pJN-*tagQ-mCherry* and pJN-*tagQΔCys-mCherry*. To constitutively express GFP, pX2-*gfp* (Thibault *et al.*, 2009) was transferred in mini-CTX1 (Hoang *et al.*, 2000) and inserted into the chromosome of *P. aeruginosa* strains as described. All replicative plasmids were introduced in *P. aeruginosa* strains by transformation. Constructs used to generate in-frame deletions of *tag* genes or a *tse1-VSV-G* chromosomal fusion were previously reported (Silverman *et al.*, 2011).

Pseudomonas aeruginosa strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C supplemented with carbenicillin 100–250 µg ml⁻¹, gentamycin 200 µg ml⁻¹ and tetracycline 200 µg ml⁻¹ when needed. *E. coli* strains were grown in LB medium at 37°C supplemented with ampicillin 100 µg ml⁻¹, gentamycin 50 µg ml⁻¹, kanamycin 25 µg ml⁻¹, tetracycline 10 µg ml⁻¹ as required.

Fha1 phosphorylation assays

Cellular samples of Fha1 from liquid and solid grown cultures were prepared and analysed as previously described (Mougous *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2009). Western blots were developed using chemiluminescent substrate (SuperSignal West Pico Substrate, Thermo Scientific) and imaged with a FluorChemQ (ProteinSimple). Densitometry was performed as previously described (Silverman *et al.*, 2011) using AlphaView@Q software (ProteinSimple). The percentage of phosphorylated Fha1 was determined by measure band intensity of phosphorylated and total Fha1 from three independent experiments. The values were normalized to Δ*ppkA*, which was set at 0% *p*-Fha1.

Interbacterial growth competition assays and quantification

Growth competition assays were performed as previously described (Silverman *et al.*, 2011). Each donor and recipient strain contained constitutively expressing yellow fluorescent protein (YFP) or cyan fluorescent protein (CFP) respectively. pUCP18-mini-Tn7 containing *yfp* or *cfp* (inserted at the neutral phage attachment site, *attB*) was used to construct these strains (Lambertsen *et al.*, 2004). The plasmids were introduced into *P. aeruginosa* via four-parental mating conjugation or electroporation (Choi and Schweizer, 2006). Vector backbones were not removed. To observe a H1-T6SS-

dependent fitness advantage, Tse2 and Tsi2 were overexpressed in the donor strain. Donor strains harboured pPSV18::PA2702-PA2703 for constitutive expression of Tse2 and Tsi2, and recipient strains harboured the empty vector, pPSV18 (Rietsch *et al.*, 2004). Overnight cultures were mixed at a 1:1 ratio to a total density of approximately 1.0 × 10⁸ cfu ml⁻¹ in 1 ml of LB medium. Competitions were grown on 0.2 µM polycarbonate membranes on LB agar for 18 h at 37°C, or in 2 ml of LB with shaking. Cells were re-suspended in LB medium and spotted onto 1.0% agarose PBS pads and imaged as described (Silverman *et al.*, 2011). YFP and CFP filters were used to image the two cell populations. Assays were performed in triplicate. Three fields containing 100 to 200 cells were imaged for each competition. To determine the competitive index (the number of YFP positive cells to CFP positive cells), NIS-Elements computer-assisted morphometry was used to count YFP and CFP cells.

TagTS expression and protein purification

Escherichia coli BL21(DE3)Star cells harbouring pETDuet-*tagTS* were grown in LB medium at 37°C and 200 r.p.m. At OD₆₀₀ of 0.7, the expression of *tagT* and *tagS* was induced with 0.5 mM IPTG for 4 h. Cells were recovered by centrifugation and lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0 and cocktail of protease inhibitors (PIC, Roche). The lysis was achieved by passage of cells through a Microfluidizer (M-100P, Microfluidics, USA) at constant pressure of 10 000 psi. After centrifugation at 200 000 *g* for 1 h, membranes were recovered in solubilization buffer containing 25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2% n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM), 15% glycerol, pH 8.0 and PIC. The solubilization was performed in a glass beaker at 4°C for 1 h 30 min by agitation. The obtained suspension was further centrifuged at 200 000 *g* for 1 h. Solubilized material was loaded at 0.5 ml min⁻¹ on HisTrapHP Ni²⁺-column previously equilibrated in solubilization buffer. The washes and elution was performed on AktaPurifier FPLC apparatus (GE Healthcare) with buffer A (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% DDM, 15% glycerol, pH 8.0) and buffer B (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% DDM, 15% glycerol, 200 mM imidazole, pH 8.0). The washes were performed with 30 and 80 mM imidazole obtained by mixing buffers A and B, and elution was performed using buffer B. Fractions eluted from the column were analysed on SDS-PAGE and the gel was stained by Coomassie Brilliant Blue R-250.

ATPase activity and orthovanadate assay

ATPase activity was quantified by measuring inorganic phosphate Pi by a malachite green method (Van Veldhoven and Mannaerts, 1987). The reaction mixture (100 µl) containing 0.5 mM ATP, 1 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 1 µg of purified TagTS complex was incubated for 30 min at 37°C. When indicated, the orthovanadate was added to protein samples at indicated concentrations before the reaction. The reaction was stopped by adding 800 µl of malachite green solution. Malachite green solution was prepared 30 min in advance by mixing 3 vols of 0.045% malachite

green with 1 vol. of 4.2% ammonium molybdate in 4 M HCl and 1/50 of volume of Triton X-100. Greenish colour resulting from precipitation of Pi was measured at 640 nm.

Secretion assays

Overnight cultures were diluted at OD₆₀₀ of 0.02 and incubated at 37°C with shaking up to mid-log phase, in the presence of antibiotics when needed. At this point, 250 µl of bacteria were harvested by centrifugation at 7000 g and re-suspended in 100 µl of loading buffer and stored at -20°C until use. Extracellular proteins were precipitated by a TCA-sarkosyl method (0.5% final volume of sarkosyl and 7.5% final volume of TCA) (Chevallet *et al.*, 2007) after a double centrifugation of 1250 µl of culture and 1 h incubation on ice. Pellets were re-suspended in a final volume of 25 µl of loading buffer. Samples were then analysed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Proteomic analyses by mass spectrometry (MS)

Protein bands were manually excised from the gels and washed. Proteins were *in-gel* digested with trypsin (Promega, sequencing grade) and peptides extracted from gel slices (Shevchenko *et al.*, 1996). The dried extracted peptides were re-suspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analysed by online nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fischer Scientific). The nanoLC method consisted in a 15 min gradient ranging from 5% to 40% acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of 300 nl min⁻¹. Peptides were sampled on a 300 µm × 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 µm × 150 mm RP column (PepMap C18, Dionex). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fischer Scientific) and processed automatically using Mascot Daemon software (version 2.3, Matrix Science). Searches against the PAO1 database, SwissProt-Trembl_decoy (*E. coli* taxonomy) and contaminants databases (534637 sequences) were performed using an in-house version of Mascot 2.3. ESI-TRAP was chosen as the instrument, trypsin/P as the enzyme and two missed cleavages was allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set respectively at 10 ppm and 0.6 Da. Peptide modifications allowed during the search were: Carbamidomethyl (C, fixed), Deamidated (NQ, variable), Oxidation (M, variable) and Acetyl (Protein N-term, variable). The IRMa soft (Dupieris *et al.*, 2009) was used to filter the results by query homology threshold $P < 0.01$ and a minimum of two peptides per protein.

Spheroplast preparation and confocal microscopy

Overnight cultures of *P. aeruginosa*-GFP strains producing TagQ-mCherry, TagQΔC-mCherry or TssJ1-mCherry fusion proteins were diluted at OD₆₀₀ of 0.15 in 3 ml of LB. Cultures were incubated until mid-log phase of growth in the presence of antibiotics and then induced for 1.5 h by 0.25% arabinose. At this point, cells were harvested and spheroplasts were created (Imperi *et al.*, 2009). Briefly, 1 ml of culture was centrifuged at 6000 g for 5 min. The pellet was re-suspended in

TSE buffer (0.1 M Tris-acetate, 16% saccharose, 5 mM EDTA, pH 8.2) and lysozyme was added at a final concentration of 50 µg µl⁻¹. Spheroplasts were incubated on ice and centrifuged at 1000 g for 5 min after the addition of MgSO₄ to a final concentration of 0.1 M. Finally, spheroplasts were re-suspended in TSM buffer (0.05 M Tris-acetate, 8% sucrose, 10 mM MgSO₄, pH 8.2). 1 ml culture of arabinose-induced bacteria was harvested by centrifugation at 7000 g for 5 min and re-suspended in 100 µl of LB.

Specimens were analysed by confocal laser scanning microscopy, using a Leica TCS-SP2 operating system (Manheim, Germany). GFP and mCherry fluorescences were excited and collected sequentially (400 Hz line by line) by using 488 nm for GFP and 543 nm for mCherry excitation. Fluorescence emissions were collected from 500 to 537 nm for GFP and from 557 to 625 nm for mCherry.

Fractionation of *P. aeruginosa*

Cultures of *P. aeruginosa* grown for 16 h were diluted to an OD₆₀₀ of 0.15 in 30 ml of LB cultures with antibiotics when needed. Cultures were incubated with agitation until OD₆₀₀ of 0.85 and at this point, 100 µl of cells were harvested by centrifugation as a total bacteria fraction. The rest of the cultures was centrifuged at 6000 g for 10 min. Pellets were washed with 10 ml of TMP buffer (10 mM Tris-HCl, 200 mM MgCl₂, PIC) and re-centrifuged at 6000 g for 10 min. Pellets were re-suspended in 1 ml of TMP and incubated for 30 min at 300 r.p.m. and 23°C in the presence of 0.5 mg ml⁻¹ lysozyme. Next, bacteria were centrifuged at 8000 g for 15 min at 4°C, obtaining the periplasm fraction (supernatant) and spheroplasts (pellet). At this point, the proteins present in the periplasm fraction were precipitated (as described in *Secretion assays*). Spheroplasts were then re-suspended in 1 ml of TMP, re-centrifuged and the pellet, recovered in 1 ml of TM buffer (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 8.0), was disrupted by sonication. Unbroken spheroplasts were eliminated by a low speed centrifugation and the supernatant was ultracentrifuged for 30 min at 100 000 g with a TLA120 rotor at 4°C to obtain the cytosolic fraction (supernatant) and the total membrane fraction (pellet). All fractions were re-suspended in loading buffer and heated at 100°C for 10 min before SDS-PAGE and immunoblotting analysis.

Inner and outer membrane separation

Inner and outer membranes of *P. aeruginosa* cells were separated by a discontinuous sucrose gradient as described (Viarre *et al.*, 2009). Briefly, 500 ml cultures of *P. aeruginosa* at OD₆₀₀ of 1 were harvested by centrifugation. In the case of PAO1ΔtagQ + tagQΔCys, bacteria were grown with appropriate additives and induced by 0.01% arabinose at OD₆₀₀ 0.5. Pellets were re-suspended in 25 ml of 10 mM Tris-HCl, 20% sucrose, 10 mg ml⁻¹ DNase, 10 mg ml⁻¹ RNase, pH 7.4, and were disrupted by using a Microfluidizer at 15 000 psi. Unbroken cells were removed by 15 min centrifugation at 6000 g. Total membrane fraction was obtained by ultracentrifugation at 100 000 g and re-suspended in 500 µl of 20% sucrose containing PIC. The total membrane fraction was then applied at the top of a discontinuous sucrose gradient

composed of 1.5 ml layers of 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% and 30% of sucrose in 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4 (from bottom to top). Sucrose gradients were centrifuged at 90 000 *g* at 4°C for 36–72 h, and 500 µl of fractions were collected from the top. All fractions were then characterized by SDS-PAGE, Western Blot analysis and NADH oxidase activity. Antibodies against T2SS protein XcpY (Michel *et al.*, 1998), kindly gifted by R. Voulhoux (CNRS, Marseille, France), were used as an inner membrane marker and porines visualized directly on Coomassie blue-stained SDS-PAGE as markers of the outer membrane. NADH oxidase activity was determined as described elsewhere by measuring the NADH consumption at 340 nm of 50 µl of each fraction (Aubert *et al.*, 2010).

Hcp1, *TagQ*, *TagR* and *Tse1* expression for antibody production

The pET52b-*hcp1*, pET15b-*tagQΔ2-30* and pET15b-*tagR* expression vectors were introduced into *E. coli* BL21(DE3)Star. Expression was induced at OD₆₀₀ of 0.7 by 0.5 mM IPTG and lasted for 4 h. Bacteria were lysed by the Microfluidizer at 10 000 psi and the proteins were purified on appropriate affinity columns using AktaPurifier (GE Healthcare). TagR-His₁₀ was obtained by solubilization of inclusion bodies using 6 M guanidine. Antibodies were raised in guinea pig for Hcp1 (Eurogentec, Belgium) and in mouse for TagQ and TagR (Agro-Bio, France).

The anti-Tse1 polyclonal rabbit antibody was raised against purified Tse1 (GenScript).

Immunoblotting

For Western blotting, antibodies were used at dilutions: anti-Hcp1 1:5000, anti-XcpY 1:1000, anti-TagQ 1:20000, anti-TagR 1:1000 and anti-Tse1 1:2000. Commercial antibodies anti-VSV-G (Sigma Aldrich) and anti-mCherry (Clontech) were used as recommended by the manufacturers. Secondary antibodies were anti-rabbit (Zymed), HRP-coupled anti-guinea pig (Invitrogen) and HRP-coupled anti-mouse (Sigma), all used at 1:5000 dilution. Western blots were developed by ECL Detection Kit (Amersham) or Millipore HRP Substrate.

In silico bacterial genome scanning for tagTSR

Annotated genomes were downloaded (September 2011) from the Genome Reviews ftp site (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/genome_reviews/) (Sterk *et al.*, 2006) and <http://www.pseudomonas.com/> for *Pseudomonas* genomes unavailable in Genome Reviews (Winsor *et al.*, 2011). Predicted protein sequences for all genomes were aligned with *rpsblast* (Altschul *et al.*, 1997) against the COG section of the CDD database (September 2011) (Marchler-Bauer *et al.*, 2009). COG hits were considered positive if their alignment covered at least 30% of the COG PSSM and had an *E*-value $\leq 10^{-6}$. TagR and *tagR*-like sequences were aligned using *muscle* (Edgar, 2004). Based on this alignment, a maximum likelihood tree with 100 bootstrap replicates was computed using PhyML (Guindon *et al.*, 2010).

Acknowledgements

This project was funded by French Cystic Fibrosis Association 'Vaincre la Mucoviscidose' (VLM). M. G. C. is a PhD student supported by VLM. K. M. S. is a PhD student supported by the University of Grenoble 1. J. M. S. was supported in part by Public Health Service, National Research Service Award, T32 GM07270, from the National Institute of General Medical Sciences. This work was funded by grants to J. D. M. from the NIH (AI080609). J. D. M. holds an Investigator in the Pathogenesis of Infectious Disease Award from the Burroughs Wellcome Fund.

The authors thank Eric Faudry for helpful suggestions during protein purifications and ATPase activity measurements, Gwennaele Fichant for help with *in silico* analysis of TagT and TagS proteins and Michel Ragno for protein purifications, antibody preparations and activity measurements. Special thanks go to Romé Voulhoux and Sophie de Bentzmann (CNRS, Marseille) and Jean-Michel Jault and Andréa Dessen (Institute of Structural Biology, Grenoble) for stimulating discussions all along of this work.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Aschtgen, M.S., Bernard, C.S., De Bentzmann, S., Lloubes, R., and Cascales, E. (2008) SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 7523–7531.
- Aubert, D., MacDonald, D.K., and Valvano, M.A. (2010) BcsKC is an essential protein for the type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia* that forms an outer membrane complex with BcsLB. *J Biol Chem* **285**: 35988–35998.
- Babu, M.M., Priya, M.L., Selvan, A.T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., and Sankaran, K. (2006) A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* **188**: 2761–2773.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**: 534–543.
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., and Mogk, A. (2009) Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J* **28**: 315–325.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**: 104.
- Cascales, E. (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* **9**: 735–741.
- Chevallet, M., Diemer, H., Van Dorssealer, A., Villiers, C., and Rabilloud, T. (2007) Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics* **7**: 1757–1770.

- Choi, K.H., and Schweizer, H.P. (2006) Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**: 153–161.
- Cornelis, G.R. (2010) The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular 'toxin' delivery. *Biol Chem* **391**: 745–751.
- Coumes-Florens, S., Brochier-Armanet, C., Guiseppi, A., Denizot, F., and Foglino, M. (2011) A new highly conserved antibiotic sensing/resistance pathway in *firmicutes* involves an ABC transporter interplaying with a signal transduction system. *PLoS ONE* **6**: e15951.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 317–364. Table of contents.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R., and Henderson, I.R. (2009) Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* **17**: 139–145.
- Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., and Gebhard, S. (2011) Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in *Firmicutes* Bacteria. *J Bacteriol* **193**: 3851–3862.
- Dupieris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., and Bruley, C. (2009) A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics* **25**: 1980–1981.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797.
- Farris, C., Sanowar, S., Bader, M.W., Pfuetzner, R., and Miller, S.I. (2010) Antimicrobial peptides activate the Rcs regulon through the outer membrane lipoprotein RcsF. *J Bacteriol* **192**: 4894–4903.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570–1583.
- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**: 703–714.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567–573.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., and Lory, S. (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**: 745–754.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307–321.
- Hayes, C.S., Aoki, S.K., and Low, D.A. (2011) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* **44**: 71–90.
- Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Debarbouille, M., and Msadek, T. (2011) Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol Microbiol* **81**: 602–622.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**: 59–72.
- Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R., et al. (2010) A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **7**: 25–37.
- Hsu, F., Schwarz, S., and Mougous, J.D. (2009) TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **72**: 1111–1125.
- Imperi, F., Ciccocanti, F., Perdomo, A.B., Tiburzi, F., Mancone, C., Alonzi, T., et al. (2009) Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics* **9**: 1901–1915.
- Korgaonkar, A.K., and Whiteley, M. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of an antimicrobial in response to N-acetylglucosamine and peptidoglycan. *J Bacteriol* **193**: 909–917.
- Lambertsen, L., Sternberg, C., and Molin, S. (2004) Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* **6**: 726–732.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4154–4159.
- Leverrier, P., Declercq, J.P., Denoncin, K., Vertommen, D., Hiniker, A., Cho, S.H., and Collet, J.F. (2011) Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem* **286**: 16734–16742.
- Lewenza, S., Mhlanga, M.M., and Pugsley, A.P. (2008) Novel inner membrane retention signals in *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J Bacteriol* **190**: 6119–6125.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **5**: 234–243.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A. (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* **210**: 551–559.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., et al. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**: D205–D210.
- Mattei, P.J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I., and Dessen, A. (2010) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**: 414–426.
- Michel, G., Bleves, S., Ball, G., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1998) Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 3379–3386.

- MoscOSO, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13**: 3128–3198.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., *et al.* (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526–1530.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., and Mekalanos, J.J. (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol* **9**: 797–803.
- Narita, S., and Tokuda, H. (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* **580**: 1164–1170.
- Newman, J.R., and Fuqua, C. (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* **227**: 197–203.
- Pennetier, C., Dominguez-Ramirez, L., and Plumbridge, J. (2008) Different regions of Mlc and NagC, homologous transcriptional repressors controlling expression of the glucose and N-acetylglucosamine phosphotransferase systems in *Escherichia coli*, are required for inducer signal recognition. *Mol Microbiol* **67**: 364–377.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E., and Wolf-Watz, H. (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**: 1231–1233.
- Pezza, R.J., Villarreal, M.A., Montich, G.G., and Argarana, C.E. (2002) Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif. *Nucleic Acids Res* **30**: 4700–4708.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., and Levesque, R.C. (2003) In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**: 1294–1308.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 15508–15513.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. (2009) The type VI secretion system: translocation of effectors and effector domains. *Curr Opin Microbiol* **12**: 11–17.
- Ravaud, S., Do Cao, M.A., Jidenko, M., Ebel, C., Le Maire, M., Jault, J.M., *et al.* (2006) The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state. *Biochem J* **395**: 345–353.
- Rietsch, A., Wolfgang, M.C., and Mekalanos, J.J. (2004) Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **72**: 1383–1390.
- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* **475**: 343–347.
- Schwarz, S., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2010) What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol* **18**: 531–537.
- Shalom, G., Shaw, J.G., and Thomas, M.S. (2007) In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* **153**: 2689–2699.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850–858.
- Silverman, J.M., Austin, L.S., Hsu, F., Hicks, K.G., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2011) Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and-independent type VI secretion activation. *Mol Microbiol* **82**: 1277–1290.
- Sterk, P., Kersey, P.J., and Apweiler, R. (2006) Genome Reviews: standardizing content and representation of information about complete genomes. *OMICS* **10**: 114–118.
- Tanaka, S.Y., Narita, S., and Tokuda, H. (2007) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. *J Biol Chem* **282**: 13379–13384.
- Tetsch, L., and Jung, K. (2009) The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol Microbiol* **73**: 982–991.
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., and Jung, K. (2008) The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol* **67**: 570–583.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009) Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem* **284**: 15762–15770.
- Torres, C., Galian, C., Freiberg, C., Fantino, J.R., and Jault, J.M. (2009) The Yhel/YheH heterodimer from *Bacillus subtilis* is a multidrug ABC transporter. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 615–622.
- Van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P. (1987) Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal Biochem* **161**: 45–48.
- Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G.P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2009) HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J Biol Chem* **284**: 33815–33823.
- Ward, A., Reyes, C.L., Yu, J., Roth, C.B., and Chang, G. (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19005–19010.
- Weber, B., Hasic, M., Chen, C., Wai, S.N., and Milton, D.L. (2009) Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ Microbiol* **11**: 3018–3028.
- Winsor, G.L., Lam, D.K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., *et al.* (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* **39**: D596–D600.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**: 1447–1459.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Organization of the *P. aeruginosa* (PA) HSI-I operon containing tag genes and comparison with *P. mendocina ymp* (Pmen), *P. fluorescens* (PFL) and *P. brassicacearum* (PSEBR). Orthologues are represented in the same colour. Gene and COG numbers are indicated.

Figure S2. TagQ localization to the OM is not influenced by TagTS. Complete analysis of discontinuous sucrose gradients of PAO1 Δ retS and PAO1 Δ retS Δ tagTS are shown. NADH oxidase activity and XcpY are used as IM markers, and porines are used as OM markers. TagQ was detected using specific antibodies. Note that the NADH oxidase activity is represented relative to the fraction of highest activity. IM and OM are indicated.

Figure S3. The TagTS complex does not influence TssJ1-mCherry localization to the outer membrane. Discontinuous sucrose gradient separation of TssJ1-mCherry in PAO1 Δ retS

and PAO1 Δ retS Δ tagTS strains. NADH oxidase activity and controls were as described in Fig. S2. Fusion protein TssJ1-mCherry was detected by anti-mCherry antibodies.

Figure S4. TagTS does not influence TagR localization to the OM. Discontinuous sucrose gradient separations shown in Fig. S2 were further analysed using anti-TagR antibodies, showing that TagR is localized to the OM both in PAO1 Δ retS and PAO1 Δ retS Δ tagTS.

Figure S5. TagR does not play a role in the OM localization of TagQ.

A. Confocal microscopy analysis of PAO1 Δ retS Δ tagR expressing GFP and harbouring TagQ-mCherry. White arrows show the OM of *P. aeruginosa* that remains partially attached to spheroplasts after lysozyme treatment (see text for details). Bact: bacteria, Sphero: spheroplasts. The bar represents 1 μ m.

B. Discontinuous sucrose gradient separation of the IM and OM of PAO1 Δ retS Δ tagR. All fractions were analysed as described in Fig. S2.

Table S1. List of oligonucleotides used for genetic constructions.

Résumé: *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille gram négatif, ubiquiste de l'environnement. Ce pathogène opportuniste humain provoque sous sa forme planctonique des infections aiguës dont le facteur de virulence clé est le SST3. *P. aeruginosa* peut aussi se développer sous forme de biofilm où elle exprime entre autre le SST6-1 et induire des infections chroniques. L'expression ciblée des différents facteurs de virulence est liée à l'intégration de nombreux stimuli environnementaux transduits au moyen de systèmes à deux composants ou encore de messagers secondaires, comme le di-GMPc et l'AMPc, et conduisant à une régulation très fine, conférant une grande capacité d'adaptation à la bactérie. La nature, de même que les mécanismes impliqués dans la transduction du signal, n'ont pas encore été tous identifiés à ce jour.

Le but de cette thèse était de décrypter ces mécanismes moléculaires de détection et de transduction du signal gouvernant la réponse adaptative de ce pathogène à son environnement au moyen de différentes approches : chimogénomique, mutagénèse aléatoire et d'étude d'isolat clinique. Lors de cette thèse, nous avons criblé deux chimiothèques commerciales à la recherche de molécules activatrices du SST3 et du SST6-1 et nous avons pu établir un test de criblage à haut débit robuste pour les criblages de plus larges banques de composés. En utilisant une souche avec deux rapporteurs, nous avons réalisé une banque de mutants par transposons et nous avons trouvé des mutants affectés dans leur expression du SST3, candidats intéressants pour identifier de nouveaux régulateurs du système. Enfin, grâce à l'analyse de l'isolat clinique CHA (issu d'un patient atteint de mucoviscidose), nous avons découvert qu'une délétion dans le gène codant pour le régulateur majeur GacS définissait le phénotype agressif de cette souche.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Régulation, Criblage à haut débit, mucoviscidose, SST3, SST6-1

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacillum present in several places. This opportunistic pathogen has the capacity to infect a wide range of hosts: plants, animals, humans. This bacterium, that shows an impressive adaptability relying on a multifactorial virulence, possesses two lifestyles. These lifestyles are associated with specific virulence patterns of expression. Under its planktonic form, *P. aeruginosa* can provoke acute infections thanks to the activation of T2 and T3SS or induces chronic infections in cystic fibrosis patients' lungs where it establishes a biofilm (communitary life). The expression of virulence factors is linked to the integration of several environmental cues that are transduced through two-component systems and secondary messengers like c-di-GMP and that lead to a fine tuned regulation. The nature and the mechanisms involved in this signal transduction remain largely unknown.

The goal of this thesis was to decipher molecular mechanisms of signal detection and transduction that govern the adaptive pathogen response to host environment using the combination of a chemogenomics, random mutagenesis and study of clinical isolate. During this work, we screened two commercial libraries and set up a robust high throughput screening test to analyse huge molecules libraries. By setting up a double reporter-gene strain, we realized a transposon mutagenesis bank and identified interesting candidates with a down-regulated T3SS. Finally, the study of the particular clinical isolate CHA (from a cystic fibrosis patient), leads to the discovery that a deletion in the gene encoding for the important regulator GacS shapes the aggressive phenotype of this strain.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Regulation, High throughput Screening, cystic fibrosis, T3SS, T6SS-1