



**HAL**  
open science

# La régulation de la virulence de l'agent de la coqueluche *Bordetella pertussis* : signalisation par le senseur-kinase **BvgS**

Elodie Lesne

► **To cite this version:**

Elodie Lesne. La régulation de la virulence de l'agent de la coqueluche *Bordetella pertussis* : signalisation par le senseur-kinase BvgS. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S019 . tel-01908895

**HAL Id: tel-01908895**

**<https://theses.hal.science/tel-01908895>**

Submitted on 30 Oct 2018

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

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

Thèse de Doctorat  
De l'Université Lille 2 – Droit et Santé  
Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES**

Présentée et soutenue publiquement par

**Elodie LESNE**

le 29 septembre 2016

---

**La régulation de la virulence de l'agent de  
la coqueluche *Bordetella pertussis* :  
Signalisation par le senseur-kinase BvgS**

---

**Composition du Jury**

<b>Pr Jean-Marie LACROIX</b>	Président
<b>Pr Sylvie CHEVALIER</b>	Rapportrice
<b>Dr Olivera FRAN CETIC</b>	Rapportrice
<b>Pr Pierre CORNELIS</b>	Examineur
<b>Pr René WINTJENS</b>	Examineur
<b>Dr Françoise JACOB-DUBUISSON</b>	Directrice de thèse









## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie la Région Nord Pas de Calais et l'INSERM pour le financement de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier Camille Locht de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de m'épanouir au sein de l'équipe BRIPT.

Je souhaite remercier chaleureusement Françoise Jacob-Dubuisson, ma directrice de thèse pour son professionnalisme, sa disponibilité et son écoute. Un grand merci d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue, encouragée et de m'avoir laissée m'épanouir durant ces trois années de thèse. Je te remercie infiniment pour ce que tu as fait pour moi, tu as contribué à mon évolution, tu m'as accordé ta confiance et laissé en toute liberté gérer mon sujet de recherche.

Elian Dupré, depuis mon premier stage au laboratoire, ça fait déjà plusieurs années que j'ai pu apprécier travailler à tes côtés. Tout d'abord tu as été mon encadrant de stage pour après devenir un collaborateur dans notre petite équipe BvgS. Je te remercie pour toutes les discussions que nous avons eues, pour ton écoute et ton soutien. Tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter et m'encourager. Un grand merci pour le partage de tes connaissances mais également de tes antibiotiques et tampons... Je te souhaite tout le meilleur pour l'avenir, et j'espère te recroiser sous les vidéoprojecteurs dans un amphithéâtre...

Je remercie Rudy Antoine pour sa participation à nos petites réunions BvgS et pour les différentes recherches bio-informatiques qu'il a menées.

Je remercie également nos différents collaborateurs pour ce projet : Mark Lensink, Eva-Maria Krammer, Jérôme De Ruyck, Guillaume Brysbaert, Hervé Vezin et Julien Herrou.

Je souhaite remercier Jean-Michel Betton et Olivera Francetic qui ont été membres lors des comités de suivis de thèse, pour les discussions partagées ainsi que pour leurs nombreux conseils pour la poursuite de mon travail.

Ces années de laboratoire m'auront permis de rencontrer des gens aux grands cœurs. Le labo, c'est un peu comme une deuxième famille. J'ai apprécié discuter avec chacun d'entre vous et partager avec vous mes petites découvertes scientifiques. Je retiendrais cette bonne ambiance significative à l'équipe BRIPT, votre convivialité et sympathie. Je n'ai malheureusement pas assez de place pour remercier les membres de l'équipe un par un, mais sachez que chacun à votre manière vous avez participé à mon épanouissement et à ma progression. Pour cela, je vous adresse un grand merci !

Hana Kammoun, je te remercie de m'avoir épaulée et d'avoir toujours été là. Un grand merci pour toutes nos virées sur Lille, et pour ton Amitié. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et j'espère te revoir très vite !

Anaïs Thiriard, ma 'mini-moi', je te remercie pour toutes les discussions qu'on a pu avoir, pour ton écoute et ton soutien. Je te souhaite le meilleur pour ta vie professionnelle ainsi que personnelle. Puisse la thèse t'apporter ton lot de joie et de surprise en évitant au maximum les petits désagréments des manip foireuses...

A Sophie Lecher, c'était un plaisir d'être ta 'padawan'. Je te remercie pour ton soutien, ta gentillesse et ton écoute.

Dominique Raze, je te remercie pour ta disponibilité et tous tes conseils, ainsi que pour nos nombreuses discussions et pour tous ces bons moments passés ensemble. Je n'oublierais pas ton caractère taquin et ta bonne humeur !

A mon voisin de paillasse, Martin Moune, tu as su mettre de la gaité dans notre U. Un grand merci pour tous ces bons moments partagés, tes conseils avisés et pour toutes nos discussions.

Merci au duo de choc, Anne Sophie Debrie et Luis Solans, pour vos conseils, votre humour et pour les bons moments partagés.

Jérémy Guérin, je te remercie de m'avoir initiée à la RPE ainsi que pour les nombreux conseils que tu as pu me donner.

Je remercie Emmanuelle Petit, pour son aide dans la construction de certains mutants et pour son investissement au sein du laboratoire.

Je remercie Marc Loyens, de m'avoir transmis ses connaissances en culture cellulaire.

Je souhaite également remercier les différents stagiaires que j'ai pu aider ou encadrer durant ma thèse.

J'adresse mes remerciements à mes voisines de labo, Jeanne Alard et Amélie Dewitte, pour toutes nos petites discussions et ces moments de convivialité ...

Je remercie mes amis pour les moments de détente, de rire et de joie. Je remercie plus particulièrement Nathalie, ma sœur de cœur, qui a été là depuis le tout début. Pour tous ces moments partagés, pour ton soutien, pour tes surprises et pour cette Amitié qui nous lie...

Je remercie mes parents, Marie Christine et Bernard, pour les valeurs qu'ils nous ont transmises, pour leur soutien et leur présence. Il n'y aura jamais assez de mot pour vous témoigner ma reconnaissance, vous avez veillé à mon épanouissement et m'avez offert de réaliser mon rêve d'enfant... Je remercie également ma sœur, Aurélie et chaque membre de ma famille, pour ces moments de convivialité, de partage et d'amour...

A mon futur époux, Christophe, pour ton amour, ta folie, ton soutien. Tu as toujours trouvé les mots pour me reconforter, me coacher. Je te remercie de n'avoir jamais cessé de croire en moi et en mon potentiel, et pour ton enthousiasme suite à toutes mes découvertes et à mes petites victoires. Tu as été ma bouffée d'oxygène et mon pilier. Merci pour tout, merci de partager ma vie et de t'engager dans cette nouvelle aventure avec moi ...

*A Christophe,*

*A ma famille et à mes amis...*



## Liste des abréviations

- ABC : ATP-binding cassette, transporteur de solutés
- ACT : Adénylate cyclase / hémolysine, toxine de *B. pertussis*
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : Adénosine diphosphate
- AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, récepteurs ionotropes
- ARN : Acide ribonucléique
- ATD : Amino-terminal domain, domaine N-terminal des iGluR
- ATP : Adésine triphosphate
- BG : Milieu de culture Bordet-Gengou
- bvg* : Bordetella virulence genes
- Bvg<sup>+</sup> : Phase de virulence de *B. pertussis*
- Bvg<sup>i</sup> : Phase intermédiaire de virulence de *B. pertussis*
- Bvg<sup>-</sup> : Phase d'avirulence de *B. pertussis*
- BvgA : Bvg Activator, régulateur de réponse
- bvgR* : Bordetella virulence genre repression
- BvgS : Bvg Sensor, senseur-kinase
- CA : Catalytic ATP-binding
- CACHE : Ca<sup>2+</sup> channels, Chemotaxis receptors
- CaR : récepteur au Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, récepteur eucaryote
- CHASE : Cyclase Histidine-kinase Associated Sensing Extracellular
- CN : chloronicotinate, modulateur de la virulence
- CyaA : adénylate cyclase / hémolysine, toxine de *B. pertussis*
- DHp : Dimérisation et Histidine phosphotransfert
- DNT : Dermonecrotic toxin, toxine dermonécrotique
- DO<sub>600nm</sub> : Densité optique à 600 nm
- DTT : Dithiothreitol
- EAL : c-di-GMP phosphodiesterase
- FAD : Flavine adénine dinucléotide

FHA : Hémagglutine filamenteuse, adhésine de *B. pertussis*

Fim : Fimbriae, adhésine

FMN : Flavine mononucléotide

GABA : Gamma AminoButyric Acid

GAF : Phosphodiesterases spécifiques du GMPc, Adénylate cyclase et FhlA

GGDEF : Domaine guanylate cyclase

GHKL : GyraseB, Hsp90, Histidine-Kinase et MutL

GMP : Guanosine monophosphate

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

HAMP : Domaines présents dans des Histidine-kinases, des Adényles cyclases, des protéines accepteuses de Méthyl et des Phosphatases

HK : Histidine-kinase

HPt : Domaine de phosphotransfert

HTH : Helix-turn-helix

iGluR : Récepteur ionotropique au glutamate

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

Kd : Constante de dissociation

KR : Récepteur au kaïnate

LBD : Ligand binding domain, domaine de liaison des récepteurs ionotropes

LLAAA : motif LxxxLxxAxxxAxxA, où les résidus Leucines et Alanines correspondent à des positions centrales ('a' et 'd') du coiled coil

LOS : Lipooligosaccharide

LOV : Light Oxygen Voltage

LPS : Lipopolysaccharide

MCP : Methyl-accepting chemotaxis proteins

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NEM : N-Ethylmaléimide

NMDA : N-méthyl-D-asparate

NTD : N-terminal domain

mGluR : metabotropic glutamate receptor

mRFP : red fluorescent protein

MTSL : (1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- $\Delta$ 3-pyrroline-méthyl) Méthanethiosulfonate, sonde de spin

NaPi : tampon phosphate

PAS : Per/Arnt/Sim

PBP : Periplasmic binding protein

PCR : Polymerase chain reaction

PDC : PhoQ, DcuS et CitA

PIR : Région d'interaction protéique, chimiorécepteur

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PRN : Pertactine, adhésine

PTX : Toxine pertussique

PYP : Photoactive Yellow Protein

RGD : Motif de séquence Arginine-Glycine-Aspartate

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SB : Sunken-buoy (bouée immergée)

SS : milieu de culture Stainer-Scholte

TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

Tcf : Facteur de colonisation trachéale, adhésine

TCT : Toxine cytotrachéale

TM ou TMH : Segment transmembranaire

TRAP : Tripartite ATP-independent periplasmic transporter

TSA : Thermal shift assay

TTT : Tripartite tricarboxylate transporter

*vag* : virulence-activated genes

VFT : Venus FlyTrap

*vrg* : virulence-repressed genes

WT : Wild-type, sauvage





## Table des matières

Introduction .....	1
I. <i>Bordetella pertussis</i> , l'agent de la coqueluche .....	1
A. Origine et découverte .....	1
B. La maladie de la coqueluche .....	2
1. Pathogénie .....	2
2. Traitement et prévention.....	3
C. Facteurs de virulence.....	5
1. Les Adhésines.....	5
2. Les toxines.....	6
3. Autres facteurs impliqués dans la virulence .....	8
II. Régulation de la virulence de <i>Bordetella pertussis</i> .....	9
A. La régulation génétique et les systèmes à deux composants .....	9
1. Facteurs sigma et systèmes à un composant.....	9
2. Les systèmes à deux composants .....	9
3. La kinase : siège de l'activité des systèmes à deux composants. ....	15
B. BvgAS : le système à deux composants de <i>B. pertussis</i> .....	22
1. Variation phénotypique/modulation de la virulence .....	22
2. Découverte et caractérisation du système BvgAS.....	25
3. Le senseur-kinase BvgS .....	30
III. Les domaines 'Venus FlyTrap' .....	34
A. Classification.....	34
1. Classification fonctionnelle.....	34
2. Classification structurale .....	35
B. Rôles des domaines VFT.....	36
1. Fixation de ligand.....	36
2. Les VFT et leur rôle dans le transport de molécules .....	37
3. VFT impliqués dans la régulation transcriptionnelle .....	39
4. Les domaines VFT impliqués dans la signalisation .....	39
5. Récepteurs eucaryotes .....	42
6. VFT bactériens comme cible pour l'antibiothérapie .....	45
C. Les VFT de BvgS (pFAM SBP_bac_3).....	46
IV. Les domaines PAS : Per-Arnt-Sim.....	49
A. Structure .....	49
B. Classification.....	50
1. Localisation extracytoplasmique ou cytoplasmique.....	50

2.	Diversité dans la perception de ligands .....	51
C.	Importance des régions flanquant le domaine PAS .....	51
D.	Les domaines PAS, une variété de fonctions .....	52
1.	Rôle senseur du domaine PAS : Perception de stimuli via la fixation de ligand .....	52
2.	Autres rôles pour le domaine PAS .....	55
E.	Transduction de signal par changement de structure quaternaire .....	55
1.	Mouvement de dissociation .....	56
2.	Mouvement de rotation .....	56
3.	Dimérisation .....	57
F.	Le domaine PAS de BvgS .....	58
V.	Transduction de signal .....	61
A.	Les enroulements d'hélices : 'coiled coils' .....	61
1.	Description générale et composition .....	61
2.	Conformation et stabilité des coiled coils .....	62
3.	Altération de la périodicité .....	63
4.	Coiled coil : l'exemple du leucine zipper .....	65
5.	Segment transmembranaire : particularités .....	65
B.	Coiled coil et signalisation .....	67
1.	Différents mouvements impliqués dans la transduction de signal via les coiled coils .....	67
C.	Les domaines HAMP : implication dans la transduction de signal .....	71
1.	Le modèle 'gearbox' .....	72
2.	Le modèle de paquet dynamique .....	72
3.	Le mécanisme de cisaillement diagonal .....	72
4.	Exemple de transduction de signal dépendant d'un HAMP : PhoQ .....	72
D.	Transduction de signal d'un domaine PAS jusqu'à la kinase : l'exemple de la protéine chimérique YF1 .....	73
E.	Transduction de signal des domaines senseurs membranaires jusqu'à la kinase : l'exemple de DesK .....	75
1.	La région membranaire de DesK .....	75
2.	La région sous-membranaire de DesK .....	76
F.	Transduction de signal au sein des chimiorécepteurs .....	78
1.	Le chimiorécepteur Tar .....	79
2.	Le chimiorécepteur Aer .....	81
VI.	Objectifs de la thèse .....	83

Résultats .....	85
VII. Les domaines périplasmiques de BvgS : siège de l'activité et de la perception des stimuli chimiques impliqués dans la régulation de la virulence.....	85
A. Effet du nicotinate sur la portion périplasmique de BvgS.....	85
1. Signal Transduction by BvgS Sensor Kinase: Binding of modulator nicotinate affects the conformation and dynamics of the entire periplasmic moiety.....	85
2. Résumé .....	107
3. Résultats complémentaires .....	111
B. Effet du sulfate de magnésium sur la portion périplasmique de BvgS.....	113
C. Bilan sur l'analyse des domaines périplasmiques de BvgS.....	114
VIII. Etude de la transduction de signal au sein de BvgS .....	115
A. Régulation de la kinase de BvgS : importance du coiled coil situé entre les domaines PAS et kinase.....	115
1. Balance between coiled coil stability and dynamics regulates activity of BvgS sensor-kinase in Bordetella .....	115
2. Résumé .....	134
B. Transmission d'information des domaines VFT jusqu'au domaine PAS .....	137
1. Organisation du connecteur mécanique.....	137
2. Caractérisation de la portion membranaire de BvgS .....	140
3. Caractérisation de la portion sous-membranaire du connecteur mécanique .....	148
4. Caractérisation du coiled coil cytoplasmique précédant le domaine PAS .....	151
5. Etude de la topologie du domaine PAS.....	157
C. Bilan sur la transduction de signal au sein de BvgS via les linkers mécaniques.....	162
IX. Etude du rôle potentiel du domaine PAS dans la fixation de ligand .....	165
A. Matériel et méthodes .....	166
B. Résultats .....	166
C. Bilan : Rôle du domaine PAS de BvgS .....	169
X. Le mutant $\Delta$ PAS 65 : un bon modèle d'étude.....	170
A. Construction du mutant .....	170
1. Matériel et méthodes .....	170
2. Résultats .....	170
B. Importance d'une périodicité de 7 acides aminés.....	171
1. Matériel et méthodes .....	171
2. Résultats .....	171
C. Détermination des conditions d'activation du $\Delta$ PAS 65 autre que la perception de modulateurs chimiques .....	172
1. La fermeture du VFT1 a-t-elle un effet sur l'activité du mutant $\Delta$ PAS 65 ? .....	172

2.	Effet de la température sur l'activité de BvgS.....	173
3.	Effet de la phase de croissance sur l'activité de BvgS .....	174
D.	Etude du fonctionnement du mutant à régulation inversée .....	179
1.	Perturbation de la périodicité de 7 résidus.....	179
2.	Caractérisation approfondie du mutant $\Delta$ PAS 65.....	180
E.	Recherche de ligands pour le VFT1 .....	189
1.	Matériel et Méthodes.....	189
2.	Résultats .....	191
F.	Recherche du microenvironnement humain induisant la modulation de la virulence .....	194
1.	Infection de THP-1, monocytes humains différenciés chimiquement en macrophage .....	195
2.	Infection de cellules dendritiques DC2-4 .....	197
G.	Bilan .....	198
	Discussion .....	200
XI.	Discussion .....	200
A.	La portion périplasmique de BvgS .....	200
B.	La transduction de signal au sein de BvgS.....	202
C.	Etude du domaine PAS de BvgS .....	205
D.	Mutants à régulation inversée.....	206
E.	La modulation de la virulence de <i>B. pertussis</i> .....	207
1.	Modulation chimique de la virulence : Perception du $MgSO_4$ .....	207
2.	Modulation physique de la virulence : Perception de la température.....	207
3.	Variation de phase .....	208
4.	Une régulation complexe de la virulence .....	209
F.	BvgS comme cible thérapeutique ? .....	209
G.	Etude de BvgS : les difficultés rencontrées .....	209
	Perspectives .....	210
XII.	Perspectives .....	210
	Bibliographie .....	212

# Introduction



## I. *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche

### A. Origine et découverte

Au XVI<sup>e</sup> siècle et plus particulièrement en 1578, une épidémie décrite comme étant un violent rhume sévit en France. Guillaume de Baillou, un médecin français, donne le nom de *Tussis quintina* à cette maladie. Dans d'autres pays, différents noms seront utilisés comme *tosse canina* en Italie, 'la toux des cents jours' en Chine ou encore *Wolfshusten* (la toux du loup) en Allemagne. Le terme français coqueluche doit son nom au son produit lors de la toux comparable au chant du coq, ou encore au coqueluchon, sorte de capuchon porté par les personnes atteintes afin d'éviter la propagation.

En 1900, l'agent de la coqueluche fut identifié par observation microscopique d'expectorations d'un nourrisson par J. Bordet et O. Gengou. *Bordetella pertussis* fut décrite comme étant une petite bactérie à Gram négatif de forme ovoïde. Il aura fallu six années à Bordet et Gengou pour permettre l'isolement pour la première fois de *B. pertussis*. Pour ce faire, un milieu de culture complexe à base de pomme de terre supplémenté de sang a été utilisé (milieu de Bordet-Gengou) (Rowatt, 1957; Guiso, 2009). Tout d'abord dénommée *Haemophilus pertussis* ou *Bacillus pertussis*, c'est en 1950 avec la description du genre *Bordetella* par Moreno Lopez, que cette bactérie sera renommée *Bordetella pertussis* en hommage à Jules Bordet (Lopez, 1954).

Le genre *Bordetella* appartient à la classe des  $\beta$ -protéobactéries dans l'ordre des *Burkholderiales* et dans la famille des *Alcaligenaceae*. Dans cette dernière, sont également retrouvés les genres *Achromobacter* et *Alcaligenes* comprenant beaucoup d'organismes environnementaux mais également plusieurs pathogènes facultatifs (Bock and Gross, 2001). Le genre *Bordetella* comporte aujourd'hui neuf espèces. Trois d'entre elles, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica* et *Bordetella parapertussis*, dériveraient d'un ancêtre commun et sont considérées comme étant des sous-espèces (Park et al., 2012). *B. bronchiseptica* a été isolée au début du 20<sup>ème</sup> siècle et *B. parapertussis* a été identifiée dans les années 1930 (Eldering and Kendrick, 1937; Mattoo and Cherry, 2005). Ces trois souches sont très proches génétiquement et infectent le haut du tractus respiratoire, mais présentent quelques différences au niveau de la pathogenèse bactérienne (spécificité d'hôte, gravité des maladies, durée des infections). *B. bronchiseptica* est responsable d'infections chroniques et souvent asymptomatiques du tractus respiratoire d'une grande variété de mammifères. *B. parapertussis* est retrouvée en deux lignées, l'une infectant les humains et l'autre les moutons (Porter et al., 1994). Cette bactérie va induire chez l'humain une forme plus légère de la coqueluche, d'une durée plus courte. *B. pertussis* et *B. parapertussis* ont évolué indépendamment à partir de leur ancêtre commun ressemblant à *B. bronchiseptica*, et sont les agents responsables de la coqueluche chez l'homme. L'adaptation de ces deux bactéries à leur hôte humain a été possible par une réduction massive de l'information génétique (un grand nombre d'inactivations de gènes, de délétions et de réarrangements génomiques), un phénomène aussi observé avec d'autres parasites obligatoires ou mutualistes (Bock and Gross, 2001; Diavatopoulos et al., 2005; Park et al., 2012).



Cinq autres espèces ont été décrites plus récemment. *B. avium* et *B. hinzii* provoquent des infections chez la volaille. *B. holmesii*, *B. trematum* et *B. anserpii* ont été retrouvées dans des infections humaines. *B. petrii* est, quant à elle, la seule bactérie environnementale dans le genre *Bordetella* (Bock and Gross, 2001; Gross et al., 2010).

*B. pertussis* est un petit bacille à Gram négatif et aérobic stricte. Il s'agit d'un pathogène respiratoire humain et à ce jour aucun réservoir animal ou environnemental n'est connu. Cette bactérie présente un pouvoir infectieux important et la transmission a lieu grâce aux aérosols produits lors de la toux (Fig. 1) (Bock and Gross, 2001).

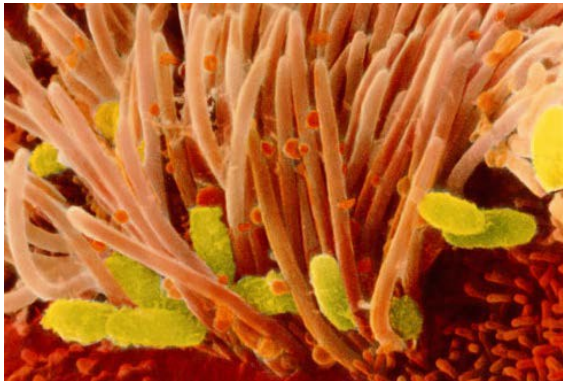


Figure 1 : Infection de cellules ciliées de l'épithélium respiratoire par *B. pertussis* en microscopie électronique (image recomposée). Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings.

## B. La maladie de la coqueluche

*B. pertussis* est l'agent étiologique d'une maladie hautement contagieuse, la coqueluche. Cette bactérie possède tous les éléments nécessaires pour s'attacher aux cellules de l'hôte, échapper aux défenses immunitaires et induire des dommages au niveau du tractus respiratoire. Etant une bactérie assez fragile, elle ne peut survivre dans l'environnement. Ainsi, *B. pertussis* a maintenu la capacité de se transmettre de manière efficace vers un nouvel hôte (Guiso, 2009).

### 1. Pathogénie

La transmission de la coqueluche s'effectue via des gouttelettes respiratoires infectées et possiblement par une contamination environnementale avec des sécrétions respiratoires (Cotter and Dirita, 2000). La période d'incubation de la coqueluche varie de 7 à 21 jours. Après l'entrée de la bactérie dans l'hôte, *B. pertussis* produit les adhésines nécessaires à son attachement à la muqueuse respiratoire ciliée. La bactérie va récupérer les nutriments nécessaires pour proliférer, échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et se répandre dans le tractus respiratoire plus profond. Durant ce temps, les toxines sont produites et sécrétées causant des dommages au niveau de l'épithélium respiratoire (Finlay and Falkow, 1997; Hewlett, 1997).

La première phase de la maladie est la phase catarrhale. Cette dernière est caractérisée par un rhume dont les symptômes augmentent en gravité au cours du temps étant donné que les bactéries se multiplient et produisent les toxines dont les effets seront locaux et systémiques. Cette phase va durer de une à deux semaines. La seconde phase est la phase paroxystique qui est caractérisée par des spasmes de toux intenses. Ces derniers sont souvent suivis par un effort respiratoire important qui produit le 'chant du coq'. Des vomissements, la cyanose et l'apnée sont d'autres symptômes associés à ces fortes quintes de toux. Les manifestations systémiques qui peuvent apparaître au cours de la maladie incluent une lymphocytose, qui

semble être provoquée par la toxine pertussique. La dernière phase est celle de convalescence qui peut durer jusqu'à 6 mois et durant laquelle une diminution progressive des symptômes est observable (Cotter and Dirita, 2000).

Dans un nombre limité de cas, *B. pertussis* peut progresser dans le tractus respiratoire jusqu'à la muqueuse des alvéoles. Ceci résulte en une pneumonie, qui est responsable de 96% à 100% des décès dus à la coqueluche (Hewlett, 1997).

## 2. Traitement et prévention

Un traitement antibiotique permet de réduire la durée de la maladie et de prévenir la contagion. Ce dernier doit être administré au plus tôt après l'infection étant donné qu'il devient inefficace s'il est administré au-delà d'une semaine après l'apparition de la maladie. L'érythromycine reste le traitement traditionnel contre la coqueluche, mais il a été montré que l'azithromycine et la clarithromycine présentent une efficacité similaire en induisant moins d'effets secondaires (von König, 2005).

La meilleure prévention de la coqueluche reste la vaccination. Ainsi, depuis les années 50, des vaccins visant à diminuer le nombre de cas de coqueluche et la mortalité ont été développés. Deux types de vaccins ont alors été commercialisés, il s'agit des vaccins cellulaires et acellulaires.

Les vaccins cellulaires ou autrement dénommés à germes entiers ont été développés rapidement après l'isolement de *B. pertussis*. Ces vaccins sont élaborés à partir de cultures bactériennes *in vitro* standardisées, puis inactivées par traitements thermique ou chimique. Un adjuvant composé de sels d'aluminium est ajouté à la préparation avant administration. Ces vaccins ont prouvé leur efficacité en réduisant le nombre de cas de coqueluche mais génèrent des effets secondaires importants, ce qui a poussé au développement d'autres formulations vaccinales. Toutefois, les vaccins cellulaires restent encore utilisés dans les pays en développement vu leur faible coût (Locht and Mielcarek, 2014).

Les vaccins acellulaires administrés dans de nombreux pays industrialisés sont constitués de plusieurs protéines antigéniques purifiées impliquées dans la virulence de la bactérie. Les principales protéines utilisées sont la toxine pertussique et l'hémagglutinine filamenteuse. Pour certaines formulations vaccinales d'autres antigènes ont été associés (pertactine, fimbriae de type 2 et 3) (Locht and Mielcarek, 2012, 2014).

Notons que la vaccination ne permet pas d'induire une immunité d'aussi longue durée (4 à 12 ans) que ne le fait l'infection naturelle par *B. pertussis* (7 à 20 ans). Ainsi, un grand nombre d'adolescents mais également d'adultes peuvent être infectés par *B. pertussis* et donc contribuer à la transmission de la maladie (Wendelboe et al., 2005). De plus, il a été montré grâce aux expérimentations animales sur le babouin, utilisé comme modèle pour étudier la transmission de la maladie, que la vaccination acellulaire induit une protection contre le développement des symptômes mais n'a pas d'action contre la colonisation ou la transmission, ce qui suggère que des personnes atteintes ne présentant pas de symptômes sont capables de transmettre la maladie (Melvin et al., 2014). Les personnes les plus vulnérables sont les nourrissons. En effet, jusqu'à l'âge de 6 mois, leur immunisation n'est pas complète

étant donné que les vaccins actuels nécessitent au minimum trois administrations espacées de deux mois. Ainsi, en dépit d'une couverture vaccinale élevée (85% des enfants du monde), la coqueluche ne cesse de provoquer environ 50 millions de nouveaux cas et 300 000 décès par an (Libster and Edwards, 2012; Locht and Mielcarek, 2014). Des épidémies de coqueluche ont été recensées ces dernières années dans certains pays comme les Etats-Unis (Fig. 2 et 3), le Royaume Uni, l'Australie et bien d'autres. Notons qu'en France, une résurgence de la coqueluche a également été observée 25 ans après l'introduction des campagnes de vaccination (Guiso et al., 2011).

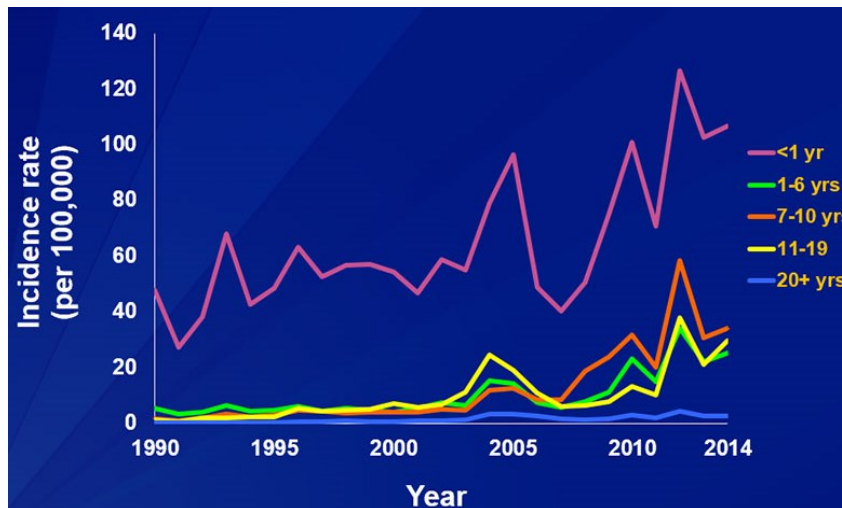


Figure 2 : Incidence de la coqueluche en fonction de l'âge, aux Etats Unis de 1990 à 2014. Source : the Center for Disease Control and Prevention.

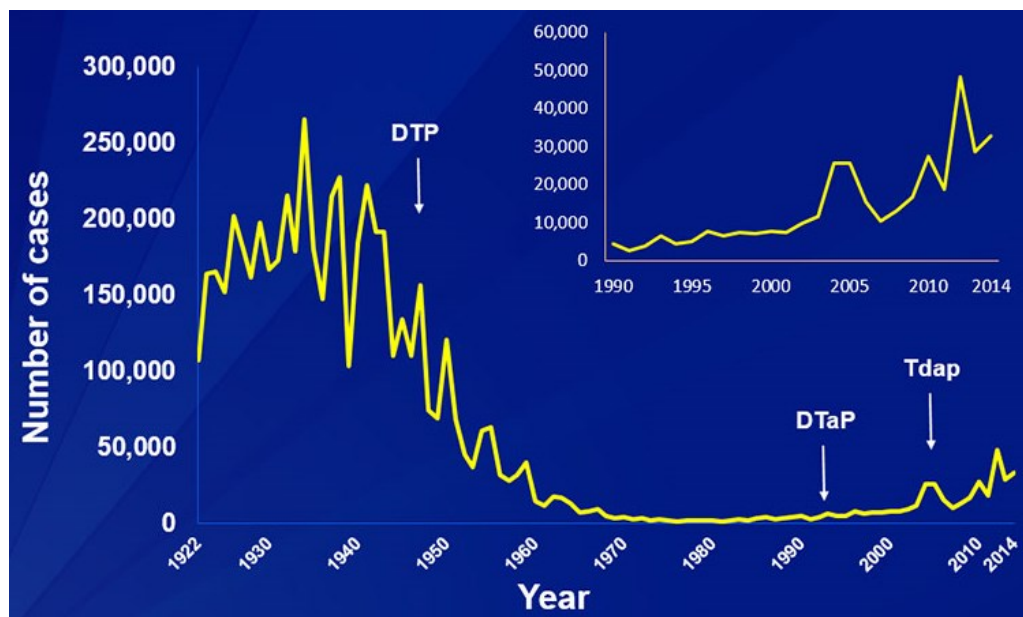


Figure 3 : Nombre de cas de coqueluche répertoriés aux Etats Unis de 1922 à 2014. Suite à l'introduction de la vaccination en 1940, une diminution importante du nombre de cas a été observée. DTaP et Tdap correspondent aux vaccins acellulaires contre la Diphtérie, le tétanos et la coqueluche. Source : the Center for Disease Control and Prevention.

Plusieurs raisons peuvent expliquer la résurgence de la maladie, comme la variabilité antigénique de *B. pertussis*, la diminution de l'immunité induite par les vaccins au cours du temps, le manque d'efficacité de ces derniers ou encore l'amélioration des méthodes de diagnostic (Guiso et al., 2011). Ainsi, comprendre les mécanismes de la pathogénicité,

développer de nouveaux traitements et élaborer de nouveaux vaccins représentent des enjeux majeurs dans la lutte contre cette maladie. Des études pour améliorer les vaccins actuels ont donc été entreprises. Au sein du laboratoire, un vaccin vivant atténué a été mis au point. Ce dernier consisterait en l'administration par voie nasale, à la naissance, d'une souche atténuée génétiquement et appelée BPZE1 (Mielcarek et al., 2006; Thorstensson et al., 2014).

## C. Facteurs de virulence

Afin de coloniser le tractus respiratoire humain, *Bordetella pertussis* produit un certain nombre de facteurs de virulence (Fig. 4). Dans cette partie, nous passerons en revue les différents éléments nécessaires pour l'élaboration de l'infection.

### 1. Les Adhésines

Lorsque *B. pertussis* pénètre dans le tractus respiratoire, cette dernière va interagir avec les cellules ciliées à l'aide de différentes adhésines.

L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) est l'adhésine majeure de *B. pertussis* et est nécessaire pour la colonisation du tractus respiratoire (Cotter and Dirita, 2000). Il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire (220 KDa pour la forme mature), repliée en forme d'hélice bêta allongée. La FHA présente différents domaines de reconnaissance pour permettre la fixation de la bactérie à une variété de cellules, incluant les cellules épithéliales et les macrophages, et de structures extracellulaires de l'épithélium respiratoire. En effet, grâce à un motif RGD (séquence Arginine-Glycine-Aspartate), la FHA interagit avec les intégrines des macrophages, des monocytes et d'autres leucocytes (Relman et al., 1990). La FHA peut également se fixer aux glycosaminoglycanes et aux carbohydrates, éléments retrouvés de manière courante à la surface des cellules humaines et des tissus (Relman et al., 1990; Prasad et al., 1993; Hannah et al., 1994; Cotter and Dirita, 2000). La FHA peut être sécrétée dans le surnageant ou rester associée à la surface bactérienne. Cette adhésine est incluse dans la formulation de vaccins acellulaires (Bock and Gross, 2001).

Les fimbriae (Fim) autrement appelés pili ou agglutinogènes, forment de longues structures filamenteuses à la surface de la bactérie (Blom et al., 1983). *B. pertussis* peut produire deux types de fimbriae (sérotypes 2 et 3) composés des sous-unités majeures Fim2 ou Fim3 et d'une sous-unité mineure, FimD (Willems et al., 1993). Les interactions des fimbriae avec les glycosaminoglycanes et les intégrines se font respectivement grâce à la sous-unité majeure et la sous-unité mineure (Geuijen et al., 1996; Hazenbos et al., 1995). Ceci permet la fixation de la bactérie à une grande variété de cellules incluant les cellules épithéliales et les monocytes humains (van den Berg et al., 1999). Les fimbriae jouent un rôle dans l'infection de la muqueuse laryngale (Locht et al., 2001) et ont été intégrés à certaines formulations de vaccins acellulaires.

La pertactine (PRN) appartient à la famille des auto-transporteurs et est alors associée à la membrane externe bactérienne (Roberts et al., 1991). Des régions riches en prolines ou contenant un motif RGD favorisent l'adhésion cellulaire (Leininger et al., 1991; Locht et al., 2001). Il a été montré que cette protéine joue un rôle essentiel dans la résistance de la bactérie à la clairance induite par les neutrophiles (Inatsuka et al., 2010). Cette adhésine est également utilisée dans plusieurs formulations vaccinales (Bock and Gross, 2001).

Le facteur de colonisation trachéale (Tcf) fait également partie de la famille des auto-transporteurs. Il peut être associé à la membrane bactérienne ou être sécrété dans le milieu extracellulaire. Cette protéine contient des séquences riches en proline ou portant le motif RGD. Ce facteur spécifique à *B. pertussis*, semble contribuer à la colonisation trachéale (Finn and Stevens, 1995; Loch et al., 2001).

## 2. Les toxines

La majorité des toxines exprimées par *B. pertussis* sont des protéines, exceptés le lipopolysaccharide et la cytotoxine trachéale.

Le lipopolysaccharide (LPS) est exprimé à la surface de la bactérie. Il comprend une partie hydrophobe (le lipide A) et un noyau oligosaccharide à chaîne ramifiée. *B. pertussis* ne porte pas d'antigène O au niveau du noyau de son LPS (on parlera alors de lipooligosaccharide (LOS)) contrairement à *B. bronchiseptica* et *B. parapertussis*. En effet, ces dernières produisent un antigène O en phase d'avirulence (Cummings et al., 2006; Mattoo and Cherry, 2005). Le LPS est pyrogénique, mitogénique, toxique et peut activer la production de cytokines pro-inflammatoires. Il semble requis pour la colonisation et la survie des Bordetelles (Harvill et al., 2000). Notons que le LOS serait moins pyrogénique que le LPS.

La toxine cytotrachéale (TCT) est un glycopeptide issu de la dégradation du peptidoglycane. Contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, qui recyclent le peptidoglycane en important ses fragments de dégradation dans le cytoplasme grâce au transporteur AmpG de la membrane cytoplasmique, *B. pertussis* libère la TCT dans l'environnement puisque son transporteur AmpG est inefficace. Cette toxine permet ainsi la destruction des cellules épithéliales ciliées et empêche la clairance du mucus. Elle est considérée comme étant le facteur principal impliqué dans la toux. Il a été montré que la TCT agit en synergie avec le LPS (Luker et al., 1995; Loch et al., 2001; Mattoo and Cherry, 2005).

La toxine pertussique (PTX) est considérée comme étant le facteur de virulence majeur de *B. pertussis*. PTX est composée de 5 sous-unités nommées S1 à S5 en fonction de leur poids moléculaires décroissant et arrangées en une structure A-B. La partie A correspond à la sous-unité S1 et porte une activité d'ADP-ribosylation de protéines G trimériques. PTX va cibler la sous-unité  $\alpha$  des protéines G trimériques  $G_i$  impliquées dans la régulation des adénylates cyclases eucaryotes liées à la membrane. L'activité d'ADP-ribosylation va alors perturber les fonctions métaboliques des cellules cibles. En effet, le niveau d'AMP cyclique, un messenger important dans la signalisation cellulaire, va augmenter dans les cellules cibles étant donné que la régulation négative de l'activité de l'adénylate cyclase sera altérée. La partie B est composée des sous-unités S2 à S5. Notons que seule la sous-unité S4 est dupliquée dans l'oligomère B, les autres sous-unités étant retrouvées une seule fois dans la structure. L'oligomère B est responsable de la fixation de la toxine au niveau de récepteurs présents à la surface des cellules, du trafic intracellulaire par endocytose et du transport rétrograde. La production de PTX inclut la synthèse des sous-unités, leur transport à travers la membrane interne probablement grâce à la machinerie Sec. Après le clivage du peptide signal, la toxine est assemblée dans le périplasme puis sécrétée à travers la membrane externe grâce au système de sécrétion de type IV, Ptl (Locht et al., 2011). PTX est un des composants majeurs



des vaccins acellulaires sous forme détoxifiée, par la chaleur ou par voie chimique (Bock and Gross, 2001).

L'adénylate cyclase / hémolysine (CyaA ou ACT) est une protéine bi-fonctionnelle. Elle possède une activité hémolytique ainsi qu'une activité adénylate cyclase dépendante de la calmoduline (Glaser et al., 1988). Ces deux activités sont connues comme étant importantes dans les stades précoces de l'infection, en induisant l'apoptose des macrophages alvéolaires ou en inhibant l'activité phagocytaire des monocytes (Locht et al., 2001; Eby et al., 2011). En effet, cette toxine va augmenter la concentration en AMP cyclique de la cellule cible (Bassin et al., 2000). Le domaine catalytique est porté par le domaine N-terminal de la protéine tandis que le domaine C-terminal est responsable de l'activité d'hémolyse. La toxine est synthétisée sous forme de précurseur puis activée par palmitoylation, ce qui permettra la fixation aux cellules cibles ainsi que la formation d'un pore pour la translocation de la toxine à l'intérieur des cellules de l'hôte (Locht et al., 2001).

La toxine dermonécrotique (DNT) est une protéine cytoplasmique, qui contrairement aux autres toxines n'est pas sécrétée. En effet, cette dernière semble être libérée lors de la lyse bactérienne et son rôle dans la pathogénie reste à éclaircir. Toutefois, sous sa forme purifiée, elle est létale chez la souris en injection intraveineuse (Locht et al., 2001).

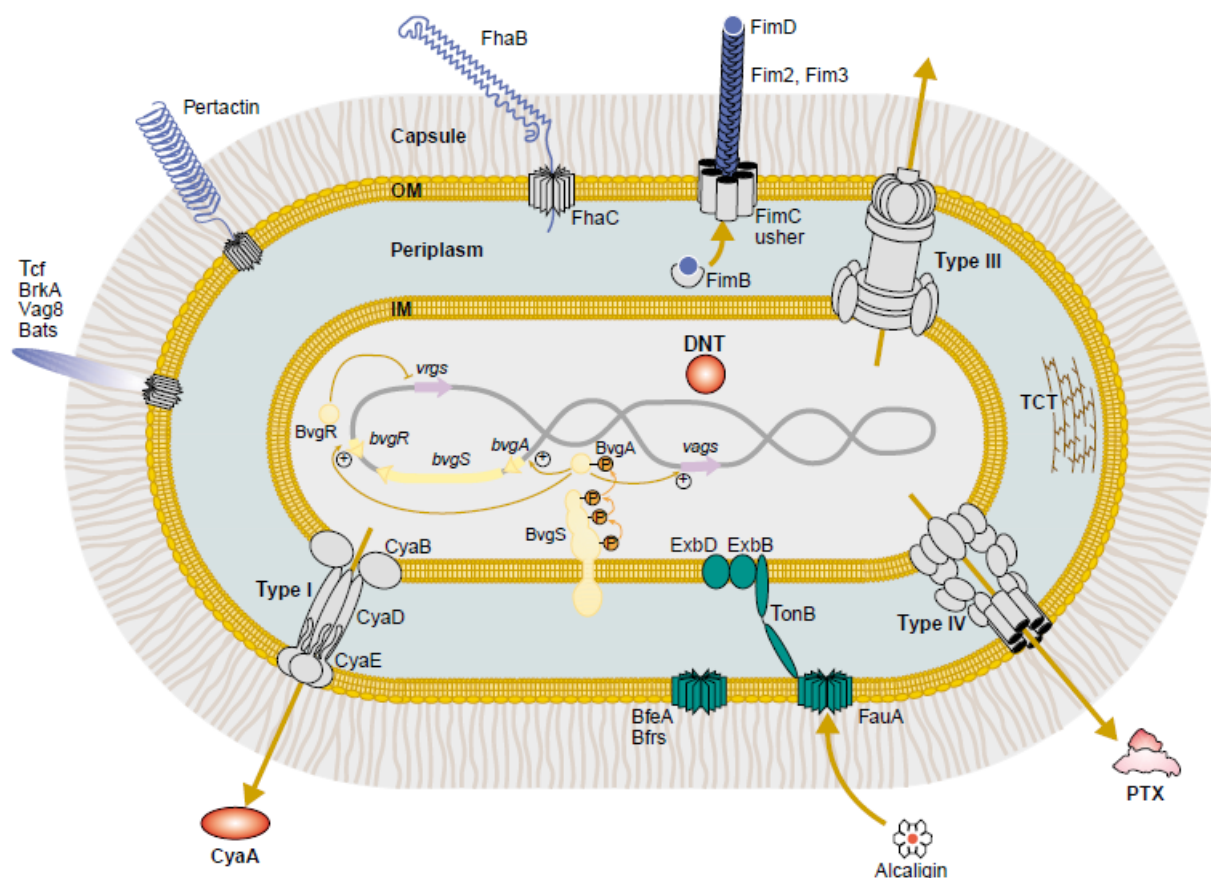


Figure 4 : Les facteurs de virulence de *Bordetella pertussis*. Les adhésines, les toxines ainsi que leurs protéines de transport sont représentées respectivement en bleu, rouge et gris. Le système à deux composants BvgAS (représenté en beige) régule l'expression de ces différents facteurs de colonisation (Locht et al, 2001).

### 3. Autres facteurs impliqués dans la virulence

Les adhésines et les toxines jouent un rôle prépondérant dans la colonisation du tractus respiratoire. Plus récemment d'autres facteurs de virulence putatifs ont pu être identifiés, et quelques exemples seront présentés dans cette sous-partie, dont deux auto-transporteurs appartenant au régulon Bvg, BrkA et Vag8.

Brk est impliqué dans la résistance à la mort induite par le complément. Cette protéine présente deux motifs RGD et deux autres motifs potentiellement impliqués dans la fixation aux glycoconjugués sulfatés. Le mécanisme de résistance au sérum reste obscur mais il semblerait que le niveau de résistance soit corrélé au niveau d'expression des gènes *brk*.

Vag8 est une protéine homologue à la pertactine, au Tcf et à Brk et qui contient également un site RGD (Locht et al., 2001).

Un système de sécrétion de type III (T3SS) a également été identifié chez *B. pertussis*. Ces systèmes sont connus chez les bactéries à Gram négatif pathogènes pour sécréter des protéines effectrices dans le milieu extérieur ou directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, dans le but de perturber une variété de fonctions physiologiques. Chez *B. pertussis*, ce système semble induire une cytotoxicité. Un effecteur a été identifié, il s'agit de BteA qui agirait comme un facteur anti-sigma, pour coupler l'activité de sécrétion du système T3SS à l'expression des gènes bactériens (Ahuja et al., 2016).

L'expression des nombreux facteurs de virulence produits par *Bordetella pertussis* pour coloniser le tractus respiratoire humain, est sous la dépendance d'un système unique, le système à deux composants BvgAS.

## II. Régulation de la virulence de *Bordetella pertussis*

### A. La régulation génétique et les systèmes à deux composants

Les micro-organismes ont développé des systèmes de régulation de l'expression des gènes afin de s'adapter aux changements environnementaux. Suite à la perception d'un stimulus particulier, la bactérie va modifier le profil d'expression de certains gènes, impliqués par exemple dans la réponse à différents stress, dans le métabolisme ou dans la virulence, afin de s'adapter et survivre aux nouvelles conditions environnementales rencontrées. Trois mécanismes majeurs de régulation sont utilisés par la bactérie pour contrôler l'expression des gènes. Il s'agit des facteurs sigma alternatifs, des systèmes à un et à deux composants.

#### 1. Facteurs sigma et systèmes à un composant

Les facteurs sigma sont des sous-unités protéiques de l'ARN polymérase qui jouent un rôle dans l'initiation de la transcription au niveau des séquences promotrices. La bactérie va utiliser différents facteurs sigma pour contrôler spécifiquement l'initiation de différents promoteurs comme ceux des gènes codant des facteurs de virulence (Wilson et al., 2002).

Les systèmes à un composant correspondent à des protéines présentant un domaine senseur directement relié à un domaine effecteur. Ces systèmes ne comportent pas d'histidine-kinase. Les domaines senseurs et effecteurs sont généralement les mêmes que ceux retrouvés dans les systèmes à deux composants. Dans la majorité des cas, les domaines senseurs sont des domaines liant de petites molécules et le domaine effecteur est un domaine de liaison à l'ADN (Ulrich et al., 2005). Nous pouvons citer l'exemple de CadC chez *Escherichia coli*, qui présente un domaine de liaison à l'ADN cytoplasmique, suivi d'un connecteur puis d'un segment transmembranaire ainsi que d'un domaine périplasmique de perception du pH (Buchner et al., 2015).

#### 2. Les systèmes à deux composants

##### a. Description et caractéristiques

Les systèmes à deux composants sont impliqués dans la régulation de processus divers tels que le métabolisme, la mobilité, le développement ou encore la virulence. Ces systèmes ont été découverts il y a environ une trentaine d'années. Différentes études ont permis d'identifier plus de 50 000 protéines et d'obtenir plus de 200 structures utiles pour la compréhension du fonctionnement de ces éléments de régulation (Gao and Stock, 2009). Ces systèmes sont retrouvés chez les eubactéries, les archés, les plantes ainsi que chez certains eucaryotes inférieurs (Stock et al., 2000). Notons qu'aucun système à deux composants n'a été identifié chez les mammifères, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Watanabe et al., 2008). En moyenne, une bactérie emploie 10 à 50 systèmes à deux composants pour percevoir les conditions environnementales et s'y adapter (Szurmant et al., 2007).

De manière générale, un système à deux composants est constitué de deux protéines : un capteur de type senseur-kinase et un régulateur (Fig. 5). Les systèmes à deux composants canoniques présentent un senseur-kinase homodimérique intégré à la membrane plasmique avec un domaine senseur extracellulaire, ainsi qu'un régulateur de réponse qui permet la réponse bactérienne principalement en modifiant l'expression des gènes cibles (Casino et al.,



2010). Ainsi, suite à la perception d'un stimulus activateur, la kinase s'autophosphoryle à partir d'ATP sur un résidu histidine, créant un groupement phosphorylé de haute énergie qui est transféré à un résidu aspartate du régulateur de réponse. Cette phosphorylation du régulateur de réponse va entraîner un changement de conformation nécessaire à son activation et permettre la mise en place d'une réponse ciblée suite à la perception du stimulus activateur (Gao and Stock, 2009). En plus de permettre la phosphorylation de leur régulateur de réponse, la plupart des histidine-kinases sont aussi pourvues d'une activité phosphatase. Ainsi, le niveau de phosphorylation du régulateur de réponse sera minutieusement contrôlé par un équilibre entre ces deux états (Salazar and Laub, 2015).

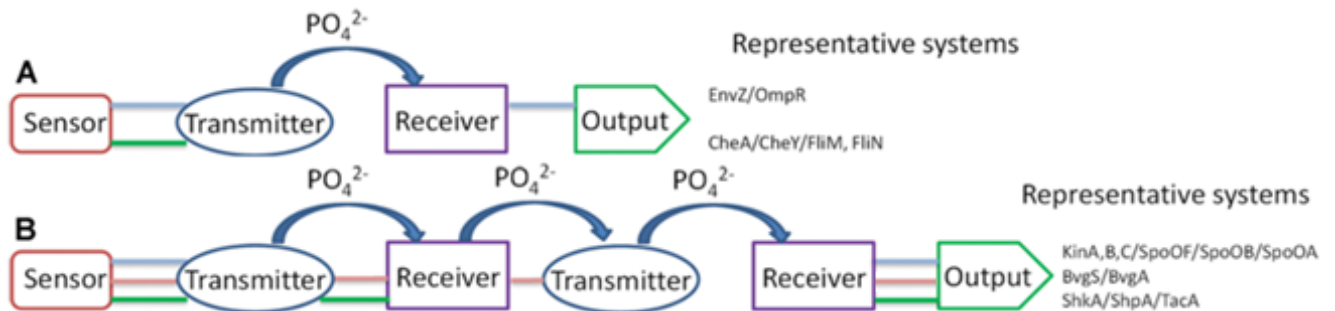


Figure 5 : Représentation schématique des deux classes de systèmes à deux composants. A. Système à deux composants classique ou orthodoxe. Les domaines senseur et émetteur correspondent au senseur-kinase tandis que les domaines receveur et effecteur constituent le régulateur de réponse. Les lignes horizontales représentent le lien covalent entre les domaines pour chaque exemple de systèmes à deux composants cités. B. Système à deux composants hybrides ou non orthodoxes. Le senseur-kinase est constitué de domaines supplémentaires impliqués dans la cascade de phosphorylation tel qu'un domaine receveur et un autre domaine de transfert. Adapté de Wang et al., 2013.

Il existe également des kinases appelées hybrides qui présentent des domaines supplémentaires impliqués dans un phospho-relais (Fig. 5). Ces dernières représentent 25% des senseurs-kinases (Salazar and Laub, 2015). Ainsi, ces systèmes à deux composants également appelés non orthodoxes présentent un domaine receveur et un domaine de phosphotransfert (HPT) en plus des domaines classiques des senseurs-kinases. Après l'autophosphorylation de la kinase et le transfert de phosphate sur l'aspartate du domaine receveur, le phosphate sera ensuite transmis au domaine HPT qui porte un résidu histidine impliqué dans la cascade de phosphorylation, pour *in fine* phosphoryler le domaine receveur du régulateur de réponse (Stock et al., 2000).

### b. Perception de signaux variés

Les domaines senseurs des systèmes à deux composants constituent la partie la plus variable des senseurs-kinases, reflétant ainsi le fait que ces derniers ont évolué pour permettre des interactions spécifiques avec un ligand ou pour percevoir un stimulus physique particulier. Ces domaines présentent des localisations variées, qu'elles soient périplasmique, membranaire ou cytoplasmique (Fig. 6) (Stock et al., 2000). Ils diffèrent également dans leurs structures et leur mode de fixation de ligands (Bhate et al., 2015).

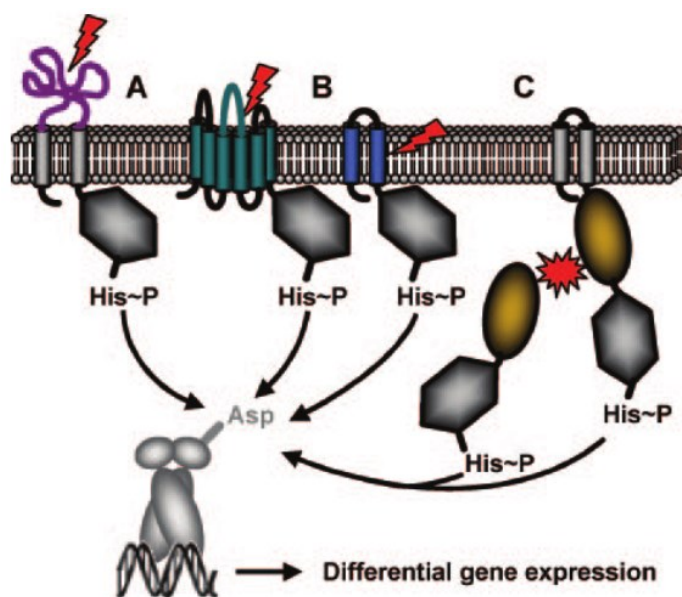


Figure 6 : Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la perception de stimulus par les senseurs-kinases. A. Perception périplasmique. B. Perception par la région transmembranaire impliquant les hélices membranaires ou en combinant la région transmembranaire ainsi que les petites boucles extracellulaires. C. Perception cytoplasmique. Le stimulus est représenté par une flèche rouge et les parties de la protéine impliquées dans la perception du signal sont colorées. Extrait de Mascher et al., 2006.

Les senseurs-kinases peuvent être classés en trois catégories basées sur la topologie de leur portion membranaire. Le groupe majeur est constitué des histidine-kinases classiques présentant un domaine senseur extracytoplasmique et deux hélices transmembranaires. Divers stimuli extracellulaires peuvent être perçus grâce à la grande variété de ces domaines extracytoplasmiques. Le signal sera ensuite transmis à travers la membrane pour réguler les activités kinase et phosphatase du domaine enzymatique cytoplasmique. Dans le second groupe, on retrouve les histidine-kinases présentant plusieurs segments membranaires, de 2 à 20, dépourvues de large domaine extracellulaire. Les stimuli perçus par ces kinases sont connus pour être associés à la membrane, comme par exemple l'intégrité de l'enveloppe cellulaire. Le troisième groupe de senseurs-kinases présente un domaine de perception cytoplasmique responsable de la perception de stimuli internes. Certaines kinases combinent plusieurs de ces topologies pour percevoir des signaux de différents compartiments, extracellulaire et cytoplasmique pour une réponse à des environnements complexes (Gao and Stock, 2009).

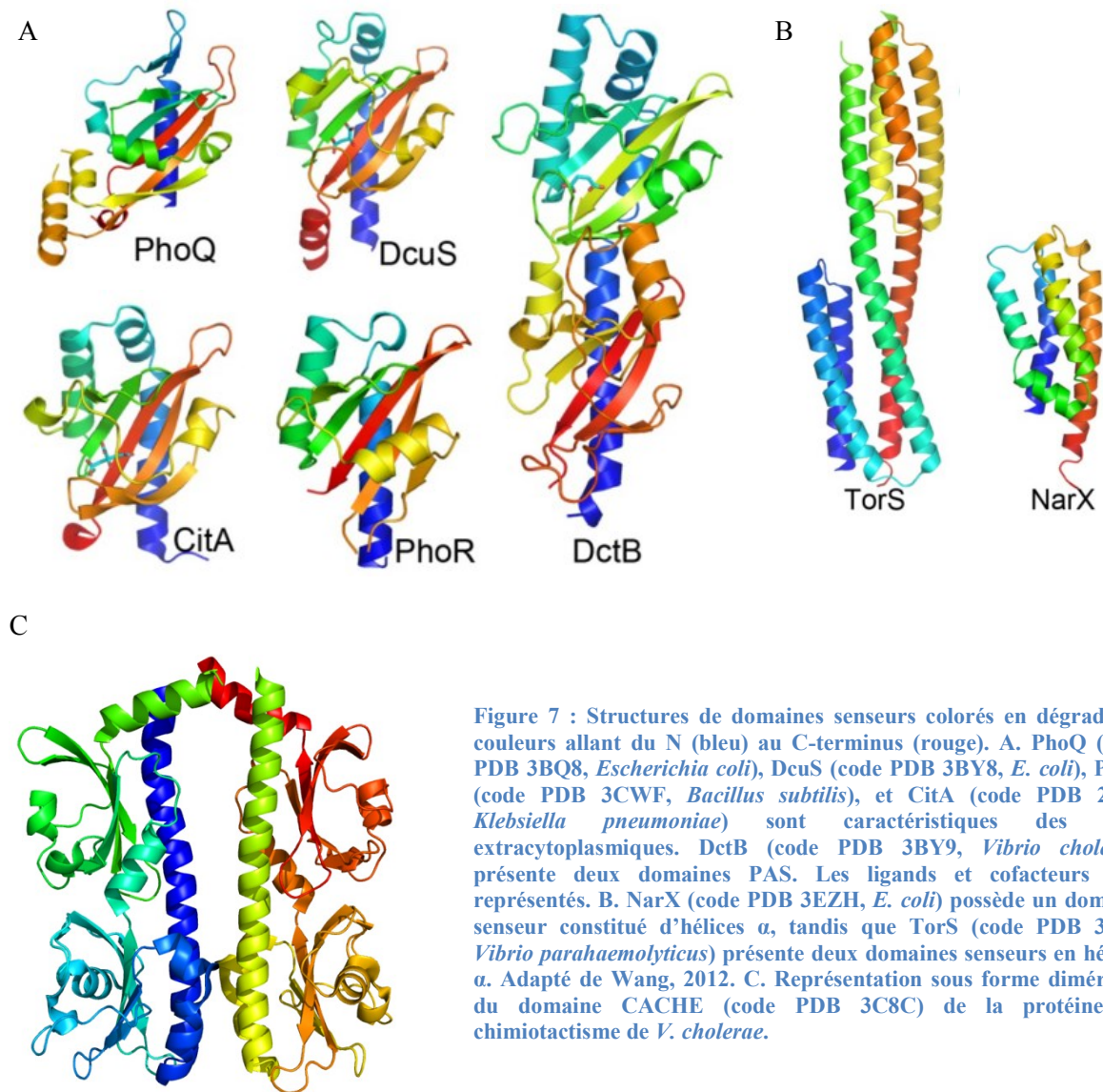
De par la grande diversité des domaines de perception retrouvés au sein des systèmes à deux composants, une grande variété de stimuli peut alors être perçue. Dans cette partie, nous illustrerons par quelques exemples les domaines impliqués dans les trois types de perception. Ces différents domaines seront repris plus en détail dans leurs parties respectives décrites dans ce manuscrit (Partie III pour les domaines VFT et Partie IV pour les domaines PAS).

#### 1) Perception extracytoplasmique

Différents types de domaines peuvent être impliqués dans la perception extracytoplasmique de petites molécules. Ainsi, on retrouve des domaines présentant un repliement constitué d'hélices  $\alpha$  et de brins  $\beta$  tels que :

- les domaines PAS (cas de CitA, DcuS, PhoQ) (Fig. 7A)
- les domaines PBP ('periplasmic binding protein') autrement dénommés VFT (pour 'Venus FlyTrap', cas de BvgS, EvgS)

- Les domaines CHASE ('Cyclase Histidine-kinase Associated Sensing Extracellular') et CACHE ('Ca<sup>2+</sup> channels, Chemotaxis receptors') (Fig.7C). Les domaines CHASE reconnaissent de petits peptides (cas de DhkA chez *Dictyostelium discoideum*). Les domaines CACHE lient de petits ligands tels que les acides aminés (cas de McpB de *B. subtilis*), des sucres ou encore des acides organiques (Mougel and Zhulin, 2001; Glekas et al., 2010).



Les domaines senseurs périplasmiques peuvent également présenter une structure en hélices  $\alpha$  (cas de NarX et TorS, Fig. 7B) (Mascher et al., 2006; Gao and Stock, 2009; Bhate et al., 2015).

Les stimuli perçus au niveau périplasmique sont transmis grâce à une hélice  $\alpha$  périplasmique qui connecte le domaine senseur au domaine transmembranaire (Bhate et al., 2015).

## 2) Perception membranaire

Les kinases présentant une perception du signal membranaire sont généralement dotées de petites boucles extracellulaires.

Un exemple bien étudié de système à deux composants percevant des changements environnementaux grâce à son segment transmembranaire est celui de DesKC. Ce dernier perçoit des changements de température et permet ainsi à la bactérie de s'y adapter (Bhate et al., 2015). Le cas de DesKC sera repris plus en détail dans la partie V.E de ce manuscrit.

### 3) Perception cytoplasmique

Les domaines impliqués dans la perception cytoplasmique sont également fort variés. Ainsi, au moins un domaine PAS est retrouvé dans 33% des senseurs-kinases, alors que les domaines GAF (phosphodiesterases spécifiques du GMPC, Adénylate cyclase et FhlA) sont retrouvés dans 9% des senseurs-kinases. Ces deux domaines présentent une variabilité de séquence relativement importante et une certaine plasticité structurale, ce qui leur permet de reconnaître des stimuli et de transmettre le signal. Ces domaines sont également impliqués dans des interactions protéine-protéine. Des domaines HAMP (domaines présents dans des Histidine-kinases, des Adénylates cyclases, des protéines accepteuses de Méthyl et des Phosphatases) sont présents dans environ 31% des senseurs-kinases et seraient impliqués dans la transduction de signal plutôt que dans la perception de stimuli. Ce domaine est généralement retrouvé immédiatement après la région transmembranaire (Gao and Stock, 2009).

Ainsi, nous pouvons donner comme exemples de senseurs-kinases à domaine HAMP, FixL qui porte également un domaine PAS impliqué dans la perception d'oxygène, et EnvZ qui régule l'expression de porines de la membrane externe en réponse à un stress osmotique (Mascher et al., 2006).

### c. Le régulateur de réponse

Les régulateurs de réponse sont des protéines solubles constituées de deux domaines, un domaine N-terminal de régulation conservé appelé domaine receveur, et un domaine effecteur variable, en position C-terminale (Fig. 8).

Le domaine receveur présente une structure conservée de topologie  $(\beta/\alpha)_5$ , où les brins  $\beta$  et les hélices  $\alpha$  sont alternés de sorte à obtenir un feuillet central constitué de 5 brins parallèles entourés de deux hélices  $\alpha$  d'un côté et de 3 de l'autre (Bourret, 2010; Bhate et al., 2015). La majorité des régulateurs de réponse (63%) sont des facteurs de transcription présentant un domaine effecteur pouvant se lier à l'ADN. Les régulateurs de réponse peuvent agir en tant qu'activateur, répresseur, ou les deux. Ils peuvent réguler l'expression d'un nombre de gènes variés allant d'un opéron à plus d'une centaine de gènes. Certains régulateurs de réponses (13 %) peuvent être dotés de fonctions enzymatiques, comme dans le cas de CheB, la méthylesterase du chimiotactisme (Stock et al., 2000; Gao and Stock, 2009). D'autres régulateurs de réponse présentent un domaine effecteur de liaison à l'ARN ou à une protéine (Galperin, 2006).

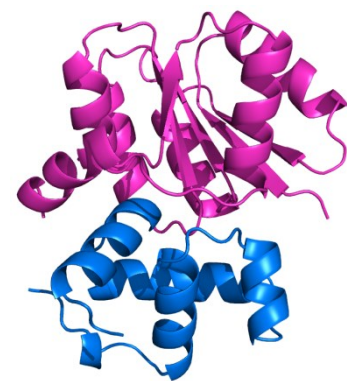


Figure 8 : Représentation du régulateur de réponse NarL d'*E. coli* sous forme monomérique (code PDB 1a04). Le domaine receveur est représenté en violet et le domaine de liaison à l'ADN en bleu.



Le régulateur de réponse catalyse le transfert du groupement phosphate à partir du résidu histidine phosphorylé du senseur-kinase, vers un résidu aspartate conservé de son domaine de régulation. Suite à la phosphorylation du résidu aspartate, le régulateur de réponse va subir un changement de conformation permettant son activation (Bourret, 2010).

De petites molécules comme le phosphate d'acétyl, le carbamyl-phosphate, l'imidazole phosphate et le phosphoramidate peuvent servir de donneurs de phosphate aux régulateurs de réponse, montrant ainsi que ces derniers peuvent catalyser le transfert de phosphate indépendamment de la présence d'une histidine-kinase (Stock et al., 2000).

#### *d. Complexité du phospho-relais : interaction entre plusieurs systèmes*

Nous avons décrit les systèmes à deux composants simples, mais il faut noter que des arrangements plus complexes existent, avec par exemple des protéines accessoires telles que des phosphatases (cas de CheZ dans le système Che lié au chimiotactisme et de SixA, phosphatase d'ArcAB chez *E. coli*), ou bien des protéines de perception distinctes interagissant avec le senseur-kinase (cas de LuxP chez *Vibrio harveyi*).

Le phospho-relais peut être plus complexe et impliquer une kinase qui phosphoryle plusieurs domaines effecteurs, ou encore un régulateur de réponse régulé par plusieurs kinases. Ainsi, le senseur-kinase CheA phosphoryle CheY et CheB, tandis que le niveau de phosphorylation du régulateur de réponse Spo0F de *B. subtilis* dépend de quatre senseurs-kinases (KinA-B-C-D). Les senseurs-kinases NarQ et NarX des systèmes NarQP et NarXL, régulent la phosphorylation des deux régulateurs de réponse, NarL et NarP (Gao and Stock, 2009).

Etant donné la présence d'un grand nombre de systèmes à deux composants au sein d'une même bactérie, une spécificité de reconnaissance entre le senseur-kinase et le régulateur de réponse qui lui est associé, est nécessaire (Szurmant and Hoch, 2010). Cette spécificité dépend de trois mécanismes : la reconnaissance moléculaire, l'activité phosphatase ainsi que la compétition entre plusieurs régulateurs de réponse pour les senseurs-kinases phosphorylés. La reconnaissance entre le senseur-kinase et le régulateur de réponse est permise par un ensemble de résidus localisés au niveau de chaque molécule. Des analyses informatiques ont permis d'identifier les résidus impliqués dans la reconnaissance entre ces deux domaines. Ainsi, dans le senseur-kinase, deux groupes de résidus respectivement situés avant l'histidine phosphorylable et près de la fin du paquet de quatre hélices du domaine DHP (pour Dimérisation et Histidine phosphotransfert) de la kinase (voir partie II.A.3.a. kinase, pour la description de ces domaines) ont pu être identifiés. En modifiant ces résidus, il est possible de convertir la spécificité du phospho-transfert vers un régulateur de réponse autre que celui d'origine (Gao and Stock, 2009; Podgornaia and Laub, 2013). En ce qui concerne le second mécanisme, les histidine-kinases sont bifonctionnelles, elles peuvent agir en tant que kinase et permettre la phosphorylation du régulateur ou en tant que phosphatase et stimuler sa déphosphorylation. L'activité phosphatase permet de minimiser les signalisations croisées en déphosphorylant le régulateur de réponse si celui-ci a été phosphorylé par une kinase non apparentée ou par une petite molécule donneuse de phosphate. Enfin, la spécificité est également assurée par la proportion de chacun des partenaires dans la cellule. De manière générale, la concentration du régulateur de réponse est plus élevée que celle du senseur-

kinase. Chez *E. coli*, il y a un senseur kinase EnvZ pour 35 régulateurs de réponse OmpR, ce qui favorise les interactions entre les partenaires d'un même système à deux composants (Podgornaia and Laub, 2013).

### 3. La kinase : siège de l'activité des systèmes à deux composants.

Les histidine-kinases fonctionnent généralement en homodimères et deux classes d'enzymes ont pu être définies en fonction de l'organisation de leurs domaines fonctionnels (Fig 9 ; Foussard et al., 2001). Ces deux classes présentent des fonctions et des mécanismes de régulation distincts (Dutta et al., 1999). La classe I, dont EnvZ est le représentant, est caractérisée par une région contenant l'histidine phosphorylable directement reliée au domaine catalytique. La classe II, dont le représentant est CheA présente quant à elle le résidu histidine distant du domaine catalytique en ce qui concerne leurs positions dans la séquence (Dutta et al., 1999).

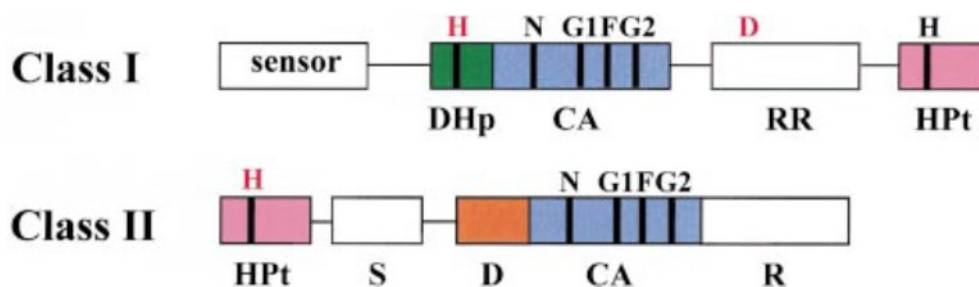


Figure 9 : Représentation schématique des deux classes d'histidine-kinases. Les kinases de classe I portent le résidu histidine phosphorylable au niveau de leur domaine DHp tandis que pour les kinases de classes II, ce résidu histidine est retrouvé au niveau du domaine HPt. Les domaines de régulateur de réponse (RR) ou HPt ne sont pas toujours présents dans les kinases de classe I. Le domaine de liaison de substrat (S), de dimérisation (D) ou encore de régulation (R) sont retrouvés au niveau des kinases de classe II. Extrait de Dutta et al., 1999.

#### a. Architecture

##### 1) Les kinases de classe I

Il s'agit des kinases les plus couramment retrouvées. Notons que la kinase de BvgS fait partie de cette classe de kinases. Ces modules enzymatiques sont retrouvés en majorité dans des systèmes liés à la membrane et sont composés d'environ 250 résidus répartis en deux sous-domaines de fonctions distinctes (Fig. 10, Marina et al., 2005). En partie N-terminale est retrouvé le domaine DHp qui permet la dimérisation et porte l'histidine phosphorylable (boîte H). Ce domaine est composé de deux hélices alpha ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) qui forment un paquet de quatre hélices antiparallèles (autrement appelé 'four-helix bundle'). L'hélice  $\alpha_1$  porte l'histidine phosphorylable qui est normalement orientée vers le solvant (Casino et al., 2014). Le second domaine qui compose la kinase est le domaine catalytique (CA pour 'Catalytic ATP-binding'). Le domaine CA contient des motifs conservés telles que les boîtes N, G1, F et G2 qui délimitent une cavité où se lie l'ATP (Foussard et al., 2001). Le domaine CA est caractérisé par un repliement particulier constitué de 3 hélices  $\alpha$  et de 5 brins  $\beta$ , nommé repliement Bergerat (Casino et al., 2010). Ce domaine porteur de l'ATP va catalyser la phosphorylation du résidu histidine. Le domaine CA s'apparente aux domaines de liaison de l'ATP des ATPases et fait partie de la superfamille GHKL (GyraseB, Hsp90, Histidine-Kinase et MutL) (Marina et al., 2005). Les domaines DHp et CA sont reliés par une boucle déstructurée, plus ou moins flexible, constituée de 5 à 10 résidus (Dutta et al., 1999; Casino et

al., 2014). Parmi les kinases de classe I, sont retrouvées les kinases hybrides, qui possèdent également un domaine receveur suivi d'un domaine de phosphotransfert (HPt) fusionné au domaine CA de la kinase. Dans certaines architectures, ce domaine HPt est distinct de la kinase et constitue un module isolé (Foussard et al., 2001).

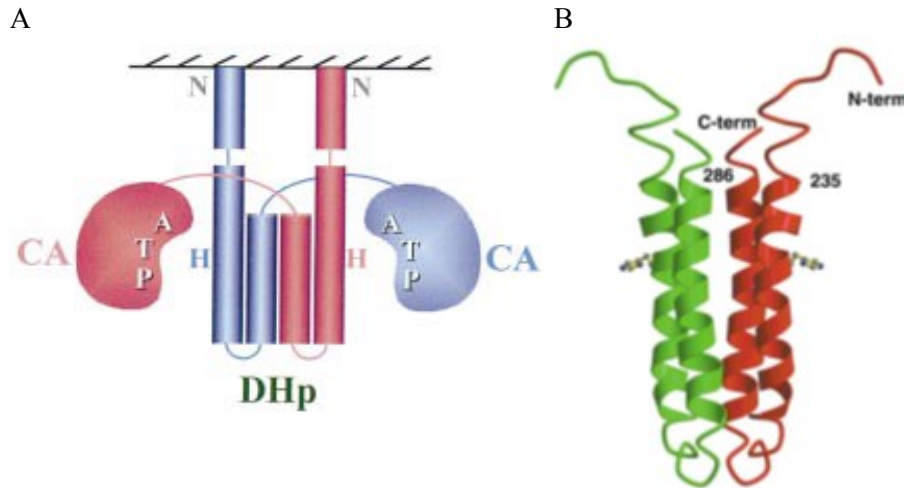


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation d'EnvZ, une kinase de classe I. A. Les monomères sont présentés par deux couleurs. Le trait hachuré noir en haut du schéma correspond à la membrane cytoplasmique. Extrait de Dutta et al., 1999. B. Représentation du domaine DHp d'EnvZ. Extrait de Foussard et al., 2001.

En fonction de leur domaine DHp, quatre familles Pfam de kinases ont été définies. Environ 85% appartiennent au groupe HisKA (PF00512) dont la kinase de BvgS fait partie, et environ 10% des kinases appartiennent à la famille HisKA\_3 (PF007730) (Trajtenberg et al., 2010).

## 2) Les kinases de classe II

La classe II regroupe les kinases spécialisées dans la chimiotaxie (cf partie V.F.). A la place du domaine DHp, un domaine HPt en partie N-terminale porte l'histidine phosphorylable (Fig. 11). Ces domaines sont définis par un paquet de quatre hélices formé d'une seule chaîne. Ce domaine est séparé du domaine catalytique par un domaine de liaison de substrat (S) et un domaine de dimérisation (D). Notons que le domaine de dimérisation de CheA a une architecture similaire à celui d'EnvZ excepté qu'il ne porte pas l'histidine conservée. Le domaine régulateur (R) en position C-terminale est typique des kinases de classe II. Le domaine catalytique porte les boîtes N, G1, F et G2 comme dans les kinases de classe I (Robinson et al., 2000; Foussard et al., 2001; Casino et al., 2014).

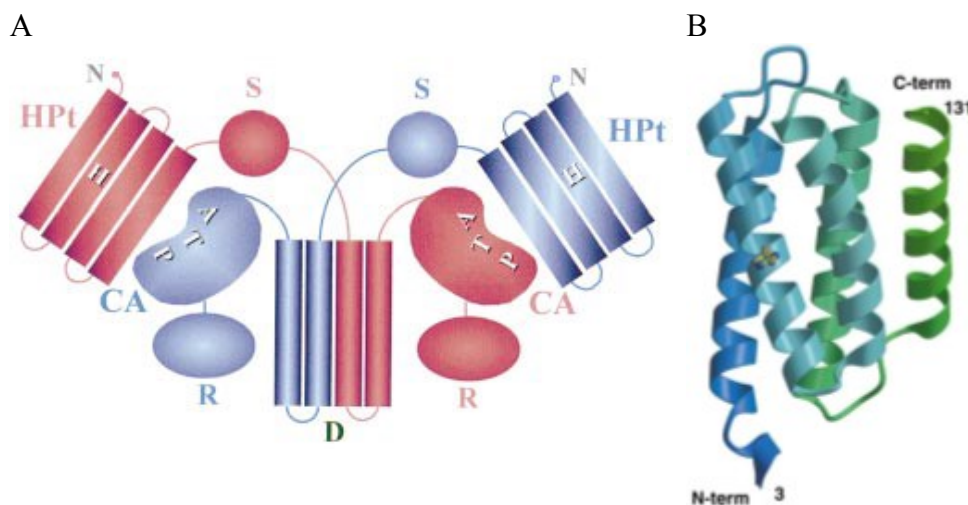


Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation de CheA, une kinase de classe II. A. Les monomères sont représentés avec deux couleurs distinctes. L'autophosphorylation a lieu au niveau du HPt. Les abréviations S, R, CA et D sont reprises dans le texte. Extrait de Dutta et al., 1999. B. Représentation du domaine P1 (HPt) de la kinase CheA de *S. typhimurium*. L'histidine phosphorylable est portée par la deuxième hélice du domaine. Extrait de Foussard et al., 2001.

### b. Régulation de l'activité kinase

Les histidine-kinases portent trois activités enzymatiques que sont l'autophosphorylation, le transfert de phosphate et l'activité phosphatase (Marina et al., 2005). Des interactions entre les hélices du DHp favorisent la dimérisation de la kinase. Grâce à la boucle mobile qui relie le DHp au CA, ce dernier va pouvoir adopter différentes conformations par rapport à l'histidine phosphorylable. Ainsi, l'autophosphorylation est possible lorsque le phosphate gamma de l'ATP lié au domaine catalytique est suffisamment proche de l'histidine phosphorylable. Cette dernière, étant exposée au solvant, va attaquer le phosphate lui-même exposé (Casino et al., 2010; Casino et al., 2014).

L'autophosphorylation peut avoir lieu en *trans* ou en *cis*, c'est à dire que le domaine CA d'un monomère va phosphoryler l'histidine de l'autre monomère (*trans*) ou de son propre monomère (*cis*) (Fig. 12). En observant les structures de différentes histidine-kinases, un modèle a été proposé. Ce mécanisme d'autophosphorylation dépendrait de la boucle à la base du domaine DHp qui connecte les deux hélices. Ainsi, on va déterminer si l'hélice  $\alpha 2$  est positionnée à droite ou à gauche de l'hélice  $\alpha 1$  lorsqu'on regarde l'axe du DHp à partir de sa partie N-terminale. Si la boucle tourne vers la droite, le domaine CA d'un monomère est proche de l'histidine de l'autre monomère, l'autophosphorylation a alors lieu en *trans*. Dans le cas contraire, où la boucle tourne vers la gauche, le domaine CA est proche de sa propre histidine, l'autophosphorylation a alors lieu en *cis* (Ashenberg et al., 2013). Chez BvgAS l'autophosphorylation de la kinase s'effectue en *trans*.

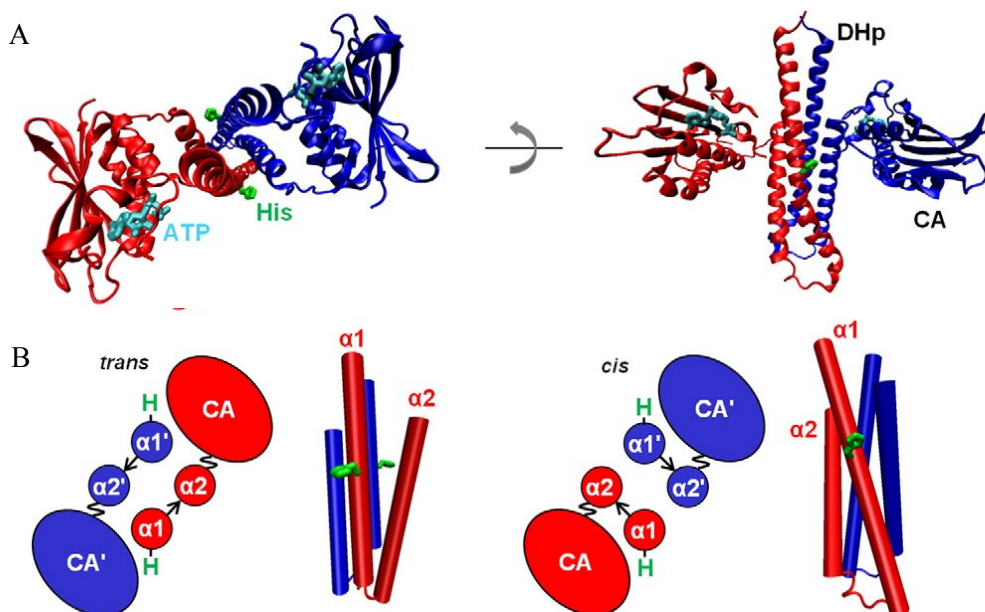


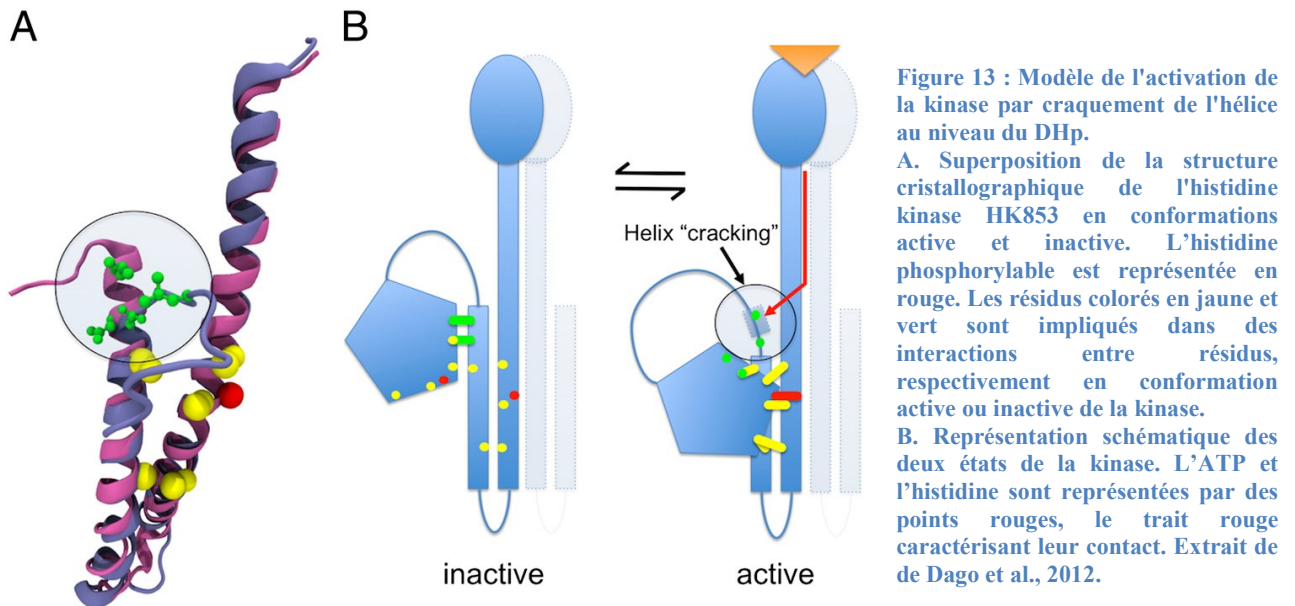
Figure 12 : Autophosphorylation en *trans* ou en *cis*. A. La région cytoplasmique de l'histidine-kinase TM0853 issue de *Thermotoga maritima* (code PDB 2C2A) comportant les domaines DHp et CA est représentée avec l'histidine phosphorylable et l'ATP. L'autophosphorylation a lieu en *cis*. B. Représentation schématisée des deux types d'autophosphorylation. Extrait de Ashenberg et al., 2013.

#### 1) L'activation de la kinase : autophosphorylation

Un modèle d'activation de la kinase par une cassure de l'hélice du DHp a été proposé (Fig. 13). Ainsi, des résidus favorisant les coudes sont retrouvés au niveau des hélices du DHp, comme c'est le cas d'une proline conservée adjacente à l'histidine phosphorylable (C. Wang



et al., 2013). Lorsque la kinase est en conformation inactive, les domaines CA et DHp sont orientés de telle sorte que l'histidine phosphorylable et l'ATP sont éloignés. La perception d'un signal au niveau du domaine senseur va permettre l'activation de la kinase en imposant une contrainte sur l'hélice C-terminale du DHp, ce qui va conduire à un craquement de l'hélice. Il va alors y avoir un réarrangement des domaines CA et DHp pour que l'histidine et l'ATP soient suffisamment proches pour permettre le transfert du groupement phosphorylé (Dago et al., 2012).



Différentes structures d'histidine-kinases ont permis de mettre en évidence une asymétrie du dimère nécessaire pour l'autophosphorylation. En effet, dans certaines structures, un des domaines CA est proche de l'histidine phosphorylable tandis que le second est éloigné de la deuxième histidine (Fig. 14). La forme symétrique serait quant à elle utile à l'activité phosphatase (Casino et al., 2014).

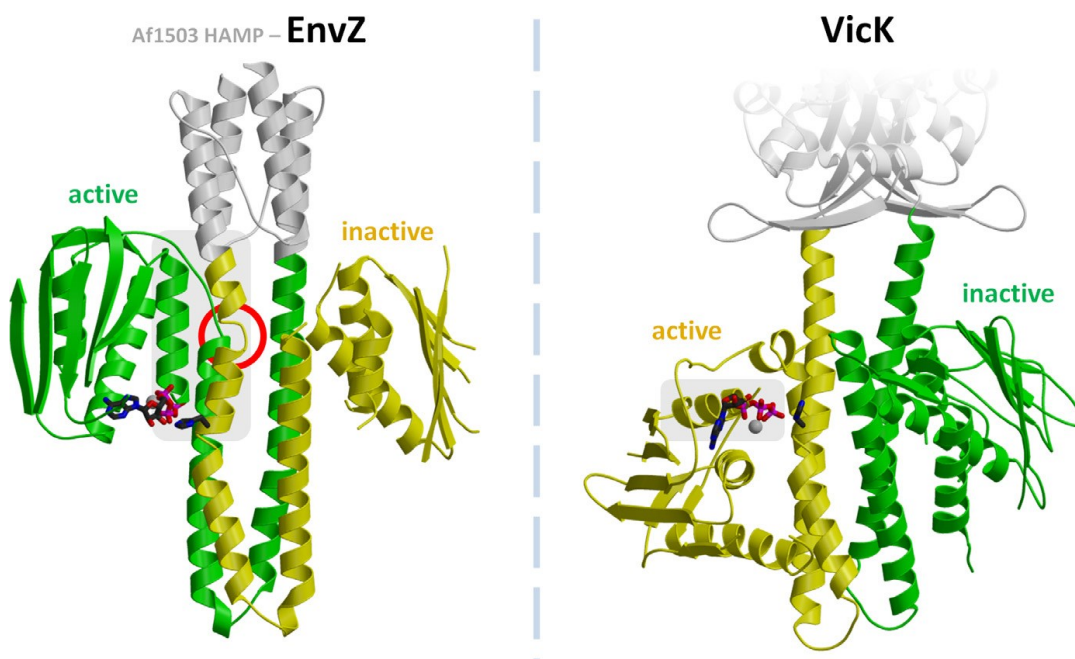


Figure 14 : Exemple d'activation du site enzymatique de deux senseurs-kinases, s'autophosphorylant en *trans* (EnvZ (Af1503)) ou en *cis* (VikK). Un coude au niveau du motif DRT entre le HAMP et le DHP d'EnvZ permet la conformation active. L'asymétrie conférée par un mécanisme de flip-flop permet l'activation de la kinase. Extrait de Ferris et al., 2014.

Un mécanisme d'activation de la kinase par un phénomène de flip-flop séquentiel entre les domaines CA et DHp a alors été proposé (Fig. 15). Une dynamique importante ainsi qu'une forte asymétrie caractérisent la forme active de la kinase. Un domaine CA fixe est séquestré par le DHp en une conformation inactive tandis que le second est mobile et permet la phosphorylation. La séquestration fait intervenir des interactions hydrophobes. Ce modèle mécanique illustre l'importance de la séquestration du domaine CA (par interaction avec les résidus du DHp) comme mécanisme majeur pour le passage d'un état actif à inactif de la kinase et possiblement pour atteindre la conformation symétrique nécessaire pour l'activité phosphatase. L'état asymétrique serait également impliqué dans l'activité phosphotransférase (Mechaly et al., 2014).

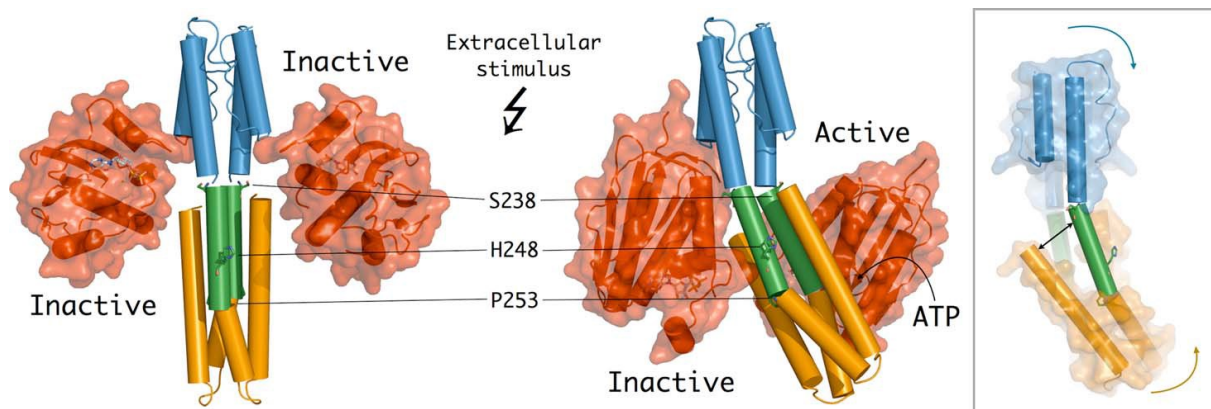


Figure 15 : Modèle mécanique pour l'autophosphorylation de la kinase CpxA. Modèle réalisé à partir de la structure HK853 (code PDB 2C2A) et de la chimère Af1503 HAMP-EnvZ DHp (code PDB 3ZWR). Les formes inactive et active de la kinase sont représentées respectivement à gauche et à droite. L'état actif est caractérisé par une forte asymétrie dynamique où un domaine CA est hautement mobile et forme un site actif tandis que le second est séquestré en une conformation inactive grâce à des interactions hydrophobes avec le domaine DHp. Extrait de Mechaly et al., 2014.

Certaines kinases, pour réguler leur activité, font appel à des protéines auxiliaires. Nous citerons comme exemple Sda, qui se fixe au domaine DHp de KinB son senseur-kinase impliqué dans la régulation de la sporulation chez *Geobacillus stearothermophilus*. Cette fixation va empêcher l'autophosphorylation, en bloquant par encombrement stérique la communication entre le domaine catalytique et le DHp. La fixation de Sda au domaine DHp permet également de bloquer la communication entre le DHp et Spo0F, communication nécessaire pour le phosphotransfert et l'activité phosphatase (Bick et al., 2009)

## 2) L'inactivation de la kinase : l'activité phosphatase

En régulant les activités kinase et phosphatase des histidine-kinases, la cellule peut gérer minutieusement le niveau de régulateur de réponse phosphorylé. La déphosphorylation du régulateur de réponse nécessite le positionnement correct d'une molécule d'eau pour hydrolyser la liaison du phosphate sur l'aspartate du régulateur de réponse (Willett and Kirby, 2012). Toutes les kinases ne présentent pas d'activité phosphatase, ainsi dans certains systèmes des phosphatases auxiliaires seront utilisées pour réguler la quantité de régulateur de réponse phosphorylé.

Des études des acides aminés proches de l'histidine ont montré l'implication de certains de ces résidus dans l'activité kinase ou phosphatase. Ainsi, le motif 'DxxxQ' retrouvé chez CheZ, une phosphatase auxiliaire, permettrait de coordonner la molécule d'eau pour l'attaque nucléophile de CheY phosphorylé. Ce motif a également été retrouvé au niveau d'histidine-kinases appartenant à la sous-famille HisKA\_3. Ceci laisse à penser à un mécanisme général pour l'activité phosphatase. Dans la famille HisKA, la plus représentative, on retrouve un motif 'E/DxxT/N' très conservé situé juste après l'histidine phosphorylable. Les résidus 'T/N' seraient requis pour l'activité phosphatase tandis que les résidus 'E/D' seraient nécessaires pour l'activité kinase (Willett and Kirby, 2012).

En plus de jouer un rôle dans la perception de signal et dans la transduction d'information, il a été proposé que des domaines additionnels au niveau du senseur-kinase pouvaient influencer l'activité phosphatase. Ainsi, pour certaines kinases, la présence d'un domaine PAS est nécessaire pour l'activité phosphatase et pourrait s'expliquer par une interaction entre le PAS et le domaine CA. Nous pouvons citer les exemples du système ThkA/TrrA de *Thermotoga maritima* et du système VicR/VicK de *Streptococcus pneumoniae* (Yamada et al., 2009; Gutu et al., 2010). Il a également été montré que des interactions entre les domaines HAMP et CA du senseur-kinase PhoQ étaient nécessaires pour l'activité phosphatase (Matamouros et al., 2015) (cf la partie V.C.4. pour plus de détails).

### c. Des modules supplémentaires du senseur-kinase impliqués dans le phospho-relais.

#### 1) Domaine receveur

Environ 25% des senseurs-kinases présentent un domaine receveur additionnel. Les domaines receveurs sont composés d'environ 120 résidus organisés en un repliement  $\alpha/\beta$  comprenant cinq brins  $\beta$  parallèles dans l'ordre 2-1-3-4-5 (Fig. 16). Une conservation de séquence d'environ 26% est retrouvée au niveau de ces domaines receveurs avec la présence de résidus comme l'aspartate impliqué dans la cascade de phosphorylation, un résidu glutamate et deux autres résidus aspartate impliqués dans la coordination de l'ion  $Mg^{2+}$ , essentiel pour le transfert de phosphate, et un résidu lysine conservé qui forme un pont salin avec le phosphate lorsque le domaine est activé. Les domaines receveurs présentent une activité enzymatique, catalysant le transfert de phosphate et l'autodéphosphorylation (Gao and Stock, 2009).



Figure 16 : Représentation du domaine receveur de FixJ de *Sinorhizobium meliloti* (code PDB 1dck). L'aspartate phosphorylable est représenté en vert.

Des études récentes ont permis de mettre en évidence un rôle inhibiteur du domaine receveur sur l'activité kinase. Le domaine receveur du senseur kinase RsbK impliqué dans la réponse à certains stress environnementaux de *Bacillus cereus*, semble être requis pour l'inhibition de l'activité kinase étant donné que sa délétion permet d'obtenir un mutant actif

indépendamment d'un stress. Notons que RsbK ne présente pas de domaine HPt et aucun HPt soluble n'a été identifié, le domaine receveur n'aurait donc pas un rôle de phosphotransfert. Il a alors été proposé que le domaine receveur interagisse principalement avec le domaine kinase mais également en partie avec l'hélice précédant la kinase. La méthylation de cette hélice va favoriser l'interaction du domaine kinase avec le domaine receveur et stabiliser le complexe ainsi formé. La perception d'un stimulus pourrait permettre un changement de conformation au sein de RsbK pour dissiper l'interaction entre le domaine receveur et la kinase. La kinase ainsi libérée pourrait alors transmettre le groupement phosphate à son régulateur de réponse. Un effet inhibiteur du domaine receveur sur l'activité kinase a également été proposé pour différents senseurs-kinases tels que VirA chez *Agrobacterium tumefaciens*, ArcB chez *E. coli* et VsrB chez *Pseudomonas solanacearum* (Chen et al., 2015). Chez EvgS, l'homologue de BvgS chez *E. coli*, il a été proposé que le niveau d'autophosphorylation du domaine senseur pourrait être négativement régulé par le domaine receveur. En effet, la substitution du résidu aspartate phosphorylable en alanine dans le domaine receveur augmente la quantité d'histidine phosphorylée au niveau du senseur-kinase. Le ratio de formes phosphorylées pour EvgS et pour un mutant présentant une substitution en alanine de l'histidine phosphorylable du domaine HPt sont semblables, de l'ordre de 25%, tandis que le mutant au niveau du domaine receveur (substitution du résidu aspartate phosphorylable en alanine) présente un ratio de phosphorylation de plus de 95%. Le domaine receveur semble donc avoir une activité d'autodéphosphorylation plus importante que l'activité de transfert du phosphate au domaine HPt. Il a été proposé que ce mécanisme de régulation négative par le domaine receveur pourrait être commun aux autres senseurs-kinases hybrides tels que BarA et ArcB (Kinoshita-Kikuta et al., 2015).

## 2) Domaine de phosphotransfert HPt

Les domaines HPt permettent le relais du groupement phosphate entre le domaine receveur de la kinase et le régulateur de réponse. Notons que ces domaines ne présentent pas d'activité ni kinase ni phosphatase. Ces domaines présentent une structure constituée d'un paquet de quatre hélices  $\alpha$  (Fig. 17). L'histidine phosphorylable est exposée au solvant (Gao and Stock, 2009; Stock et al., 2000).

La présence de modules supplémentaires impliqués dans la cascade de phosphorylation, permet d'avoir des points de contrôle de régulation supplémentaires. Ainsi, les domaines intermédiaires peuvent être ciblés par des phosphatases spécifiques (Gao and Stock, 2009).

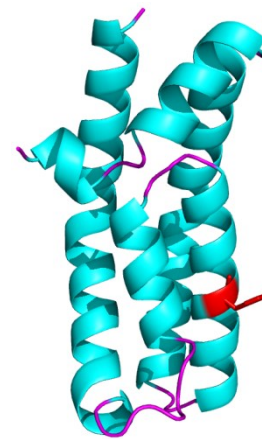


Figure 17 : Représentation du domaine de phosphotransfert d'ArcB d'*E. coli* (code PDB 2a0b). L'histidine phosphorylable est colorée en rouge.



## **B. BvgAS : le système à deux composants de *B. pertussis***

En 1931, il a été montré que des souches de *B. pertussis* cultivées *in vitro* étaient capables de perdre leur virulence spontanément et dans la plupart des cas de manière irréversible avec une fréquence de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  selon les souches. Ce phénomène a été appelé variation de phase (Leslie and Gardner, 1931). L'apparition de bactéries avirulentes peut également se faire de manière réversible en modifiant les conditions de croissance ; ce phénomène est appelé modulation phénotypique (Lacey, 1960).

### **1. Variation phénotypique/modulation de la virulence**

Lors du développement de milieux sélectifs pour la croissance de *B. pertussis*, il a été montré que cette dernière était capable de changer de phénotype en fonction de la composition du milieu. Le terme de modulation phénotypique ou encore modulation antigénique a alors été proposé pour caractériser ce phénomène. Ainsi, un sérum qui permettait l'agglutination de *B. pertussis* en conditions standards, était incapable d'avoir le même effet lorsque le chlorure de sodium était remplacé par du sulfate de magnésium ou encore lorsque la bactérie était cultivée à de plus basses températures (de l'ordre de 25°C). Pour caractériser ce changement phénotypique, deux modes ont alors été définis. Le mode X (pour xanthique) correspond au mode de virulence où la bactérie produit ses facteurs de virulence et est agglutinée par le sérum, et le mode C (pour cyanique) caractérise l'état d'avirulence où la bactérie est non agglutinable et les facteurs de virulence ne sont pas produits. Ce changement phénotypique est un mécanisme réversible. Ainsi, une bactérie virulente cultivée dans un milieu induisant le changement phénotypique deviendra avirulente et inversement. Un autre mode a également pu être déterminé, il s'agit du mode I (mode intermédiaire) dans lequel la bactérie est agglutinable de façon fortement diminuée (Lacey, 1960; Coote, 1991).

#### **a. Les modulateurs de la virulence**

Des études ont été menées pour caractériser des éléments qui permettent la modulation de la virulence, que nous appellerons des modulateurs. Des modifications de milieu ont été effectuées en remplaçant le chlorure de sodium par différents sels pour déterminer le pouvoir de modulation de chaque ion : pro-virulent (pro-mode X) ou pro-avirulent (pro-mode C) (Fig. 18, Lacey, 1960).

Ainsi, des températures supérieures à 30°C et certains ions, tels que le sodium, le potassium, les halides, le formate ou le nitrate favorisent la croissance ainsi que la virulence bactérienne. De plus basses températures (20-25°C) et d'autres ions comme le magnésium, le sulfate ou les acides mono- et di-carboxyliques à plus de deux atomes de carbone permettent l'avirulence de la bactérie. Le mode I est induit avec des concentrations en ions et températures intermédiaires.

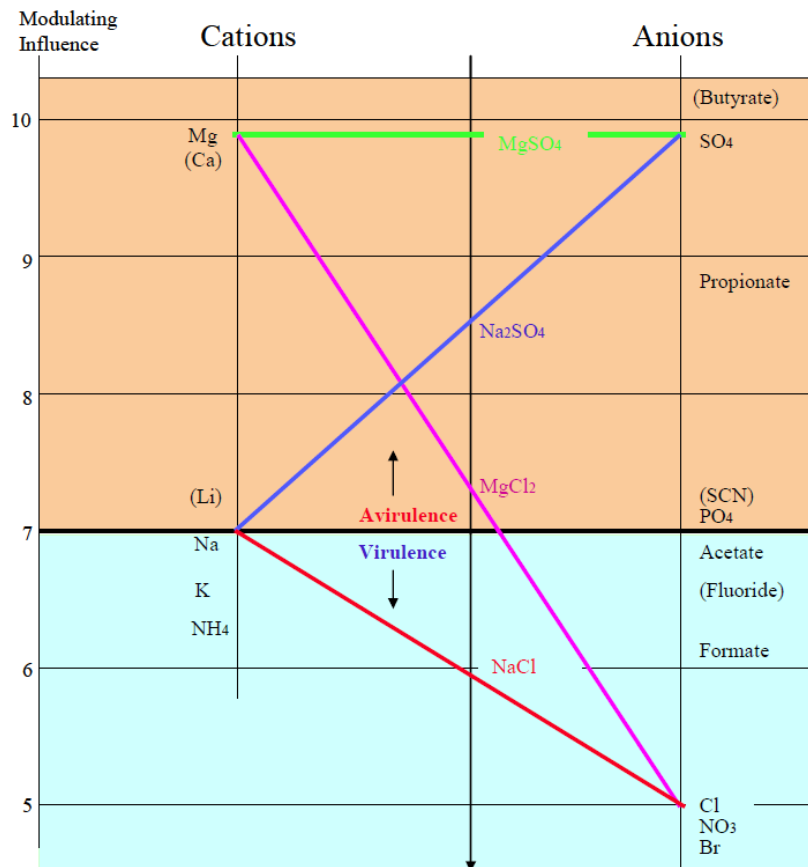


Figure 18 : Diagramme présentant les différents ions impliqués dans le contrôle de la virulence de *B. pertussis*. Le milieu des lignes joignant deux ions de charges opposées présente le sel formé. La position de ce point donne l'influence de modulation du sel. Les positions des ions entre parenthèses sont approximatives. Diagramme réalisé à partir des données de Lacey, 1960.

L'acide nicotinique utilisé en tant que vitamine pour la croissance bactérienne, a été décrit comme étant un modulateur de la virulence. En effet, une augmentation de la concentration de cette molécule de cent fois rend la bactérie avirulente (Pusztai and Joó, 1967).

En 1993, Melton et Weiss ont complété l'étude des modulateurs de *B. pertussis* en s'intéressant plus particulièrement à l'acide nicotinique et à ses dérivés. Ils ont ainsi identifié les propriétés chimiques du nicotinate importantes pour la modulation. Les modulateurs sont majoritairement des dérivés de l'acide nicotinique et de l'acide benzoïque. Une liste non exhaustive des modulateurs de *B. pertussis* est donnée en figure 19. Le groupe carboxyl semble être un élément indispensable pour la modulation, contrairement à l'atome d'azote du cycle. La structure plane du cycle aromatique ainsi que la résonance électronique de ce dernier semble être requis pour la modulation. Les mécanismes de modulation étaient alors restés inconnus, mais il semblait que la capacité de modulation fasse intervenir des interactions de type charge-charge entre les modulateurs et la portion périplasmique de BvgS (Melton and Weiss, 1993) (voir la partie II.B.3.b. pour la description des domaines de BvgS).

### NICOTINIC ACID DERIVATIVES

6-Chloronicotinic acid	0.1	
5-Bromonicotinic acid	1	
2,5 Pyridine dicarboxylic acid	1	
Nicotinic acid	5	
6 Methyl nicotinic acid	5	
6 Amino nicotinic acid	5	
Isonicotinic acid	10	

### BENZOIC ACID DERIVATIVES

4-Nitrobenzoic acid	1	
4-Chlorobenzoic acid	1	
4 Acetyl benzoic acid	5	
m-Anisic acid	5	
Benzoic acid	5	
4 Methyl benzoic acid	5	
p-Anisic acid	10	
<b>OTHER MODULATORS</b>		
Quinaldic acid	1	
Nicotinic acid N oxide	2	
Sulfate ions	10 SO <sub>4</sub>	
Perchlorate ions	10 ClO <sub>4</sub>	
Glutaric acid	10 COOH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	

Figure 19 : Exemples de modulateurs de la virulence de *B. pertussis*. La structure des composés ainsi que leurs concentrations minimales effectrices exprimées en mM sont représentées. Extrait de Melton and Weiss, 1993.

Des études plus approfondies des domaines périplasmiques de BvgS effectuées bien plus tard dans notre laboratoire ont montré que le nicotinate serait perçu par ces domaines senseurs et plus particulièrement par le domaine proximal à la membrane. Une modification du potentiel électrostatique de la cavité de ce domaine perturbe la réponse de BvgS à la modulation (Herrou et al., 2010).

Les différents modulateurs de la virulence de *B. pertussis* recensés jusqu'à ce jour sont efficaces à des concentrations élevées, de l'ordre du millimolaire, remettant ainsi en question leur rôle physiologique dans la pathogénèse. Il semblerait que les ligands naturels de BvgS perçus par la bactérie à l'intérieur de l'hôte n'aient jusqu'à présent pas été découverts. Il a été suggéré que les modulateurs doivent être suffisamment petits pour diffuser à travers les pores de la membrane externe.

#### *b. Sensibilité à la modulation*

Les modulateurs les plus couramment utilisés sont l'acide nicotinique, le sulfate de magnésium ainsi que les basses températures. Des différences au niveau des concentrations nécessaires pour permettre la modulation sont observables entre les différentes souches du complexe *Bronchiseptica* et particulièrement entre *B. pertussis* et *B. bronchiseptica*. La majorité des isolats de *B. pertussis* et des souches de *B. bronchiseptica* deviennent avirulentes lorsqu'elles sont cultivées à 37°C avec 4 mM d'acide nicotinique ou 10 mM de sulfate de magnésium, ou encore à une température inférieure à 26°C. Contrairement à ces souches, la

souche de *B. pertussis* Tohamal, souche de référence au laboratoire, nécessite une plus forte concentration de modulateur, de l'ordre de 16 mM pour l'acide nicotinique et de 40 mM pour le sulfate de magnésium. Pour son passage en phase Bvg<sup>-</sup>, cette dernière requiert une température inférieure à 20°C (Prugnola et al., 1995; Martínez de Tejada et al., 1996). La sensibilité plus faible aux stimuli négatifs de la souche Tohamal comparée aux isolats de *B. pertussis* s'explique par la présence d'une substitution d'un résidu glutamate en un résidu lysine dans la région cytoplasmique de BvgS en amont de la kinase (Herrou et al., 2009). Ainsi, pour notre étude de BvgS et de sa réponse à la modulation, la lysine 705 de la souche Tohamal a été substituée en son résidu originel, le glutamate pour obtenir une sensibilité aux modulateurs plus importante.

Différentes mutations spontanées rendant BvgS insensible à la modulation ont pu être isolées. Certaines de ces mutations ont pu être cartographiées et correspondent à des substitutions non silencieuses dans la région liant le segment membranaire aux domaines cytoplasmiques, particulièrement au niveau du domaine PAS et dans les régions en hélice  $\alpha$  en amont et en aval de ce dernier (Miller et al., 1992; Goyard et al., 1994; Manetti et al., 1994; Uhl and Miller, 1996). Il faut noter que ces mutations sont dominantes sur celles localisées au niveau des domaines périplasmiques et obtenues par de larges délétions ou de petites insertions, qui ont été décrites comme inactivant BvgS (Miller et al., 1992).

## 2. Découverte et caractérisation du système BvgAS

### a. Le locus *bvgAS*

En 1983, les travaux de Weiss et collaborateurs ont permis de mettre en évidence un régulateur commun pour l'expression des facteurs de virulence (Weiss et al., 1983). Des insertions de transposons dans le génome de *B. pertussis* ont été réalisées, différentes souches ont ainsi été produites et dans certaines d'entre elles, l'insertion d'un seul transposon était capable d'abolir la production des facteurs de virulence. Le locus *vir* (qui sera ensuite renommé *bvg*) a ainsi été identifié. Il coderait un produit agissant en *trans* qui serait requis pour l'expression des facteurs de virulence (Weiss and Falkow, 1984). La caractérisation de ce locus a été poursuivie. Ainsi, trois gènes dénommés *bvgA*, *bvgB* et *bvgC* semblaient impliqués dans la régulation de la virulence bactérienne. Des similarités au niveau des séquences en acide aminé ont suggéré que BvgA et BvgC appartenait à une large famille de protéines bactériennes de régulation impliquées dans la transduction de signaux environnementaux (Aricò et al., 1989). Il a ensuite été montré que BvgB et BvgC sont associées pour former une seule et même protéine. Cette dernière est un homologue d'une classe de senseurs-kinases de systèmes à deux composants et sera dénommée BvgS ('S' pour senseur, *bvgS* étant le gène) (Stibitz and Yang, 1991). Cette protéine a été prédite pour être un senseur environnemental qui altérerait la fonction de BvgA suite à la perception d'un stimulus (Roy and Falkow, 1991). Il a également été montré que le locus *bvg* induisait l'expression de deux classes de gènes : les *vag* ('*virulence-activated genes*') et les *vrg* ('*virulence-repressed genes*') (Knapp and Mekalanos, 1988). L'addition de sulfate de magnésium ou l'inactivation de *bvgS* a un effet semblable, laissant penser qu'il y aurait une boucle de rétrocontrôle positif de BvgS sur la transcription du locus *bvg* (Scarlatto et al., 1990). Au niveau du locus *bvg*, le gène *bvgR* pour '*Bordetella virulence genre repression*' a ensuite été identifié (Fig. 20). BvgR



est impliqué dans la répression des gènes *vrg* en condition de virulence (Merkel and Stibitz, 1995). On retrouve également proche du locus *bvg*, les gènes impliqués dans la production de la FHA (Stibitz et al., 1988a, 1988b).

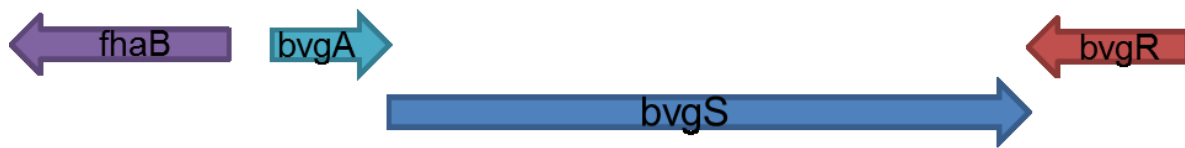


Figure 20 : Représentation schématique du locus *bvgAS* et de son environnement immédiat. *bvgS* est représenté en bleu (code BP1877) et *bvgA* en bleu ciel (BP1878). Les deux gènes flanquant le locus sont *bvgR*, codant pour le répresseur (BP1876) et *fhaB* codant pour la FHA (BP1879).

Le système BvgAS est hautement conservé chez *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* et *B. parapertussis* (Martínez de Tejada et al., 1996), et également parmi des isolats cliniques de *B. pertussis* (Herrou et al., 2009).

### b. *BvgAS* et sa cascade de phosphorylation

Le locus *bvgAS* code pour un système à deux composants impliqué dans la régulation de la virulence de *B. pertussis* (Fig. 21).

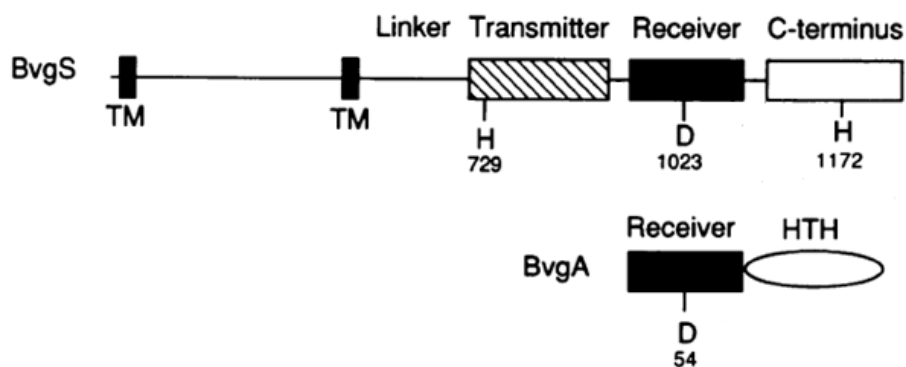


Figure 21 : Représentation schématique de BvgAS. Les résidus impliqués dans la cascade de phosphorylation sont indiqués. Le domaine 'transmitter' correspond à l'histidine-kinase, le domaine 'receiver' au domaine receveur et pour finir le C-terminus correspond au domaine de phosphotransfert (HPt). Le premier segment transmembranaire (TM) est en réalité un peptide signal. Au niveau de BvgA, le domaine receveur ('receiver') et le domaine de liaison à l'ADN (HTH) sont représentés. Adapté de Uhl and Miller, 1996.

BvgA est un régulateur de réponse appartenant à la famille FixJ/NarL (Bantscheff et al., 2000). Il s'agit d'une protéine de 23 kDa qui contient deux domaines, un domaine receveur N-terminal qui porte le site de phosphorylation et un domaine C-terminal présentant un motif de liaison à l'ADN 'helix-turn-helix' de type LuxR (pfam : PF00196, Galperin, 2010). Il a été montré que BvgA forme un dimère en solution grâce à son domaine C-terminal indépendamment de son état de phosphorylation (Beier et al., 1995; Perraud et al., 2000). La phosphorylation du domaine receveur induit un changement de conformation de ce dernier. Ceci permet l'activité de la liaison de BvgA à l'ADN. Les dimères de BvgA phosphorylé se fixent au niveau des promoteurs des gènes cibles de manière coopérative. Une répétition imparfaite en heptade au niveau de la séquence de la boîte -35 a été identifiée comme étant le site primaire de liaison de BvgA phosphorylé (Roy and Falkow, 1991; Boucher et al., 2001). La liaison coopérative à des sites secondaires est hautement dépendante de la liaison au site primaire et mène à la formation d'un complexe ternaire stable BvgA-P-ADN-ARN

polymérase (Jones et al., 2005). Le receveur de BvgA contient les résidus caractéristiques de ces domaines que sont les résidus aspartate (D9, D10 et D54, qui est le résidu phosphorylable) et lysine (K109) conservés (Uhl and Miller, 1996a).

BvgS est une protéine senseur de 134 kDa, intégrée dans la membrane interne. Il s'agit d'une histidine-kinase non orthodoxe et qui est caractérisée par la présence de domaines supplémentaires, receveur et de phosphotransfert (HPt) impliqués dans la signalisation (Bantscheff et al., 2000). La kinase s'auto-phosphoryle sur le résidu histidine 729. Le phosphate est ensuite transféré successivement sur un résidu aspartate (1023) du domaine receveur, puis sur un résidu histidine (1172) du domaine HPt. Ce dernier reconnaît BvgA ce qui permet le transfert du groupement phosphate sur l'aspartate 54 du régulateur de réponse BvgA. Celui-ci sous sa forme phosphorylée va se fixer sur la région promotrice des gènes du régulon et activer leur transcription (Uhl and Miller, 1996a).

Le domaine receveur de BvgS peut agir comme une phosphotransférase en catalysant le transfert du groupement phosphorylé de H729 à H1172 ou agir en tant que phosphatase en catalysant le transfert du groupement phosphorylé du H729 ou H1172 sur son résidu aspartate D1023 pour ensuite subir une auto-hydrolyse et ainsi libérer le phosphate inorganique vers l'eau (Uhl and Miller, 1996b; Cotter and Jones, 2003).

Pour permettre la phosphorylation de BvgA, les trois domaines de BvgS (kinase, receveur et HPt) sont nécessaires, car un transfert direct du groupe phosphorylé de l'histidine 729 de la kinase jusqu'à l'aspartate de BvgA ne peut avoir lieu (Uhl and Miller, 1994). Le domaine HPt est le déterminant essentiel pour la spécificité entre BvgS et BvgA. Contrairement au domaine receveur de BvgS, le domaine HPt ne peut pas être remplacé par un domaine homologue provenant d'un autre senseur-kinase hybride (Beier et al., 1995; Perraud et al., 1998).

BvgS semble être l'unique responsable du niveau de BvgA phosphorylé, étant donné qu'aucune protéine autre que BvgS n'a été trouvée comme influençant le niveau de BvgA phosphorylé (Cotter and Jones, 2003). Il a également été montré que BvgA phosphorylé est le seul élément nécessaire pour l'activation de la transcription des gènes *vag in vitro*. BvgA, en se fixant à l'ADN va interagir avec l'ARN polymérase et initier alors la transcription de ses gènes cibles (Steffen et al., 1996).

### *c. Régulon de BvgAS*

BvgAS contrôle l'expression de plus de 100 gènes qui participent à une grande variété d'activités cellulaires, y compris de nombreuses fonctions physiologiques de base (Jones et al., 2005).

Les facteurs contrôlés par BvgAS peuvent être classés en au moins 4 catégories en fonction de leur profil d'expression et de la cinétique d'induction de leur transcription (Fig. 22) (Beier and Gross, 2006).

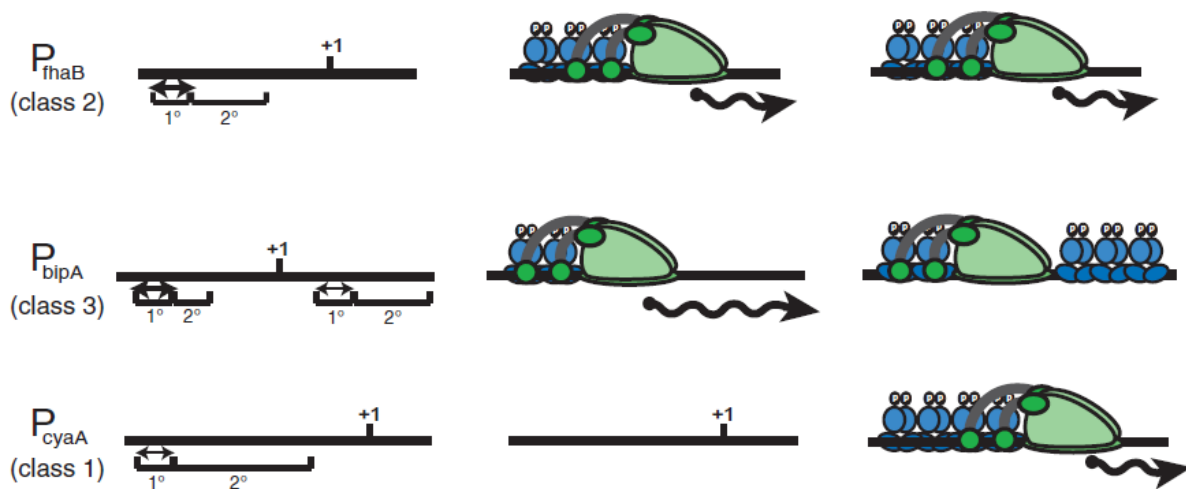
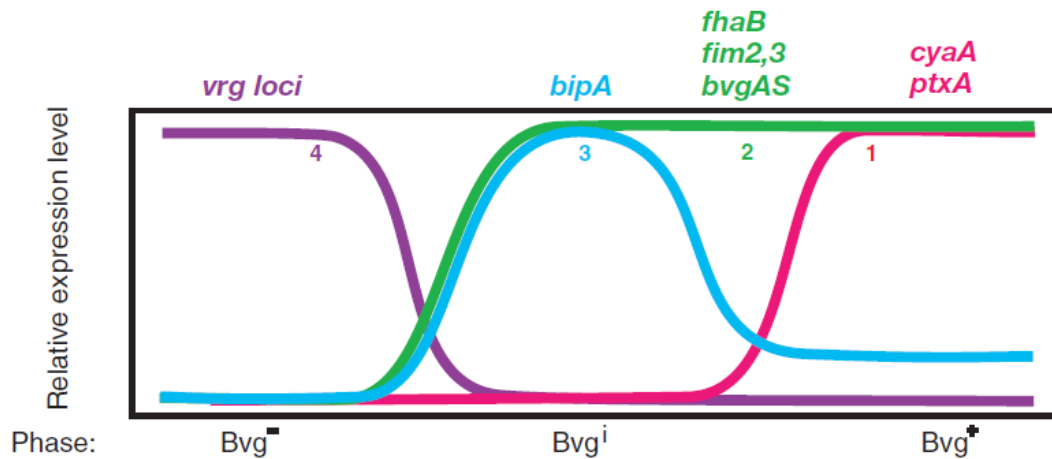


Figure 22 : Le régulon de BvgAS. A. Représentation schématique des niveaux d'expression relatifs des gènes exprimés durant les différentes phases de virulence. B. Représentation schématique des promoteurs des gènes de classe 1, 2 et 3. Les sites de fixation primaire et secondaire de BvgA phosphorylé sont représentés respectivement par 1° et 2°. La double flèche épaisse indique un site de haute affinité tandis qu'un site de faible affinité est représenté par une double flèche plus fine. BvgA phosphorylé est représenté en bleu tandis que le vert est utilisé pour l'ARN polymérase. Le +1 correspond au site de démarrage de la transcription. Extrait de Jones et al., 2005.

1) *Classe 1*

Dans cette classe on peut retrouver les gènes codant pour différentes toxines comme la toxine pertussique et l'adénylate cyclase/hémolysine. L'expression de ces gènes nécessite une forte concentration de BvgA phosphorylé qui interagit avec des sites de fixation de BvgA de basse affinité (Beier and Gross, 2006). Ces gènes sont également dénommés 'tardifs' puisqu'étant exprimés plusieurs heures après l'entrée en phase de virulence (Jones et al., 2005).

2) *Classe 2*

Il s'agit de gènes codant pour des adhésines telles que la FHA et les fimbriae mais également le locus du système BvgAS lui-même. Des sites de fixation de BvgA de haute affinité sont retrouvés dans les promoteurs de ces gènes. Ainsi, une faible concentration de BvgA phosphorylé est nécessaire et suffisante pour l'activation de ces promoteurs (Beier and Gross, 2006). Les gènes appartenant à cette classe sont alors dénommés 'précoces' étant donné que leur expression est induite rapidement lors de l'entrée en phase de virulence (Jones et al., 2005).

### 3) Classe 3

Il s'agit des gènes exprimés lors de la phase intermédiaire de virulence de *B. pertussis*. Dans les promoteurs de ces gènes, des sites de haute et de basse affinité de BvgA phosphorylé sont observables. Une faible quantité de BvgA phosphorylé va permettre l'occupation des sites de haute affinité. Les gènes de cette classe seront alors exprimés. Si la concentration en BvgA phosphorylé augmente, les sites de basse affinité seront également occupés. La fixation de BvgA phosphorylé à ces sites va réduire de manière considérable l'expression de ces gènes, effet observable lors de la phase Bvg<sup>+</sup> (Jones et al., 2005). Citons *bipA* comme représentant majeur de cette classe. Il s'agit d'une protéine homologue à l'intimine des souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques. BipA semble être impliqué dans la formation de biofilms et est exprimé dans les poumons de souris après une inoculation intranasale. Il a également été montré la production d'anticorps anti-BipA chez l'homme, après infection. BipA est fortement exprimé dans les biofilms et présente des propriétés immunogéniques, ce qui en fait un antigène potentiel pour la formulation de vaccins acellulaires (Deora, 2002; Gouw et al., 2014).

### 4) Classe 4

Cette classe est caractéristique des gènes *virg*. BvgA phosphorylé permet l'expression de BvgR, qui joue un rôle essentiel dans la répression de la transcription des gènes *virg*. Ainsi, en absence de BvgA phosphorylé, les gènes *virg* seront exprimés. Le régulon des *virg* semble être composé d'au moins 22 protéines (déterminées par électrophorèse bidimensionnelle) (Bock and Gross, 2001). Les *virg* codent pour des protéines sécrétées ou de la membrane externe dont la fonction reste inconnue (Cotter and Jones, 2003).

## d. Les différentes phases de virulence

Trois phases distinctes de virulence ont été déterminées, chacune étant définie par son niveau d'expression des gènes des quatre classes précédemment décrites. Ainsi, pour permettre l'établissement de ces différentes phases, BvgAS doit contrôler sa concentration intracellulaire de BvgA phosphorylé (Jones et al., 2005).

### 1) La phase Bvg<sup>+</sup>

Il s'agit de la phase de virulence de la bactérie. Elle est caractérisée par l'expression des gènes *vag* de classe 1 et 2 codant les facteurs de virulence, et la répression des gènes de classe 3 et des *virg* (Cotter and Jones, 2003; Jones et al., 2005). Cette phase est observable en conditions non modulantes, à une température de 37°C, qui correspond à la température du tractus respiratoire humain (Bock and Gross, 2001; Decker et al., 2012). Notons que dans nos conditions de laboratoire à 37°C, la bactérie est en phase Bvg<sup>+</sup>. Des expériences faisant intervenir des mutants bloqués en phase Bvg<sup>+</sup> ont permis de mettre en évidence que cette dernière est nécessaire et suffisante pour l'infection respiratoire (Cotter and Jones, 2003).

### 2) La phase Bvg<sup>i</sup>

La phase intermédiaire est obtenue lorsque la bactérie est cultivée à des concentrations intermédiaires de modulateur ou à des températures intermédiaires à celles permettant les phases Bvg<sup>+</sup> ou Bvg<sup>-</sup>. Durant cette phase il y aura expression des gènes de classe 2 comme ceux codant pour la FHA ou encore BvgAS, et des gènes de classe 3, dont *bipA* est le représentant. Les gènes codant pour les toxines ou les *virg* ne seront quant à eux pas exprimés

(Cotter and Jones, 2003; Jones et al., 2005). Il a été proposé que la phase Bvg<sup>i</sup> soit impliquée dans la transmission de la bactérie vers un nouvel organisme. En effet, de légères différences en température sont observables au niveau des différents compartiments colonisés par la bactérie tels que le nasopharynx et les tissus plus profonds du tractus respiratoire. Ainsi, dans la cavité nasale, où la température est plus faible (de l'ordre de 30 °C, Vergara-Irigaray et al., 2005), le passage en phase Bvg<sup>i</sup> permettrait la production des facteurs nécessaires pour la transmission par aérosols (Bock and Gross, 2001; Decker et al., 2012). Les analyses de séra d'un enfant guéri de la coqueluche ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre certains facteurs exprimés en phase Bvg<sup>i</sup>. Ces données suggèrent que la phase Bvg<sup>i</sup> de *B. pertussis* serait exprimée *in vivo* (Martinez De Tejada et al., 1998).

### 3) La phase Bvg<sup>-</sup>

Il s'agit de la phase d'avirulence de la bactérie, qui est obtenue en conditions de modulation c'est-à-dire à basses températures (inférieure à 25°C) ou en présence de nicotinate (concentration  $\geq 10$  mM) ou de sulfate de magnésium ( $\geq 40$  mM) ou lorsque *bvgAS* est inactivé à l'aide de mutations (Cotter and Dirita, 2000). Cette phase est caractérisée par l'expression des gènes *vrg* et l'absence de production des différents facteurs de virulence (Jones et al., 2005). Le rôle de la phase Bvg<sup>-</sup> chez *B. pertussis* reste à déterminer, mais il semblerait que cette dernière ne soit pas requise lors d'infection de modèles animaux (Martinez De Tejada et al., 1998). Chez *B. bronchiseptica*, la phase Bvg<sup>-</sup> est impliquée dans la survie en conditions de carence nutritive extrême et donc dans la survie dans l'environnement (Cotter and Miller, 1994). Etant donné que *B. pertussis* ne peut survivre dans l'environnement dû à la perte de l'expression d'un grand nombre de gènes *vrg* comme ceux du flagelle ou de gènes de métabolisme, la phase Bvg<sup>-</sup> pourrait ne plus se produire pour *B. pertussis*, ou alternativement avoir lieu à l'intérieur de son hôte dans une niche spécifique. Ainsi, cette phase pourrait permettre à la bactérie d'échapper aux anticorps primaires dirigés contre des facteurs de virulence, de tempérer les dommages infligés aux tissus de l'hôte en diminuant la production des toxines ou de favoriser la transmission vers un nouvel hôte grâce à la diminution de l'expression des adhésines (Martinez De Tejada et al., 1998). De plus, des expériences d'infection cellulaire suggèrent que la phase Bvg<sup>-</sup> de *B. pertussis* jouerait un rôle dans la survie intracellulaire (Masure, 1992). Cette phase pourrait aussi être utile dans les phases tardives de l'infection et pourrait contribuer à induire des infections persistantes qui sont généralement observées avec *B. bronchiseptica* (Bock and Gross, 2001). Alternativement, il se pourrait que cette phase ne soit en fait qu'un vestige de l'évolution à partir d'un ancêtre environnemental (Decker et al., 2012). Toutefois, il semblerait que le système BvgAS de *B. pertussis* subisse une pression de sélection afin que ce dernier reste sensible à la modulation (Herrou et al., 2009). Ceci souligne donc l'importance pour la bactérie de pouvoir adopter ces différentes phases de virulence.

### 3. Le senseur-kinase BvgS

Les systèmes à deux composants sont généralement assimilés à des systèmes d'interrupteur, passant d'un état d'activité à un état inactif. BvgS quant à lui semble différer de ces systèmes, et agirait plutôt comme un rhéostat pour réguler la virulence de la bactérie.

### a. Un Rhéostat plutôt qu'un interrupteur

BvgAS est capable d'induire trois états d'activation, avec la capacité pour chacun de contrôler l'expression d'un ensemble de gènes, définissant ainsi trois phases phénotypiques. La capacité de contrôler un ensemble de phases phénotypiques semble jouer un rôle primordial dans le cycle infectieux de *Bordetella*. L'activité de BvgAS varie de manière incrémentale en réponse à l'intensité des signaux perçus. L'expression des gènes régulés par Bvg requiert un niveau seuil de BvgA phosphorylé pour l'activation ou la répression (Cotter and Jones, 2003).

Il a été proposé que les systèmes non orthodoxes, de par leur organisation, présentent une sensibilité accrue aux stimuli externes mais soient plus robustes, donc moins sensibles aux fluctuations des stimuli comparé aux systèmes à deux composants orthodoxes. Ainsi, la courbe de réponse des systèmes hybrides présente une allure sigmoïde, avec une réponse plus lente au début de la stimulation comparé aux systèmes classiques qui sont caractérisés par une courbe hyperbolique (Fig. 23). Les systèmes hybrides seraient également plus robustes au bruit. En effet, ils seraient sensibles à la durée et à l'intensité d'un stimulus. Ils ignorent alors les stimulations de courte durée (Kim and Cho, 2006).

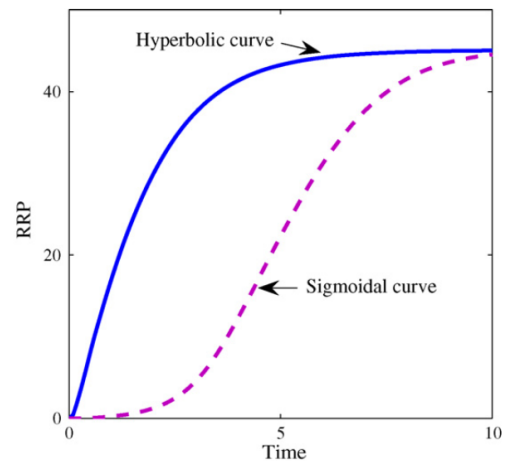


Figure 23 : Comparaison des courbes de réponses d'un système à deux composants orthodoxe (courbe hyperbolique) et d'un système non orthodoxe (courbe sigmoïde) suite à la perception d'un stimulus d'intensité suffisante et de durée constante. L'échelle de temps est relative et RRP représente la quantité de régulateur de réponse phosphorylé. Extrait de Kim and Cho, 2006.

### b. Architecture de BvgS

BvgS est sous forme dimérique et est constitué de plusieurs domaines reliés par différents connecteurs (ou 'linkers') (Fig. 24). Dans sa portion périplasmique, deux domaines appelés VFT pour 'Venus FlyTrap' sont retrouvés. Les dernières hélices  $\alpha$  périplasmiques qui suivent le deuxième domaine VFT, s'étendent à travers la membrane jusqu'au domaine PAS (Per/Arnt/Sim). Ce dernier est relié à l'histidine-kinase grâce à de longues hélices  $\alpha$ . Faisant suite au domaine enzymatique, les domaines receveur et de phosphotransfert sont impliqués dans la cascade de phosphorylation.

Des analyses de séquences provenant de divers isolats de *Bordetella* ont permis de mettre en évidence une remarquable conservation des connecteurs prédits pour être organisés en hélice  $\alpha$ , entre les domaines périplasmiques et le domaine PAS et entre ce dernier et la kinase, suggérant un rôle mécanique dans la transduction d'information entre les domaines périplasmiques jusqu'à la kinase, grâce à des changements de conformation. Les connecteurs retrouvés entre la kinase et les deux autres domaines impliqués dans la cascade de phosphorylation sont quant à eux très peu conservés en séquence, et prédits pour être non structurés. La cascade de phosphorylation entre ces domaines serait effectuée par des interactions directes protéine-protéine, les linkers permettant d'assurer la proximité spatiale entre les domaines (Herrou et al., 2009).

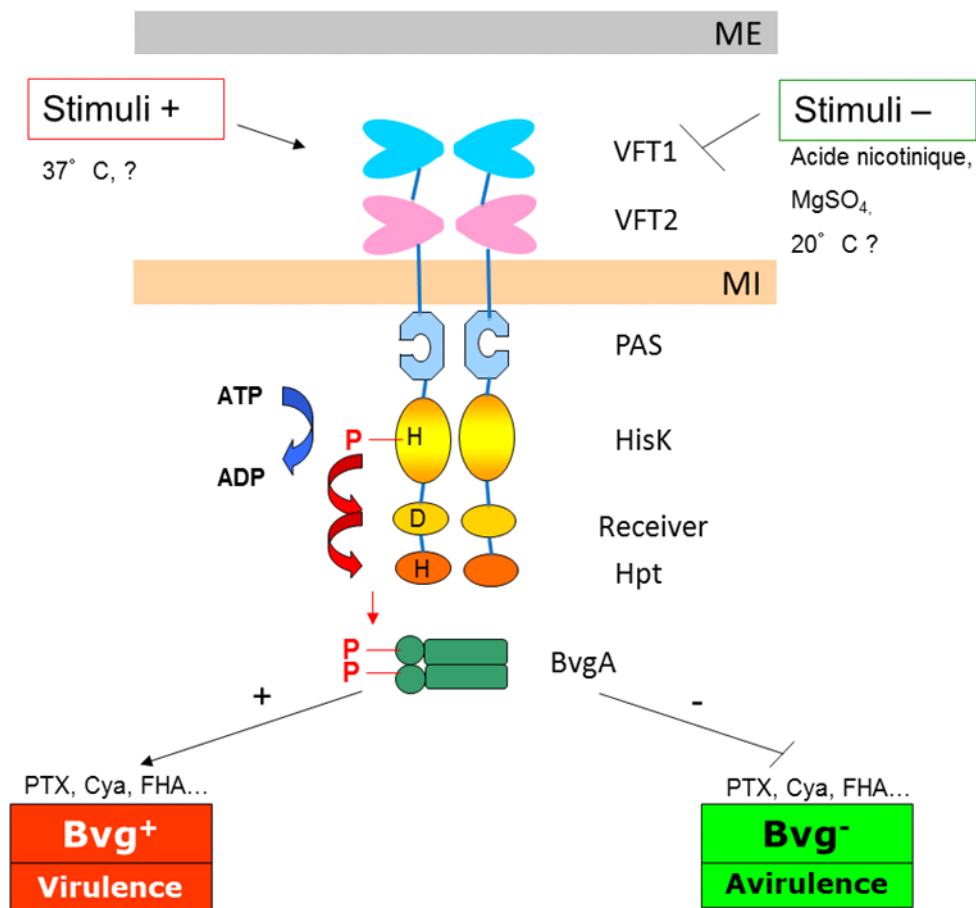


Figure 24 : Représentation schématique du senseur-kinase BvgS de *Bordetella pertussis*. BvgS est composé de deux domaines de perception périplasmiques (VFT1 et VFT2), d'un domaine PAS, d'une histidine-kinase (HisK), d'un domaine receveur, d'un domaine de phosphotransfert (HPt). Les domaines kinase, receveur et de phosphotransfert sont impliqués dans la cascade de phosphorylation jusqu'à BvgA, le régulateur de réponse. Les phases de virulence et d'avirulence sont représentées sur le schéma. Notons qu'une phase intermédiaire Bvg<sup>i</sup> est également décrite pour caractériser l'activité de BvgS. ME et MI correspondent respectivement à la membrane externe et à la membrane interne.



Ci-dessous est illustrée la séquence protéique de BvgS (Fig. 25).

```

1      10      20      30
MPAPHRLYPRSLICLAQALLAWALLAWAPAQA
33      40      50      60      70      80      90      100
SQELTLVGKAAVPDVEVALDGDDDWRRLARKRVLTLGVYAPDIPFFDVTYGERYEGLTADYMAITAHNLGMOAKVLE
110     120     130     140     150     160     170     180
RYPTREQALSALESQGLDLDIGTVNGTDGRQOSLRSLVVPYAADHPVIVMPTIGARHVPASMLAGQRLAVDINYLPKE
190     200     210     220     230     240     250
TLARAYPOATLHYFESSEQALAAVAYGOADVFIGDALITSHLVSOSYFNOVRVVAPAHIATGGESFGVRADNTRL
260     270     280     290     300     310     320     330
LRVVNAVLEAIFPSEHRSLIYRWGLGSSISLDFAHPAYSAREQQWMADHPVVKVAVLNLFAPFTLFRTDEQFGGI
340     350     360     370     380     390     400
SAAVLQLQLRTGLDFEIIGVDTVEELIAKLRSGEADMAGALFVNSARESFLSFSRPYVRNGMVIVTRODPDAPV
410     420     430     440     450     460     470     480
DADHLDGRTVALVRNSAAIPLLORRYPOAKVVTADNPSEAMLMVANGOADAVVQTOISASYVVNRYFAGKLRIAS
490     500     510     520     530     540
ALDLPPAEIALATTRGTELMSILNKALYSISNDELASIISRWRGSDGDPRTWYAYRNE
542     550     560
IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL
564     570     580     590     600     610     620     630
RRQIRQRKRAERALNDQLEFMRVLIDGTPNPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPEANVVGDPAL
640     650     660     670     680     690     700     710
AREMHEFLLTRVAAEREPRFEDRDVTLHGTRHRVYQWTIPYGDSLGELKGIIGGWIDITERAELLRKLHDAKESA
720     730     740     750     760     770     780
DAANRAKTTFLATMSHEIRTPMNAIIGMLELALLRPTDQEPDRQSIQVAYDSARSLELIGDILDIAKIEAGKFI
790     800     810     820     830     840     850     860
LAPVRTALRVLPEGAIRVFDGLARQKGIELVLKTDIVGVDDVLDPLRMKQVLSNLVGNAIKFTTEGOVVLAVTA
870     880     890     900     910     920     930
RPDGDAAHVQFVSDTGCGISEADORQLFKPFSQVGGSAEAGPAPGTGLGLSISRRLVELMGGTLVMRSAPGVGT
940     950     960     970     980     990     1000     1010
TVSVDLRLITMVEKSVQAAPPAAATAATPSKPQVSLRVLVVDDHKPNIMLLRQQLDYLGQRVIAADSGEAALALWR
1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
EHAFDVVITDCNMPGISGYELARRIRAAEAAPGYGRTRCILFGFTASAQMDEAQRCRAAGMDDCLFKPIGVDALR
1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160
ORLNEAVARAALPTPPSPQAAAPATDDATPTAFSAESILALTONDEALIROLLEEVIRTNRADVDOLQKLHQQAD
1170     1180     1200     1210     1220     1230     1240
WPKVSDMAHRLAGGARVVDAKAMIDTVLALEKKAQGQAGPSPEIDGLVRTLAAQSAALETQLRAWLEQRPHQDQP

```

Figure 25 : Représentation de la séquence protéique de BvgS issue de la souche Tohamal en code à une lettre. Le peptide signal (résidus 1 à 32) est en lettres orange. La portion périplasmique (résidus 33 à 541) est en lettres rouges, le domaine VFT1 est surligné en bleu (54 à 280) et le domaine VFT2 est surligné en bleu cyan (308 à 526). Le segment transmembranaire (résidus 542 à 563) est en lettres vertes. La portion cytoplasmique (résidus 564 à 1248) est en lettres noires, avec un domaine PAS surligné en jaune (592 à 697), les domaines de l'histidine-kinase en rouge (723 à 946), le domaine receveur en vert (976 à 1092), le domaine HPT en rose (1140 à 1241). Le résidu K705 induisant une moindre sensibilité est en lettre rouge et les résidus impliqués dans la cascade de phosphorylation (H729, R1023 et H1173) sont soulignés. Extrait de Dupré E, Thèse de doctorat, 2013.

Dans notre étude, nous nous intéresserons à la transduction d'information au sein de BvgS et plus particulièrement à celle s'effectuant entre les domaines périplasmiques et la kinase de BvgS. Ainsi, les domaines receveur et de phosphotransfert ne seront pas étudiés puisqu'étant impliqués uniquement dans le phospho-relais et non dans la transduction des différents stimuli pouvant être perçus au niveau des domaines périplasmiques.



### III. Les domaines ‘Venus FlyTrap’

Les domaines Venus FlyTrap (VFT) sont des protéines périplasmiques de liaison de soluté (PBP, de l’anglais ‘periplasmic solute-binding proteins’), qui fixent spécifiquement certains nutriments en vue de leur importation. Ces modules sont également retrouvés dans de nombreuses protéines impliquées dans la transduction de signal, et interviennent dans des interactions ligand-protéine ou protéine-protéine. Retrouvés dans les différents règnes du vivant, ils peuvent avoir des rôles variés tels que la liaison et le transport de solutés, la transduction de signaux ou encore la régulation transcriptionnelle (Tam and Saier, 1993; Felder et al., 1999).

Une grande diversité de séquence est retrouvée au sein de la superfamille des VFT, mais leur repliement structural général est conservé. Les VFT sont composés de deux lobes globulaires présentant un repliement d’hélices  $\alpha$  et de brins  $\beta$  et séparés par une charnière définissant ainsi une cavité pour la fixation d’un ligand. Ces domaines peuvent adopter deux conformations préférentielles, définies comme ouverte ou fermée. En absence de ligand, la forme ouverte est prédominante. La fixation d’un soluté dans la cavité tend à stabiliser la conformation fermée du domaine (Trakhanov et al., 2005; Kandt et al., 2006; Borrok et al., 2009). Des mouvements de ‘respiration’ permettent le passage entre ces deux conformations (Quioco and Ledvina, 1996; Dwyer and Hellinga, 2004).

Ainsi, les VFT doivent leur nom au mouvement relatif de leurs lobes suite à la fixation d’un ligand, qui rappelle la capture d’une proie par une plante carnivore, la Dionée (Venus Flytrap en anglais, pour Vénus piège à mouches, Fig. 26). Le terme ‘Pac-man’ a également été utilisé pour caractériser le mouvement de ces domaines (Quioco and Ledvina, 1996).



Figure 26 : Pièges d'une dionée en conformation ouverte et fermée.

Les protéines périplasmiques de liaison de soluté sont spécifiques des bactéries à Gram négatif, puisqu’elles résident dans le périplasme. De telles protéines sont également retrouvées chez les bactéries à Gram positif, où elles sont alors extracellulaires et présentent un ancrage lipoprotéique (Felder et al., 1999).

#### A. Classification

##### 1. Classification fonctionnelle

Les domaines VFT permettent la fixation d’une grande variété de ligands tels que les carbohydrates, les acides aminés, les anions, les ions métalliques, les dipeptides ou encore les oligopeptides. Ainsi, Tam et Saier proposèrent une classification basée sur la similarité de séquence, le poids moléculaire et la spécificité de liaison de soluté. Les domaines de liaison périplasmiques ont alors été répartis en 8 groupes (Tam and Saier, 1993) :

1 : oligosaccharides, le glycérol-3-phosphate et le fer

- 2 : pentoses et hexoses
- 3 : acides aminés polaires et opines
- 4 : acides aminés aliphatiques et hydrophobiques
- 5 : peptides et nickel
- 6 : anions inorganiques multivalent
- 8 : complexe ferreux organique et vitamine B12

Un neuvième groupe a ensuite été rajouté à cette classification correspondant aux VFT liant le manganèse et le zinc (Chu and Vogel, 2011).

Cette classification suggère que la séquence et la structure de ces protéines est importante pour la liaison d'un soluté particulier (Tam and Saier, 1993). Ainsi, une seconde classification a ensuite été proposée, se basant davantage sur la structuration du domaine.

## 2. Classification structurale

La classification de Quioco et Ledvina est basée sur la structure des VFT et en particulier en fonction de la distribution de la chaîne polypeptidique entre les deux domaines (Quioco and Ledvina, 1996). Trois classes de VFT ont pu être définies en fonction de leur repliement (classification de SCOP). Ainsi, la classe 1 regroupe les VFT qui présentent une charnière à trois passages pour connecter les deux lobes. La classe 2 est caractérisée par une charnière composée de deux segments, et la classe 3 présente une longue hélice  $\alpha$  comme charnière (Ho et al., 2007).

### a. VFT de classe 1

Chaque lobe du VFT présente un feuillet  $\beta$  parallèle comprenant 6 brins dans l'ordre 213456 (Fig. 27). Les domaines sont reliés entre eux par une charnière composée de trois segments de connexion non structurés. Le lobe 1 porte le N terminus de la protéine tandis que le lobe 2 contient son C terminus. Chaque domaine est composé de deux segments séparés provenant de la première et deuxième moitié de la chaîne polypeptidique (Quioco and Ledvina, 1996; Fukami-kobayashi et al., 1999; Shi et al., 2009).

La protéine liant la leucine, l'isoleucine et la valine (LIVBP) et la protéine liant la leucine (LBP) sont des exemples de protéines appartenant à cette classe (Berntsson et al., 2010).

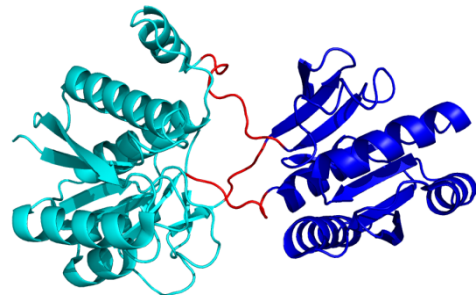


Figure 27 : Représentation de la protéine périplasmique de liaison de la leucine d'*E. coli* (LBP pour 'leucine binding proteïne', code PDB 2lbp). Le lobe 1 est coloré en bleu ciel, le lobe 2 en bleu foncé et la charnière en rouge.

### *b. VFT de classe 2*

Chaque lobe présente un feuillet  $\beta$  composé de 5 brins (ordre 21354, Fig. 28). Le brin  $\beta_5$  est antiparallèle aux autres. La charnière est composée de deux segments pouvant être structurés (brins  $\beta$ ) ou dépourvus de structure secondaire. Des exemples de protéines appartenant à cette classe peuvent être cités : la protéine liant l'histidine (HisJ) ou encore celle liant des oligopeptides (OppA) (Shi et al., 2009; Berntsson et al., 2010). Notons que les domaines VFT de BvgS font également partie de cette classe de VFT.

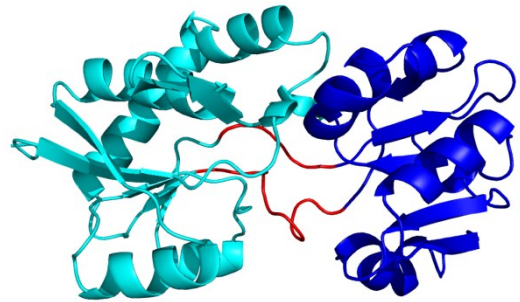


Figure 28 : Représentation de la protéine périplasmique de liaison de l'histidine, HisJ d'*E. coli* (code PDB 2m8c). Le lobe 1 est coloré en bleu ciel, le lobe 2 en bleu foncé et la charnière en rouge.

### *c. VFT de classe 3*

Les protéines de cette classe sont caractérisées par une charnière constituée d'une hélice  $\alpha$  (Fig. 29). Chaque lobe est constitué d'un feuillet  $\beta$  central entouré d'hélices  $\alpha$  et est donc formé uniquement par la portion N- ou C-terminale de la chaîne polypeptidique (Chu and Vogel, 2011).

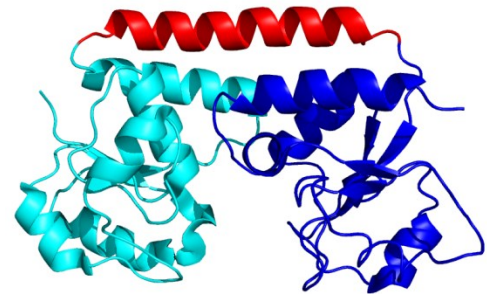


Figure 29 : Représentation de la protéine périplasmique de liaison de la vitamine B12, BtuF d'*E. coli* (code PDB 1n4d). Le lobe 1 est coloré en bleu ciel, le lobe 2 en bleu foncé et la charnière en rouge.

Des exemples de protéines appartenant à cette classe sont celles liant la vitamine B12 (BtuF) ou encore des ions zinc (TroA) (Shi et al., 2009; Berntsson et al., 2010).

## **B. Rôles des domaines VFT**

Les VFT sont impliqués dans une grande variété de processus fondamentaux tels que le transport de solutés, la chimiotaxie et le quorum sensing. Il a également été suggéré que ces domaines pouvaient servir de chaperon dans la restructuration de protéines dénaturées. Les domaines VFT sont retrouvés chez les bactéries au niveau de protéines intra- et extracytoplasmiques, mais également chez les eucaryotes, où ils constituent divers récepteurs souvent extracytoplasmiques (Kandt et al., 2006; Borrok et al., 2009).

Dans cette partie, nous illustrerons les différentes implications des domaines VFT par quelques exemples.

### **1. Fixation de ligand**

La fixation d'un ligand dans la cavité du domaine VFT est un prérequis essentiel pour permettre l'élaboration d'une réponse cellulaire en aval, tel que le transport ou la signalisation (Quiocho and Ledvina, 1996; Sobolevsky et al., 2009).

L'obtention de diverses structures cristallographiques des VFT fixant ou non un ligand a permis de déterminer les mécanismes impliqués dans la fixation de soluté. Les domaines VFT sont retrouvés dans deux conformations préférentielles, ouverte sans ligand et fermée suite à

la fixation d'un ligand. Des mouvements d'ouverture, de fermeture, de torsion-flexion autour de la charnière sont observés pour permettre le passage d'une forme à une autre (Marvin and Hellinga, 2001; Chu et al., 2014). La reconnaissance du ligand se fait tout d'abord au niveau d'un seul lobe grâce à certains résidus spécifiques, et le mouvement du second lobe permet ensuite la fermeture de la cavité. Cette conformation est stabilisée grâce à des interactions entre le ligand et le second lobe du VFT (Oh et al., 1993; Trakhanov et al., 2005). Des études ont permis de déterminer les résidus impliqués dans la fixation de soluté. Ces derniers ont été ciblés dans le but de changer l'affinité du VFT pour son ligand naturel et dans certains cas permettre la fixation d'un autre ligand (Dwyer and Hellinga, 2004).

## 2. Les VFT et leur rôle dans le transport de molécules

La plupart des domaines VFT participent au transport de soluté vers le cytoplasme grâce à trois types de transporteurs : ABC, TRAP et TTT. Ils lient une grande variété de molécules et en particulier des nutriments tels que des carbohydrates, acides aminés, vitamines et ions (Borrok et al., 2009). Après la fixation du soluté, un changement de conformation du domaine VFT s'opère, lui permettant de reconnaître spécifiquement le transporteur membranaire qui lui est associé pour permettre la translocation du soluté dans le cytoplasme.

### a. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (pour 'ATP-binding cassette') sont impliqués dans l'importation ou l'exportation de molécules variées chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, suivant un même mécanisme (Tam and Saier, 1993). Ils partagent une même architecture constituée de deux domaines ABC qui fixent et hydrolysent l'ATP pour permettre le transport de substrat de manière unidirectionnelle à travers la membrane cytoplasmique. Seuls les systèmes ABC d'importation comportent aussi une protéine VFT dans le compartiment extracytoplasmique.

La reconnaissance entre le domaine VFT portant le soluté et le récepteur membranaire serait permise par des interactions charges-charges s'effectuant entre les résidus acides exposés à la surface du domaine VFT et les résidus basiques retrouvés sur la face périplasmique du domaine transmembranaire du transporteur (Chu and Vogel, 2011).

Nous citons comme exemple celui du système BtuCDF impliqué dans l'importation de la vitamine B12 (Fig. 30). BtuF, la protéine périplasmique de liaison va suite à la fixation de la vitamine B12 interagir avec son partenaire transmembranaire, BtuC. Cette fixation induit un changement de conformation, permettant à BtuD d'hydrolyser l'ATP nécessaire à l'ouverture du canal et à l'importation du soluté dans le cytoplasme (Locher, 2004).

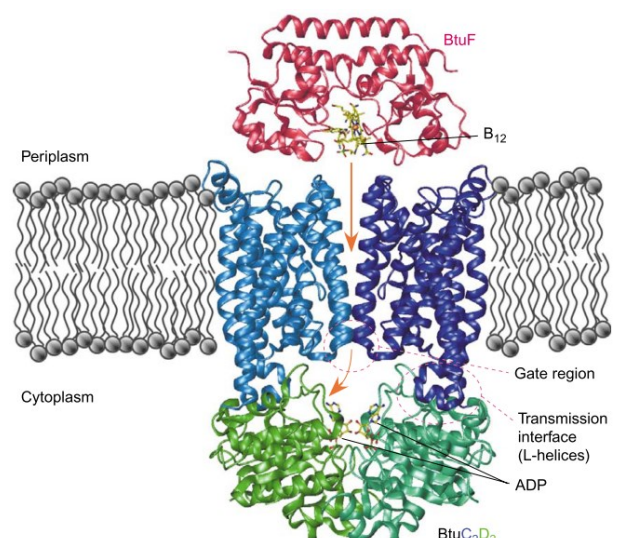


Figure 30 : Organisation du système BtuCDF impliqué dans l'importation de vitamine B12. Extrait de Locher, 2004.



### b. Les transporteurs TRAP

Les transporteurs TRAP (pour ‘tripartite ATP-independent periplasmic transporter’) sont composés d’une protéine VFT et de deux protéines de membrane interne distinctes et de tailles différentes. Dans certains cas les composants de la membrane peuvent être fusionnés en une seule protéine membranaire. Le transporteur d’ions dicarboxylates C4 présent chez *Rhodobacter capsulatus*, DctPQM est un exemple de système TRAP. Contrairement aux transporteurs ABC qui nécessitent l’hydrolyse de l’ATP pour l’incorporation du soluté, les domaines TRAP utilisent un gradient électrochimique d’ions (Kelly and Thomas, 2001). Ainsi, ces transporteurs sont dépendants d’un contre-ion qui est généralement le  $\text{Na}^+$  ou le  $\text{H}^+$ .

Après la fixation du soluté, le domaine VFT interagit avec la portion membranaire du transporteur pour permettre le transport unidirectionnel du soluté à travers la membrane (Fig. 31). La nature des interactions s’effectuant entre le domaine VFT et les domaines membranaires n’a pas encore été déterminée (Mulligan et al., 2011).

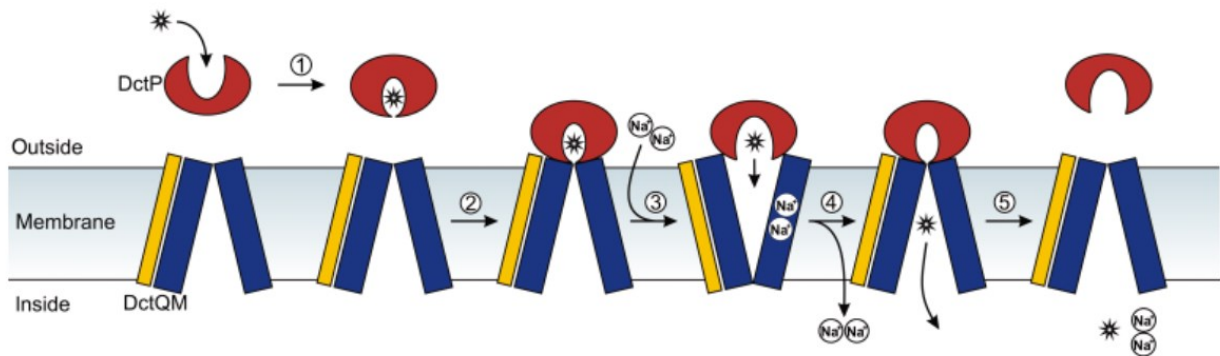


Figure 31 : Représentation schématique de l’incorporation d’un soluté par un transporteur de type TRAP. 1. Le domaine VFT fixe un ligand favorisant sa fermeture. 2. Interaction du domaine VFT avec DctQM. 3. La fixation et/ou la translocation de deux ions de  $\text{Na}^+$  induit un changement de conformation de DctM favorisant l’ouverture du domaine VFT et la libération du soluté. 4. Les deux ions  $\text{Na}^+$  ainsi que le soluté sont libérés dans le cytoplasme. 5. Le VFT se décroche et est capable de fixer un nouveau soluté en vue de son incorporation. Extrait de Mulligan et al., 2011.

### c. Les transporteurs TTT

Les transporteurs TTT (pour ‘tripartite tricarboxylate transporter’) sont constitués de trois partenaires : un récepteur de liaison de soluté périplasmique (VFT) et deux protéines membranaires de taille différentes, l’une hautement conservée et l’autre faiblement. L’organisation des transporteurs TTT est semblable à celle retrouvée pour les domaines TRAP. Comme les domaines TTT et TRAP ne présentent aucune similarité de séquence, ils ont été classés en deux familles distinctes. Contrairement aux transporteurs TRAP qui ont été très bien décrits, peu d’information sont disponibles pour les transporteurs TTT.

Nous pouvons citer comme exemple, celui du système TctABC de *S. typhimurium*, où TctA correspond à la grosse protéine membranaire, TctB à la petite, et TctC est impliqué dans la fixation de tricarboxylate (Winnen et al., 2003).

### 3. VFT impliqués dans la régulation transcriptionnelle

Il a été montré que les protéines périplasmiques liant les sucres sont structurellement et évolutivement liées à une large classe de protéines bactériennes cytoplasmiques se liant à l'ADN grâce à un motif hélice-coude-hélice (HTH pour 'helix-turn-helix') (Tam and Saier, 1993). Ces protéines impliquées dans la régulation de la transcription présentent un motif N-terminal de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison de ligand de type VFT (Fig. 32, Fukami-Kobayashi et al., 2003).

Ces VFT jouant un rôle dans la régulation de la transcription appartiennent à la famille LacI/GalR. De petits métabolites modulent l'association de la protéine à des sites spécifiques de l'ADN pour réguler la transcription. Ainsi, la liaison du ligand effecteur au domaine VFT va soit augmenter (répression) ou diminuer (induction) l'affinité du domaine HTH de liaison à l'ADN pour ses séquences cibles, permettant d'altérer les niveaux de transcription des gènes en aval.

PurR (pour 'purine nucleotide synthesis repressor') réprime l'expression des gènes de son régulon suite à la fixation de guanine ou d'hypoxanthine. La fixation de LacI au niveau de sites opérateurs permet la répression de l'opéron lactose. La liaison d'allolactose ou d'IPTG par LacI induit l'activation de la transcription des gènes cibles (Friedman et al., 1995; Swint-Kruse and Matthews, 2009).

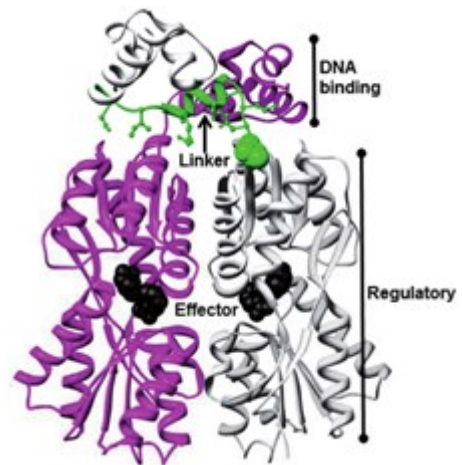


Figure 32 : Représentation de la structure de la protéine LacI sous forme dimérique (code PDB 1efa). Les monomères sont colorés en mauve et en gris. Les ligands représentés par des sphères noires sont liés dans la cavité des domaines VFT. Extrait de Meinhardt et al., 2012.

### 4. Les domaines VFT impliqués dans la signalisation

#### a. Interaction d'un domaine VFT soluble avec un système de transduction de signal

Après fixation de leur ligand, certains domaines VFT solubles vont interagir avec des protéines membranaires comme des domaines senseurs de système à deux composants ou encore des récepteurs de la chimiotaxie pour enclencher une signalisation.

Le système LuxPQ de *Vibrio harveyi* est impliqué dans le quorum sensing. Après la fixation de AI-2, un auto-inducteur à LuxP, un domaine VFT soluble, le complexe ainsi formé va interagir avec la portion périplasmique du senseur-kinase LuxQ pour inactiver la kinase (pour plus de détails, voir la partie V.B.1.c.) (Neiditch et al., 2006).

Le régulon phosphate chez *E. coli* est dépendant du système à deux composants PhoBR où PhoR est le senseur-kinase et PhoB le régulateur de réponse agissant comme un activateur transcriptionnel. Le domaine VFT PstS permet l'importation du phosphate inorganique extracellulaire grâce à son interaction avec le système de transport PstABC. En plus de son rôle dans le transport de phosphate, le système Pst est requis pour la transduction de signal dépendant du phosphate. En effet, des mutations au niveau des gènes de l'opéron *pst* induisent une expression constitutive du régulon Pho, indépendamment de la quantité de phosphate environnemental disponible. Il a été proposé que le système Pst transmettrait le signal au

senseur-kinase PhoR grâce à une interaction entre ces deux ensembles protéiques (Tam and Saier, 1993; Hsieh and Wanner, 2010; Crépin et al., 2011).

Chez *Agrobacterium tumefaciens*, la protéine ChvE de liaison de substrat appartenant au transporteur de sucre GguAB, participe à la chimiotaxie mais également à l'induction de la virulence. ChvE fixe des monosaccharides et transmet le signal au système à deux composants VirA/VirG. L'activation du senseur-kinase va permettre l'expression des gènes de virulence (Tetsch and Jung, 2009).

Chez *E. coli*, le système MalEFGK permet l'importation du maltose. MalE présente également une fonction sensorielle dans la chimiotaxie en interagissant sous sa forme ligandée fermée avec le chimiorécepteur Tar (Fig. 33). L'interaction entre MalE et Tar induit la transition du récepteur d'une forme ordonnée, caractéristique d'un état tendu, à une forme désordonnée relâchée. Cette dernière conformation du chimiorécepteur prévient l'autophosphorylation de la kinase CheA et par conséquent la phosphorylation du régulateur de réponse CheY (Tetsch and Jung, 2009).

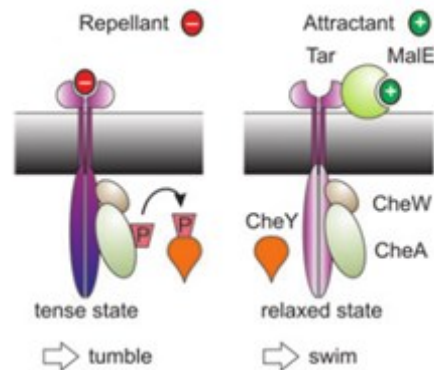


Figure 33 : Représentation schématique de l'interaction de MalE avec le chimiorécepteur Tar. Cette fixation permet l'état relâché du récepteur Tar prévenant ainsi l'autophosphorylation de CheA et induisant la nage des bactéries. Le maltose agit alors comme un attractant. Extrait de Tetsch and Jung, 2009.

Chez *B. pertussis*, un système TTT permet l'incorporation de citrate dans le cytoplasme de la bactérie. Il s'agit du système BctCBA, BctC est la protéine périplasmique, BctA et B sont des composants membranaires (Fig. 34). L'importation de citrate est permise par l'interaction entre BctC ligandé et son système de transport. L'expression de l'opéron *bctCBA* est induite en présence de citrate dans le milieu. Il a été montré que la protéine BctC ligandée, interagit également avec le domaine périplasmique de BctE, le senseur-kinase du système BctDE, pour permettre l'expression de l'opéron *bctCBA* (Antoine et al., 2005).

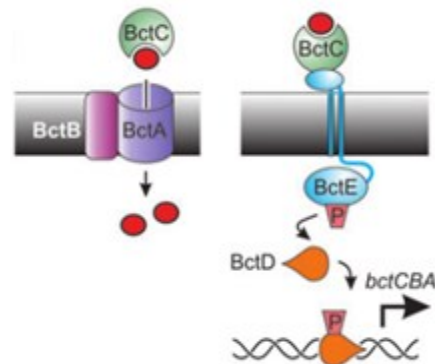
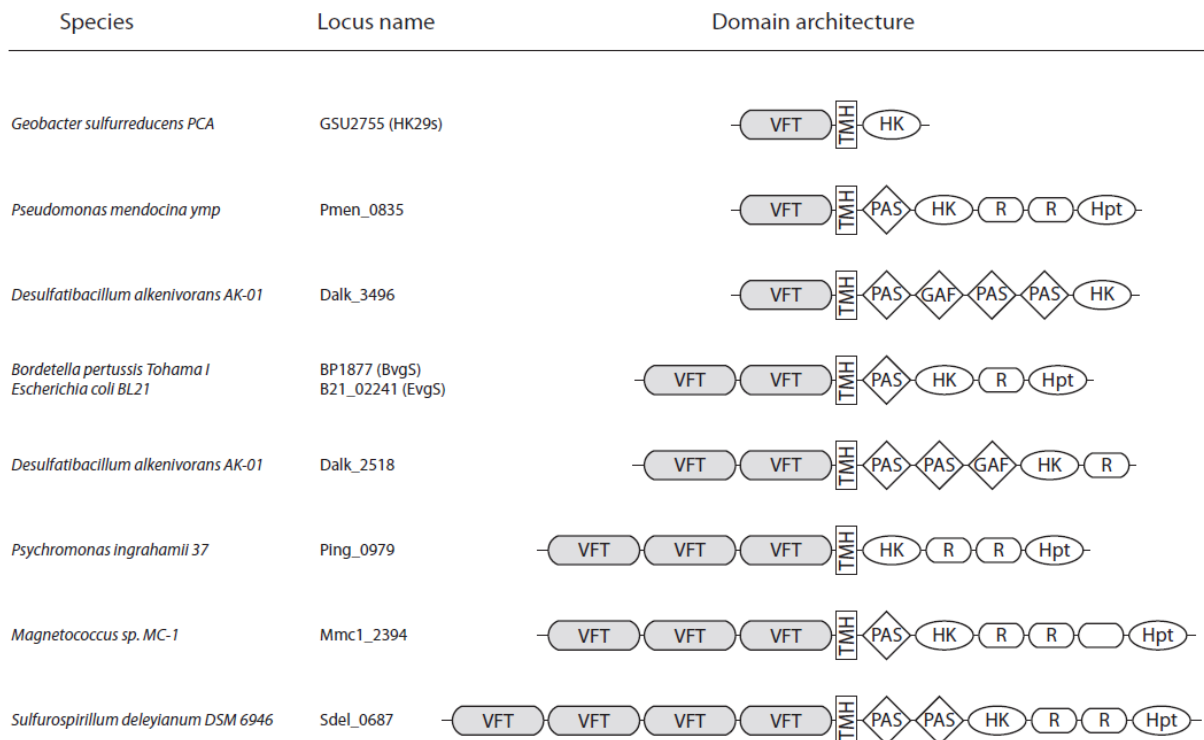


Figure 34 : Représentation schématique de l'interaction de BctC avec le senseur-kinase BctE pour permettre la régulation de l'expression des gènes codant pour le système d'import de citrate. Extrait de Tetsch and Jung, 2009.

### ***b. VFT, domaine à part entière des systèmes à deux composants***

Des domaines VFT sont retrouvés dans la portion périplasmique de certains senseurs-kinases. Ainsi, BvgS est le prototype pour une large famille de senseurs-kinases présentant des domaines VFT (Fig. 35). Cette famille comprend plus de 5000 membres prédits dont certains

sont trouvés dans des microorganismes pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* et *Borrelia burgdorferi* (Dupré et al., 2015a).



**Figure 35 : Représentation schématique de la diversité des senseurs-kinases présentant des domaines VFT. Dans la superfamille, 30% des senseurs-kinases présentent un seul domaine VFT tandis que seulement 4% en comptent 3 et plus. Les différents domaines cytoplasmiques pouvant être retrouvés dans ces senseurs-kinases (HK représente le module kinase) sont illustrés (PAS, GAF, R pour le régulateur de réponse et Hpt). TMH représente le domaine transmembranaire. Extrait de Jacob-Dubuisson et al., 2012.**

Nous illustrerons cette famille par quelques exemples.

Le système EvgAS semble impliqué dans la résistance au stress acide chez *E. coli*. En effet l'activation de ce système à deux composants se ferait en présence de hautes concentrations en métaux alcalins ainsi qu'à de faibles pH (Eguchi and Utsumi, 2014). Il semblerait que les domaines périplasmiques soient impliqués dans la perception de ces stimuli pour permettre l'activation de EvgS (Johnson et al., 2014). EvgS présente une architecture semblable à celle de BvgS et est également sensible aux mêmes molécules que ce dernier (Utsumi et al., 1994).

Le système KvgAS de *Klebsiella pneumoniae*, un pathogène opportuniste, est un homologue de BvgAS présentant environ 42% de similarité de séquence. Ce système semble participer à la réponse au stress oxydant ainsi qu'à une limitation en fer (Lai et al., 2003). Il semblerait également que KvgAS joue un rôle dans la virulence bactérienne (Lawlor et al., 2005).

*Photorhabdus luminescens* est une bactérie pathogène d'insecte qui forme une symbiose avec des nématodes appartenant au genre *Heterorhabditis*. Le cycle de vie de cette bactérie est composé de deux stades, l'un symbiotique et l'autre pathogénique et inclut une variation phénotypique unidirectionnelle qui est contrôlée par le système à deux composants



AstRS. Ce dernier est impliqué dans l'adaptation à la phase stationnaire. Les protéines appartenant à son régulon participent à des systèmes de transport d'électrons, du métabolisme énergétique, de l'acquisition de fer et des réponses aux stress (Derzelle et al., 2004).

La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la virulence de *Vibrio cholera* est dépendante du système VieSAB. VieS est le senseur-kinase dont la séquence est homologue à celle de BvgS, et qui est impliqué dans la phosphorylation de VieA, le régulateur de réponse. Ce dernier présente un domaine EAL phosphodiesterase impliqué dans l'hydrolyse du c-di-GMP. Le second régulateur de réponse, VieB ne présente pas de domaine de liaison à l'ADN mais contient un domaine phospho-receveur ainsi qu'un motif particulier connu pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine. Des hypothèses sur le fonctionnement de ce système ont été proposées. Ainsi, VieS sentirait des signaux spécifiques de son hôte et grâce à la phosphorylation de VieA, pourrait initier des changements dans le profil d'expression des gènes importants pour la colonisation (Martinez-wilson et al., 2008).

*Borrelia burgdorferi* présente un système à deux composants HpK1/Rrp1 qui régule l'expression de gènes requis pour l'adaptation à la disponibilité en nutriments et à la survie dans les tiques. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme central, les mécanismes de virulence ainsi que l'évasion du système immunitaire. Le régulateur de réponse Rrp1 présente un domaine GGDEF conservé impliqué dans la production du c-di-GMP (Rogers et al., 2009). Le senseur kinase HpK1 porte trois domaines VFT (Bauer et al., 2015).

*Yersinia enterocolitica* présente un système à deux composants, YsrRS, permettant l'activation des gènes codant l'appareil de sécrétion de type III Ysa ainsi que ses effecteurs. Le NaCl serait perçu comme un signal activateur pour l'expression des gènes du régulon YsrRS. Ce senseur-kinase est dépourvu de domaine HPt terminal et donc pour permettre la cascade de phosphorylation jusqu'au régulateur de réponse, un domaine HPt soluble est nécessaire, YsrT (Walker et al., 2010).

Ainsi grâce au panel d'exemples choisis, nous avons pu mettre en évidence la diversité des stimuli perçus et les processus régulés par ces systèmes à deux composants appartenant à la famille de BvgS. Notons que pour de nombreux systèmes, aucune information n'est disponible sur la nature des stimuli perçus. Les senseurs-kinases peuvent présenter plusieurs domaines VFT au niveau de leur région périplasmique, allant de 1 à 5, suggérant une régulation complexe dépendant de la perception possible de plusieurs signaux.

## 5. Récepteurs eucaryotes

Des domaines VFT sont également retrouvés dans certains récepteurs eucaryotes tels que les iGluR pour récepteur ionotropique au glutamate, les récepteurs couplés à la protéine G (GABA-B, récepteur metabotropique au glutamate, récepteurs du goût), les récepteurs aux phéromones, les récepteurs à peptides natriurétiques et une nouvelle classe de kinase 'VKR' (pour 'Venus Kinase Receptor') identifiée chez les invertébrés (Jacob-Dubuisson et al., 2012).

De par la grande diversité des récepteurs eucaryotes présentant des domaines VFT, nous illustrerons brièvement quelques exemples de récepteurs eucaryotes faisant intervenir des domaines VFT pour leur fonctionnement.

### a. Les récepteurs ionotropes

Les iGluR sont des canaux cationiques présents sous forme tétramérique et qui participent à la majorité des neurotransmissions excitatoires dans le système nerveux central des vertébrés. (Dutta et al., 2012; Moore et al., 2013). La famille des iGluR est constituée de 3 sous-familles qui sont les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionic acid) et les récepteurs au kaïnate (KR). Les récepteurs NMDA jouent un rôle crucial dans le développement du cerveau, la plasticité synaptique, la mémoire. De manière similaire, les AMPA et les KR participent à ces événements physiologiques (Felder et al., 1999). Les trois types de canaux ionotropiques présentent une similarité de séquence mais des fonctionnements un peu divergent. Les AMPA et récepteurs au kaïnate nécessitent la fixation de glutamate pour leur activation tandis que les récepteurs NMDA requièrent la liaison simultanée de glycine et de glutamate (Sobolevsky et al., 2009).

Les iGluR sont constitués de deux domaines extracellulaires : le domaine de liaison de ligand proche de la membrane (LBD pour ligand binding domain) et le domaine N-terminal (NTD ou ATD pour ‘amino-terminal domain’, Fig. 36). Les LBD et NTD présentent les caractéristiques des domaines VFT. Le NTD participe à l’assemblage spécifique en sous-type, au trafic et à la modulation de l’activité. Un connecteur relie les domaines extracellulaires au domaine transmembranaire, suivi d’un domaine C-terminal intracellulaire qui permet le trafic et l’ancrage aux sites synaptiques. Dans l’état de repos, inactif, les VFT sont ouverts et le canal ionique est fermé (Sobolevsky et al., 2009; Moore et al., 2013). Le domaine LBD lie le L-glutamate, ce qui active le récepteur et permet l’ouverture du canal. L’ouverture du canal est suivit par la désensibilisation du récepteur qui referme le canal (Meyerson et al., 2014).

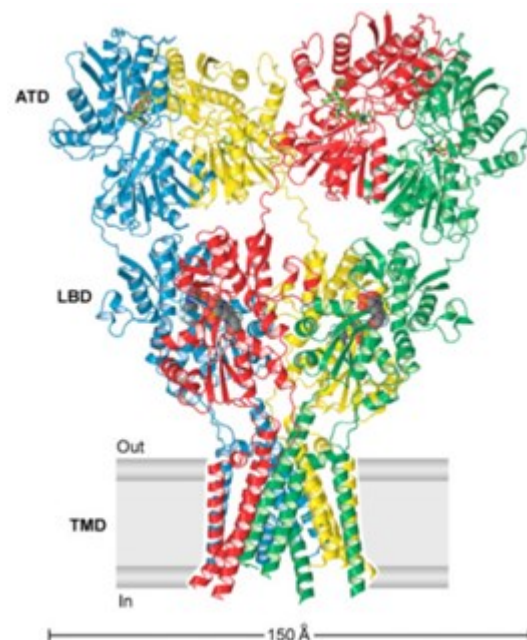


Figure 36 : Architecture du récepteur GluA2 sous forme tétramérique. Chaque sous-unité est colorée différemment en bleu, jaune, rouge ou vert. Extrait de Sobolevsky et al., 2009.

Il a été proposé que les régions NTD de sous-type GluN1 et N2 des récepteurs NMDA étaient fortement dynamiques. La région NTD de la sous-unité GluN1 subit des changements structuraux impliquant des mouvements de flexion de la charnière et de larges torsions et détorsions, permettant de nouveaux contacts intra- et inter-sous-unités. Cette dynamique interviendrait dans la fonction du récepteur (Zhu et al., 2013). Il a également été montré que l’interaction avec le ligand pouvait se faire au niveau de l’interface dimérique et non uniquement au niveau de la cavité des domaines VFT (Dutta et al., 2012).

### b. Récepteurs couplés à une protéine G

Dans cette classe de récepteurs, on retrouve les mGluR (pour ‘metabotropic glutamate receptor’). Ces derniers jouent un rôle clé dans les systèmes nerveux central et périphérique. Ils sont impliqués dans la mémoire, l’apprentissage, l’anxiété et la douleur. Ils forment des dimères stables grâce à la présence de ponts disulfure, et chaque monomère contient un domaine VFT extracellulaire liant le glutamate, sept segments membranaires qui délimitent un site de liaison allostérique et un domaine riche en cystéine (CRD) qui relie le domaine VFT aux segments transmembranaires (Fig. 37). En se liant au site d’allostérie, des ligands peuvent servir de modulateur positif ou négatif pour activer ou inactiver le récepteur (Feng et al., 2015). Il a été proposé que les domaines VFT des récepteurs mGluR subiraient, comme les VFT présents chez les procaryotes, de larges changements de conformation pour passer d’une forme ouverte à une forme fermée (Margeta-Mitrovic et al., 2001).

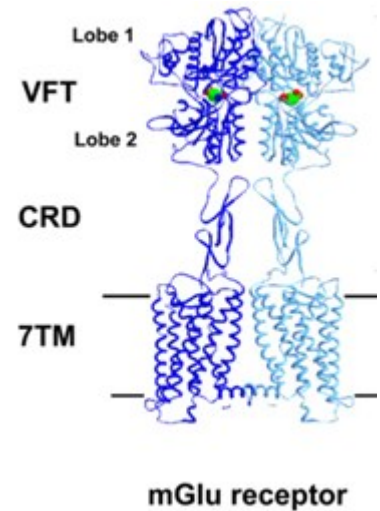


Figure 37 : Modèle structural d’un récepteur mGlu. Extrait de Rondard et al., 2011.

Les récepteurs metabotropiques au GABA font également partie de cette classe de récepteurs. Le GABA (pour ‘Gamma Amino Butyric Acid’) est un acide aminé non protéique qui agit comme un signal intracellulaire lors du développement et de la différenciation des eucaryotes. Dans le système nerveux central des mammifères, le GABA est considéré comme étant le principal neurotransmetteur inhibiteur. Les récepteurs au GABA sont sous forme hétéro-dimérique présentant deux sous-unités homologues GB1 et GB2 (Fig. 38). En partie N-terminale de ces sous-unités un domaine VFT est retrouvé. Le GABA se fixerait uniquement au niveau du VFT de la sous-unité GB1 (Planamente et al., 2010). La signalisation au sein du récepteur GABA<sub>B</sub> semble être médiée par des contacts directs entre les domaines VFT et les domaines membranaires constituées de sept hélices (Fig. 39, Margeta-Mitrovic et al., 2001).

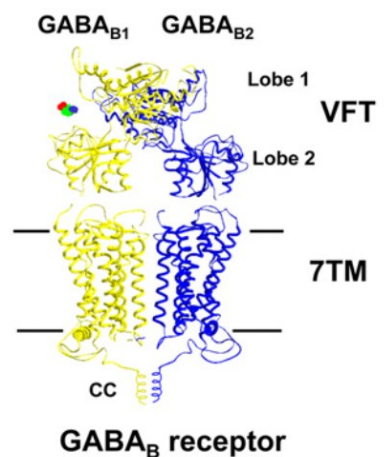


Figure 38 : Modèle structural d’un récepteur au GABA. Extrait de Rondard et al., 2011.

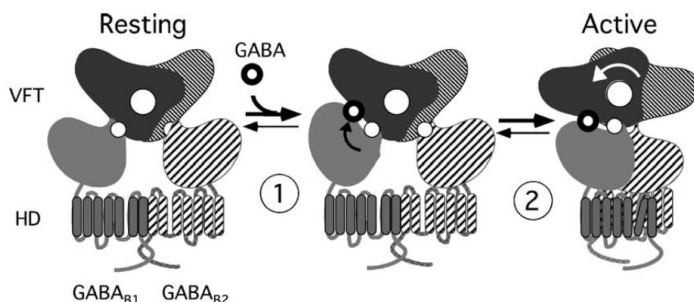


Figure 39 : Modèle de fonctionnement des récepteurs au GABA. La fixation de GABA au domaine VFT va induire la fermeture du domaine et permettre un réarrangement des VFT pour mener à l’activation de la protéine G. Extrait de Pin et al., 2004.

D’autres récepteurs comme ceux percevant le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (CaR) ou des récepteurs aux phéromones et aux goûts sont également retrouvés dans la famille de récepteurs couplés à

des protéines G. Ces derniers présentent une organisation en tétramère avec un domaine VFT et sept segments transmembranaires par monomère (Margeta-Mitrovic et al., 2001).

### c. Les récepteurs aux peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques sont des peptides hormonaux, produits par le cœur des mammifères et qui jouent un rôle dans la régulation d'une variété de fonctions physiologiques (pression sanguine, sécrétion d'hormones...). Les récepteurs aux peptides natriurétiques sont divisibles en deux groupes suivant leur capacité à activer ou inhiber la guanylate cyclase (Anand-Srivastava, 2005). Ces récepteurs sous forme dimérique sont composés d'un module de reconnaissance du ligand (de type VFT) relié à des domaines de signalisation intracellulaire par une hélice transmembranaire par monomère. La reconnaissance du peptide se fait à l'interface entre les deux domaines VFT et permet un réarrangement structural avec un rapprochement des hélices membranaires (Fig. 40). Ce changement de conformation est supposé favoriser l'activation du récepteur (He et al., 2005).

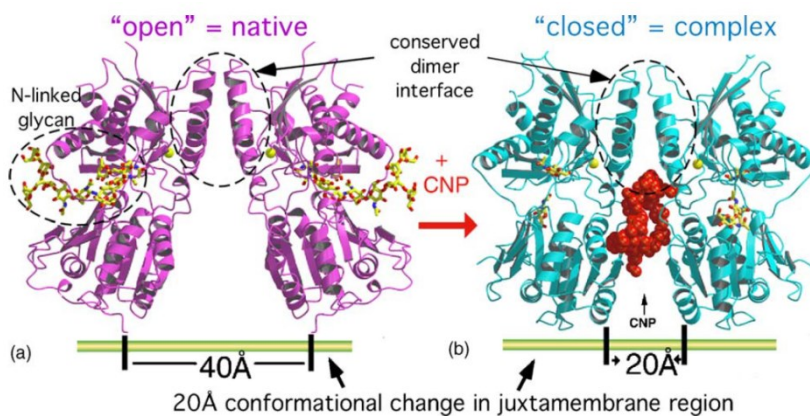


Figure 40 : Structures d'un récepteur à peptides natriurétiques sous forme ouverte sans fixation de ligand (a) ou sous forme fermée grâce à la fixation du ligand (peptide natriurétique atrial, CNP en rouge) au niveau de l'interface dimérique (b). Extrait de He et al., 2005.

## 6. VFT bactériens comme cible pour l'antibiothérapie

De nombreuses molécules ciblant les domaines VFT eucaryotes ont été développées pour moduler l'activité des récepteurs neuronaux et ainsi développer des traitements contre certaines maladies humaines comme par exemple la schizophrénie, la dépression, ou encore les désordres cérébraux (Nicoletti et al., 2015). Du fait de leur prévalence chez les bactéries et de leur implication dans la pathogenèse et le métabolisme, les domaines VFT peuvent servir de cibles thérapeutiques pour un traitement antimicrobien. Ainsi, des études ont été initiées pour développer des inhibiteurs, et un exemple sera présenté ci-dessous.

La protéine de liaison du glucose et du galactose chez *E. coli* (GGBP) permet l'importation de sucres comme le D-glucose, le D-galactose et leurs dérivés et est aussi impliquée dans la chimiotaxie dépendante du glucose grâce à son interaction avec le chémorécepteur Trg. Un antagoniste, le 3-O-méthyl-D-glucose, permettant l'inhibition de la chimiotaxie dépendante du glucose chez *E. coli*, a été mis en évidence. Il agirait comme un bouchon pour la protéine GGBP en empêchant la fermeture complète du domaine nécessaire pour activer l'état de signalisation (Borrok et al., 2009). Des approches semblables pourraient être développées pour inhiber de façon spécifique des senseurs à domaines VFT qui régulent des fonctions importantes chez des bactéries pathogènes.



### C. Les VFT de BvgS (pFAM SBP\_bac\_3)

BvgS présente au niveau de sa région périplasmique deux domaines VFT. En analysant des séquences de BvgS provenant de divers isolats de Bordetelles, il a été mis en évidence une très grande conservation de séquence des deux domaines VFT, suggérant que ces derniers sont sous une forte pression de sélection stabilisante. De manière générale, la cavité est fortement conservée mais les régions de surface semblent présenter plus de diversité. Les domaines VFT les plus proches de ceux de BvgS permettent la fixation d'acides aminés, comme c'est le cas de la protéine liant la glutamine chez *E. coli* (Herrou et al., 2009). Notons que les ligands physiologiques des domaines VFT de BvgS ne sont jusqu'à ce jour pas connus.

Des expériences de mutagenèse ont été réalisées au niveau de la portion périplasmique de BvgS pour en déterminer la fonction. La délétion des domaines VFT a un effet drastique sur l'activité du système, reflétant ainsi l'importance de ces domaines (Miller et al., 1992). Au laboratoire, différentes analyses ont été menées pour déterminer le rôle des domaines VFT pour l'activité de BvgS. Des analyses de dénaturation thermique (TSA pour 'thermal shift assay'), réalisées sur des protéines recombinantes des domaines VFT1 et 2 isolés, ont permis de mettre en évidence une plus grande stabilité thermique du domaine VFT2 comparé au VFT1. Le domaine VFT2 est stabilisé davantage par l'ajout de modulateurs de la virulence tels que le nicotinate et ses analogues présentant un groupement carboxylate ainsi qu'un cycle aromatique, tandis que la stabilité du VFT1 ne semble pas modifiée suite à l'ajout de ces composés. Ces résultats laissent à penser que le domaine VFT2 pourrait être le site de fixation des modulateurs chimiques de la virulence. Il faut aussi noter que le sulfate de magnésium, un autre modulateur de virulence, n'a d'effet sur la stabilité ni du VFT2 ni du VFT1 (Herrou et al., 2010).

La structure cristallographique du domaine VFT2 isolé obtenue en 2010 montre un repliement caractéristique des VFT de classe 2. En effet, les deux lobes sont séparés par une charnière constituée de deux brins  $\beta$ . Le VFT2 a été cristallisé sous forme fermée sans ligand, ce qui est inhabituel pour un domaine VFT. Notons cependant que deux autres domaines homologues à VFT2 ont été cristallisés sous forme fermée sans ligand dans leur cavité. Il s'agit du domaine senseur des protéines histidine-kinases provenant de *Geobacter sulfurreducens* (Histidine-kinase HK29, code PDB du domaine VFT : 3H7M) et de *B. burgdorferi* (système à deux composants Hk1/Rrp1 avec un senseur-kinase à 3 domaines périplasmiques D1, D2 et D3 ; code PDB pour le domaine D1: 5BWJ) (Bauer et al., 2015). Contrairement à BvgS et à HK29, le domaine D1 de Hk1 cristallisé sous forme fermée est distal à la membrane, laissant à penser que les mécanismes de régulation de ce senseur-kinase pourraient différer de ceux de BvgS et de HK29.

Une caractéristique de la cavité du VFT2 est son potentiel électrostatique fortement positif. La dissipation de ce potentiel par mutagenèse rend BvgS insensible aux modulateurs présentant un groupement carboxylate. Ceci conforte le rôle du VFT2 pour la perception du nicotinate et de ses analogues (Herrou et al., 2010)

La structure cristallographique des domaines périplasmiques de BvgS a ensuite été obtenue au laboratoire (Dupré et al., 2015a) et montre une organisation en dimère avec un entrelacement des VFT1 et VFT2 des deux chaînes (dénommées ci-dessous par les lettres A et B). Le VFT1 est en conformation ouverte tandis que le VFT2 est en conformation fermée sans ligand (Fig. 41). Notons que la charnière du VFT1 est constituée de deux segments non structurés, ce qui favoriserait la dynamique/flexibilité du domaine, tandis que la charnière du VFT2 est plus rigide puisqu'étant composée de brins  $\beta$  (Fig. 42). Lorsque les VFT1 sont contraints dans une conformation fermée par l'introduction d'un pont disulfure entre les deux lobes du domaine par mutagenèse dirigée, l'activité de BvgS est très affectée. La conformation ouverte du VFT1 et/ou sa dynamique, semble(nt) donc essentielle(s) à l'activité de BvgS. En revanche, la forme fermée/compacte des VFT2 semble être leur conformation active, puisque l'introduction d'un pont disulfure entre les lobes du domaine, ne semble pas modifier l'activité basale de BvgS mais seulement la réponse à la modulation (Dupré et al., 2015a).

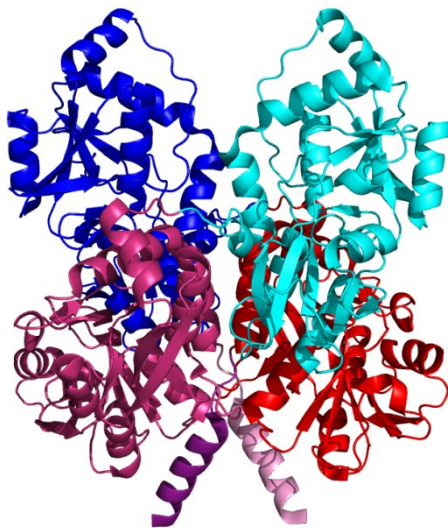
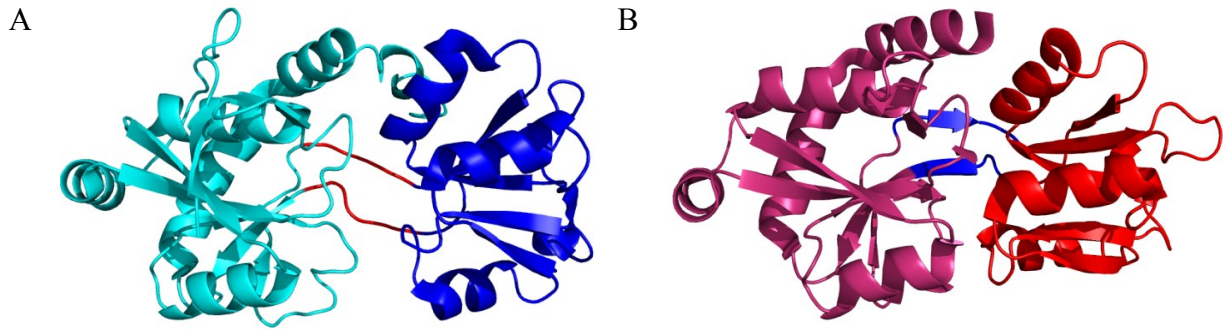


Figure 41 : Représentation des domaines VFT de BvgS sous forme dimérique (code PDB 4q0c). Les deux monomères représentés par les couleurs claires et foncés sont entrelacés. Les VFT1 sont représentés en bleu, les VFT2 en dégradé de rouge et les dernières hélices périplasmiques (H19) sont représentés en mauve clair et foncé.

La cavité de chaque domaine VFT1 est orientée vers la charnière du domaine VFT2 de l'autre protomère et la cavité des VFT2 est orientée vers l'hélice H19, dernière hélice périplasmique, de l'autre protomère. Quatre interfaces peuvent être définies en observant la structure cristallographie, et seront citées de manière décroissante en partant de la plus étendue : VFT1-A/VFT2-B, VFT2/H19, VFT1-A/VFT2-A, VFT1-A/VFT1-B. De nombreuses substitutions ont été introduites au niveau de ces interfaces et dans la cavité des domaines VFT pour caractériser le rôle des domaines périplasmiques dans la transmission de signaux et la régulation de l'activité de BvgS. Ainsi, l'état d'activité de la kinase dépend des connexions inter-chaînes entre les deux lobes du VFT1 et la charnière du VFT2, et entre les lobes 2 des domaines VFT2 et les domaines C-terminaux constitués d'une boucle suivie de l'hélice H19. De nombreuses interactions intra- et inter-chaînes sont requises pour permettre la modulation de l'activité kinase suite à la perception de nicotinate (Dupré et al., 2015).



**Figure 42 : Représentation des domaines VFT isolés de BvgS (code PDB 4q0c). A. Le domaine VFT1, avec le lobe 1 en bleu ciel, le lobe 2 en bleu foncé et la charnière en rouge. B. Le domaine VFT2, avec le lobe 1 en mauve, le lobe 2 en rouge et la charnière en bleu.**

Dans le monde du vivant, les domaines VFT sont impliqués dans l'induction de réponses variées suite à la fixation d'un ligand au niveau de leur cavité ou interface. Au niveau de ces domaines, une diversité de séquence est observable et reflète la variété des molécules pouvant être perçues. Les domaines périplasmiques de BvgS jouent un rôle essentiel dans la régulation de la virulence de la bactérie. Cependant, les études précédemment menées n'ont pas permis d'identifier de ligands naturels ni de comprendre comment les domaines VFT régulent l'activité de la kinase.

La portion cytoplasmique de BvgS est dotée d'un domaine PAS qui est présenté comme étant un domaine de perception putatif. Nous allons à présent porter notre réflexion sur les domaines PAS qui sont retrouvés de manière ubiquitaire dans de nombreuses protéines et sont connus pour avoir des fonctions sensorielles et/ou de régulation.



## IV. Les domaines PAS : Per-Arnt-Sim

Les domaines PAS sont des éléments structuraux retrouvés dans tout le règne du vivant, avec plus de 44 000 PAS identifiés dans plus de 29 000 protéines (Möglich et al., 2009a; Liu et al., 2014). L'acronyme PAS est formé à partir des noms des protéines dans lesquelles ont été initialement identifiées des répétitions de séquences imparfaites d'environ cinquante résidus. Il s'agit des protéines 'period clock' (PER) chez la drosophile, de 'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator' (ARNT) des vertébrés et enfin 'single-minded' de la drosophile (Hoffman et al., 1991; Nambu et al., 1991). D'autres résidus conservés localisés en position C-terminale de cette région ont ensuite été identifiés comme étant des motifs 'PAC' (Ponting and Aravind, 1997) ou boîte S2 (Zhulin et al., 1997). Il a ensuite été montré que ces séquences constituent un seul et même domaine, le domaine PAS (Möglich et al., 2009a).

### A. Structure

Les domaines PAS sont composés d'une centaine de résidus organisés en un repliement d'hélices  $\alpha$  et de brins  $\beta$ . Un très faible niveau de similarité de séquence, de l'ordre de 20 %, est observable (Möglich et al., 2009a). Neuf résidus sont très conservés dans les domaines PAS même si leur fonction moléculaire reste à définir. Une étude a toutefois indiqué qu'ils pourraient être nécessaires au repliement ou à la stabilité du domaine PAS (Philip et al., 2010). Alternativement, ces résidus pourraient être impliqués dans un mécanisme de signalisation conservé. La majorité des domaines PAS ne contiennent que 4 à 7 résidus conservés sur les 9. L'asparagine au début de l'hélice  $\alpha_3$  montre la plus grande conservation et stabiliserait le domaine en participant au 'helical capping' grâce à la formation de ponts hydrogène (Kumauchi et al., 2010). Un motif de séquence 'DIT', où le résidu aspartate est le plus conservé, est généralement retrouvé à l'extrémité C-terminale des domaines PAS et aide ainsi à la prédiction de la présence de ce dernier au sein des protéines (Möglich et al., 2009b).

Les domaines PAS présentent une structure tertiaire très conservée (Fig. 43). Le repliement canonique du PAS comprend un feuillet  $\beta$  central constitué de 5 brins antiparallèles dénommés A $\beta$ , B $\beta$ , G $\beta$ , H $\beta$ , et I $\beta$  ainsi que de 4 hélices  $\alpha$  (C $\alpha$ , D $\alpha$ , E $\alpha$  et F $\alpha$ ). L'ordre des brins est le suivant B-A-I-H-G c'est-à-dire 2-1-5-4-3. Le noyau du PAS est constitué des éléments structuraux A $\beta$  jusqu'au I $\beta$ . Le feuillet  $\beta$  est l'élément le plus conservé, tandis que l'orientation, la taille et le nombre des hélices  $\alpha$  varient considérablement (Möglich et al., 2009a). Ce repliement particulier permet de délimiter une cavité dans laquelle peut se fixer un ligand ou un co-facteur (Henry and Crosson, 2011).

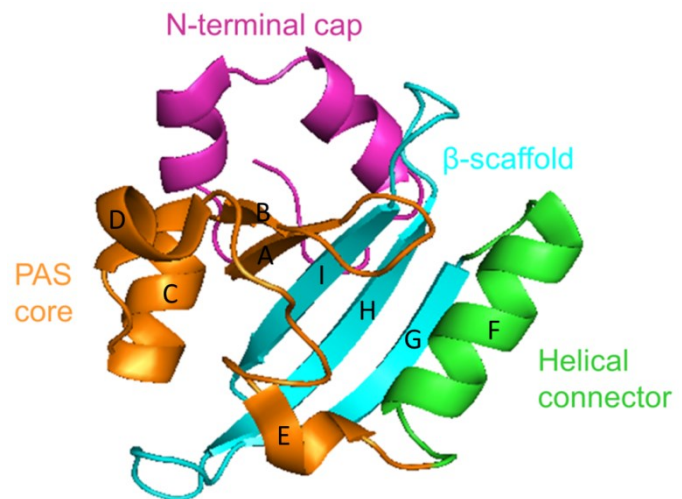


Figure 43 : Organisation du domaine PAS à partir de la structure de PYP (code PDB 2QJ7). Le repliement du PAS peut être délimité par quatre segments. La coiffe N-terminale est constituée des hélices  $\alpha_1$  et 2 (en violet). Précédemment annoté comme le noyau du PAS, le 'PAS core', en orange comprend les deux premiers brins  $\beta$  du feuillet  $\beta$  central et les hélices  $\alpha_3$  et 4. L'hélice  $\alpha_5$  correspond au connecteur hélicial (en vert), le  $\beta$ -scaffold (échafaud  $\beta$ , en bleu) comprenant les 3 derniers brins  $\beta$ . Réalisé sur base de Taylor and Zhulin, 1999.

Il a été montré que la région N-terminale, même s'il s'agit de la région la moins conservée, est importante pour la stabilisation de la structure du domaine PAS. De plus, la jonction entre la coiffe N-terminale et le noyau du PAS est critique pour la signalisation de Aer chez *E. coli* (Watts et al., 2006).

## B. Classification

Les domaines PAS ont été identifiés dans une grande variété de protéines impliquées dans la signalisation, comprenant des facteurs de transcription, des protéines du cycle circadien, des phytochromes et d'autres protéines impliquées dans la régulation, la sensibilité à la lumière, à l'oxygène ou encore au potentiel rédox (Kumauchi et al., 2010). Ils sont généralement retrouvés sous forme dimérique.

Assez semblables au domaine PAS, les domaines GAF (phosphodiesterases spécifiques du cGMP, Adénylate cyclase et FhlA) partagent le même profil de repliement, à l'exception que ces derniers sont constitués de 6 brins  $\beta$  anti-parallèles (ordre 3-2-1-6-5-4) entourés par plusieurs hélices. Entre les domaines PAS et GAF une faible identité de séquence est observable. Les domaines GAF sont homodimériques et impliqués dans la fixation de ligands (Szurmant et al., 2007; Shi et al., 2014). Les domaines CACHE présentent également une structure proche de celle des domaines PAS, et constituent des domaines périplasmiques (Szurmant et al., 2007).

Les domaines PAS peuvent être classés sur base de leur localisation (cytoplasmique ou extracytoplasmique) et en fonction de la classe des petites molécules que ces domaines vont fixer (Henry and Crosson, 2011).

### 1. Localisation extracytoplasmique ou cytoplasmique

Des comparaisons structurales entre les domaines PAS cytoplasmiques et extracytoplasmiques ont permis de mettre en évidence quelques différences. Le feuillet  $\beta$  du noyau est conservé entre les deux groupes. La localisation extracytoplasmique est souvent caractérisée par un ancrage à la membrane grâce à une longue hélice  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale du domaine. Les PAS extracytoplasmiques présentent également moins d'hélices  $\alpha$  entre le second et le troisième brin  $\beta$ . Bien que peu de disparité soit observable entre ces deux localisations, ces domaines PAS extracytoplasmiques ont été dénommés domaine 'PDC' en fonction de trois protéines modèles, PhoQ, DcuS et CitA, auxquelles ils appartiennent (Cheung et al., 2008; Henry and Crosson, 2011).

Les domaines PAS cytoplasmiques peuvent être retrouvés au sein de protéines pourvues de domaines périplasmiques, comme c'est le cas pour les protéines senseurs DctA, NtrY ou encore BvgS. Des domaines PAS sont également présents dans une variété de senseurs cytoplasmiques solubles, dont NifL est l'exemple. La localisation cytoplasmique du domaine PAS lui permet de percevoir des changements de l'environnement intracellulaire. De plus, ils peuvent directement sentir l'environnement extérieur, avec un stimulus comme la lumière, ou indirectement lorsque l'environnement extérieur affecte l'environnement intérieur (Taylor and Zhulin, 1999).

## 2. Diversité dans la perception de ligands

La structure du domaine PAS a évolué pour lier une variété de molécules et d'ions incluant l'hème, la flavine, des acides di- et tricarboxyliques, des acides aminés, des cations métalliques divalents, l'acide coumarique ou encore des acides gras. Il s'agit d'une liste non exhaustive, qui tend à s'agrandir (Henry and Crosson, 2011).

Une classification en fonction de la nature des molécules perçues a donc été proposée pour regrouper les domaines PAS liant le même ligand ou des ligands similaires. Par exemple, les domaines PAS liant le FMN (flavine mononucléotide) ont des structures très proches, et ils sont également proches de ceux fixant le FAD (flavine adénine dinucléotide), une molécule apparentée (Henry and Crosson, 2011).

### C. Importance des régions flanquant le domaine PAS

Les régions flanquant le domaine PAS adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  et semblent importantes pour l'oligomérisation (Fig. 44). Il a été proposé que la fixation d'un ligand au niveau du domaine PAS serait transmise grâce à ces hélices aux autres parties de la protéine (Halavaty and Moffat, 2013; Liu et al., 2014). Ces régions influencent ainsi la transduction de signal (Little et al., 2012).

Ces connecteurs présents entre le noyau du domaine PAS et les autres domaines des senseurs-kinases sont relativement courts, entre 20 et 40 acides aminés.

Il a été montré que les connecteurs reliant les domaines PAS et les domaines effecteurs forment très souvent des enroulements d'hélices (en anglais 'coiled coil', cf la partie V.) (Möglich et al., 2009a). Ainsi, lorsqu'un domaine PAS cytoplasmique précède un domaine kinase, le nombre de résidus de l'hélice de connexion entre ces deux domaines est un multiple de sept. De plus, même si le niveau de similarité de séquence est faible, ces heptades présentent une certaine périodicité dans la position des résidus hydrophobes. De même les hélices  $\alpha$  connectant deux domaines PAS ou un domaine PAS et un domaine guanylate cyclase (GGDEF) montrent un profil d'hydrophobicité en heptades caractéristique des enroulements d'hélices  $\alpha$ . Cette grande conservation de la taille et des caractéristiques physicochimiques de ces connecteurs souligne leur importance structurale. En revanche, les connecteurs reliant deux domaines PAS sont de taille variable, présentant une multiplicité de 3 ou 4 résidus, ce qui indique une hélice  $\alpha$  mais pas nécessairement un enroulement d'hélices classique (Möglich et al., 2009a).

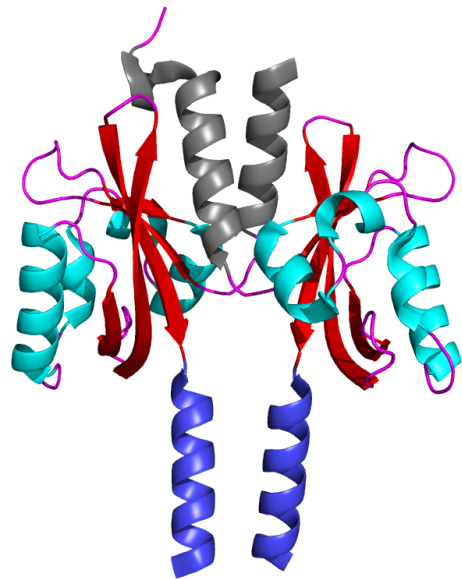


Figure 44 : Représentation du domaine PAS de la protéine chimérique YF1, sous forme dimérique (code PDB 4gcz). Les brins  $\beta$  du domaine PAS sont colorés en rouge et les hélices en cyan. Les hélices  $\alpha$  flanquant le domaine PAS en partie N- et C-terminale sont représentées respectivement en gris et en bleu foncé.

## D. Les domaines PAS, une variété de fonctions

Le nombre de domaine PAS peut varier de un à six selon les protéines (Taylor and Zhulin, 1999) multipliant ainsi la diversité des stimuli pouvant être perçus ou permettant une régulation plus fine du système.

Les domaines PAS peuvent avoir une variété de fonctions au sein des protéines de transduction de signal. Ainsi, ce sont souvent des médiateurs pour permettre des interactions protéine-protéine (Chang et al., 2010). Nous pouvons citer comme exemples ceux de LuxQ, la protéine senseur impliquée dans le quorum sensing dont le domaine PAS périplasmique va interagir avec la protéine LuxP de liaison de soluté et de KinA, la kinase impliquée dans la sporulation de *Bacillus subtilis* suite à une carence nutritive. KinA présente trois domaines PAS cytoplasmiques qui joueraient un rôle structural favorisant la dimérisation de la protéine (Henry and Crosson, 2011; Winnen et al., 2013).

Les domaines PAS sont également impliqués dans la perception de divers stimuli chimiques ou physiques (Möglich et al., 2009a). Etant donné la conservation du repliement des PAS et le fait que ces domaines aient évolué pour fixer spécifiquement une molécule particulière, la plasticité de séquence de ces domaines qui partageraient un ancêtre commun est remarquable (Henry and Crosson, 2011). Dans cette partie, nous présenterons brièvement quelques exemples de domaines PAS liant des ligands spécifiques pour illustrer la grande diversité des stimuli pouvant être perçus.

### 1. Rôle senseur du domaine PAS : Perception de stimuli via la fixation de ligand

#### a. Perception extracytoplasmique

Les domaines PDC sont impliqués dans la perception de diverses molécules présentes dans le périplasme de la bactérie. Ainsi, le senseur-kinase PhoQ du système PhoP/PhoQ perçoit des cations divalents, grâce à une région riche en résidus acides (Cheung et al., 2008). La protéine senseur DcuS, du système DcuS/DcuR de *E. coli* impliqué dans la régulation du transport et du métabolisme des acides dicarboxyliques, présente deux domaines PAS, un périplasmique et l'autre cytoplasmique. Le domaine périplasmique permet la liaison d'acides dicarboxyliques en C4 grâce à la formation de ponts hydrogène impliquant plusieurs résidus de sa cavité. Le domaine PAS cytoplasmique, quant à lui, servirait de relais dans le transfert du signal (Witan et al., 2012; Monzel et al., 2013).

La protéine CitA est un homologue de DcuS et appartient au système CitA/CitB impliqué dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à la fermentation du citrate. Ce dernier, ainsi que l'isocitrate et l'acide tricarballoylique, se fixent au PAS périplasmique de manière spécifique (Fig. 45) (Sevvana et al., 2008). Plusieurs résidus de la cavité du domaine PAS, particulièrement des acides aminés basiques, semblent être impliqués dans la fixation du ligand (Gerharz et al., 2003). CitA présente également un domaine PAS cytoplasmique dont la fonction reste à déterminer (Scheu et al., 2012).

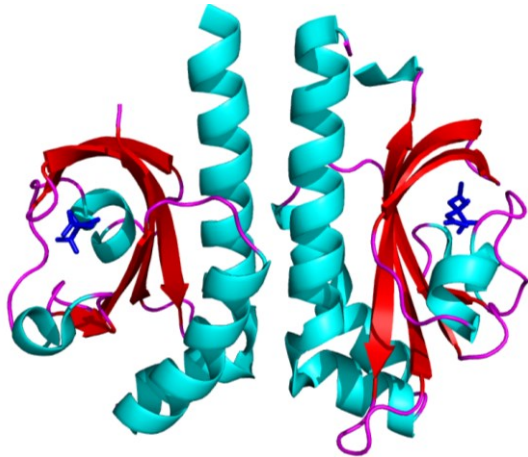


Figure 45 : Représentation sous forme dimérique du domaine PAS périplasmique de la protéine CitA (code PDB 2J80). Une molécule de citrate, colorée en bleu foncé est liée au niveau de la cavité du domaine PAS.

Le chimiorécepteur, McpB de *B. subtilis* présente deux domaines PAS périplasmiques. Le premier domaine serait impliqué dans la fixation d'asparagine grâce à des résidus arginine et tyrosine, par l'intermédiaire de ponts hydrogène (Glekas et al., 2010).

### *b. Perception cytoplasmique*

#### *1) Perception de l'oxygène via la fixation d'hème de type b et c*

La protéine senseur FixL du système à deux composants FixL/FixJ, est retrouvée chez les  $\alpha$ -protéobactéries et contrôle l'expression de diverses protéines fonctionnant dans les conditions d'anaérobiose ou de micro-aérobiose. Ce système est responsable de la fixation d'azote en fonction de la concentration d'oxygène. FixL perçoit l'oxygène via la fixation d'un cofacteur hème de type b au niveau d'un résidu histidine conservé de l'hélice F $\alpha$  (Miyatake et al., 2000; Henry and Crosson, 2011).

Un hème de type c se lie au domaine PAS présent dans les protéines chimiorécepteurs de *Desulfovibrio vulgaris* et *G. sulfurreducens*. La fixation s'effectue de manière covalente grâce à deux résidus cystéine situés à l'extérieur du noyau du PAS (Henry and Crosson, 2011).

#### *2) Perception de lumière*

- via la fixation d'un chromophore de type flavine

Les domaines PAS percevant la lumière ont été dénommés LOV pour 'Light Oxygen Voltage'. Ils fixent la flavine au niveau d'un résidu cystéine conservé de l'hélice E $\alpha$ . Un adduit covalent entre cette dernière et la flavine se forme suite à l'excitation de la protéine par la lumière bleue (Fig. 46, Zoltowski et al., 2009; Henry and Crosson, 2011; Rinaldi et al., 2012).



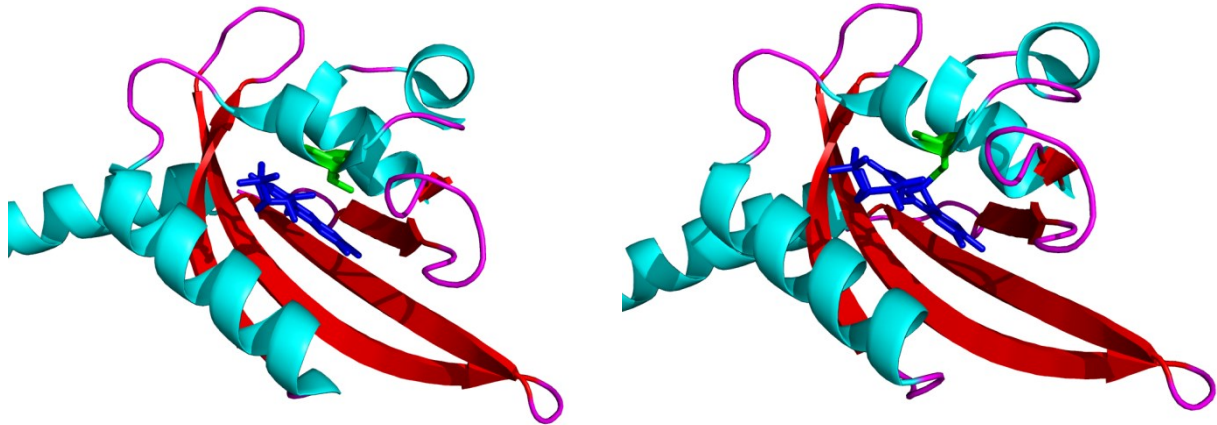


Figure 46 : Représentation du domaine PAS de YtvA de *B. subtilis* à l'obscurité (à gauche, code PDB 2pr5) et à la lumière (à droite, code PDB 2pr6). Le FMN est coloré en bleu foncé et le résidu cystéine, coloré en vert, est impliqué dans la formation de l'adduit avec la flavine après l'excitation par la lumière bleue

- via la fixation d'acide p-coumarique

La protéine PYP (pour 'Photoactive Yellow Protein') sert de prototype structural pour les domaines PAS photo-senseurs. Ce domaine lie de manière covalente un acide 4-hydroxycinnamique (acide p-coumarique) grâce à un résidu cystéine conservé au niveau de l'hélice E $\alpha$ . Ce cofacteur est stabilisé grâce à des interactions polaires dans la poche du domaine PAS et confère à la protéine une sensibilité à la lumière bleue /proche des UV (Cusanovich and Meyer, 2003; Henry and Crosson, 2011).

### 3) Perception du potentiel rédox via la fixation de FAD

D'autres domaines PAS, fixant des cofacteurs de type flavine, ont été caractérisés. La flavine adénine dinucléotide (FAD) est sensible au changement de potentiel rédox. Lorsque la concentration en oxygène diminue, cette dernière sera réduite. Le récepteur Aer d'*E. coli*, impliqué dans l'aérotaxie, c'est-à-dire la mobilité de la bactérie dans un gradient d'oxygène, présente un domaine PAS cytoplasmique liant le FAD. Ce domaine PAS surveille ainsi l'état énergétique de la cellule par la perception du transport d'électrons. Un autre exemple de domaine PAS liant le FAD est celui de la protéine senseur NifL, également impliquée dans la perception de l'état rédox de la cellule. Ainsi, NifL est responsable de la régulation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse à un changement de l'état rédox et de la concentration en ADP. Cette protéine présente deux domaines PAS, le premier lie la FAD, et perçoit ainsi le potentiel rédox, et le second aurait plutôt un rôle de transmission du signal vers le domaine C-terminal de la protéine, lui-même impliqué dans l'interaction avec NifA. Un modèle de signalisation propose que le changement de conformation soit initié par un changement de protonation de l'atome N5 du FAD, qui permet une réorganisation des ponts hydrogène dans la poche de liaison du FAD. Un signal structural est ensuite transmis à l'interface des feuillettes  $\beta$  entre les monomères de domaine PAS. Contrairement aux senseurs d'oxygène basés sur l'hème qui détectent l'oxygène directement, NifL détecte donc l'oxygène à travers des changements de l'état rédox de son groupe prosthétique. Il a été montré que la fixation d'ADP à la partie C-terminale de NifL (domaine GHKL) permet de stabiliser le complexe NifL-NifA et est donc requis pour l'inhibition de l'activité de NifA, l'activateur

transcriptionnel (Perry et al., 2005; Key et al., 2007; Slavny et al., 2010; Henry and Crosson, 2011).

#### 4) Perception d'acide gras

Les acides gras peuvent également être perçus par les domaines PAS. Dans la structure cristallographique du régulateur de transcription RV1364C de *Mycobacterium tuberculosis*, l'acide palmitique (C16:0) est retrouvé dans la cavité du domaine PAS (Fig. 47, Henry and Crosson, 2011).

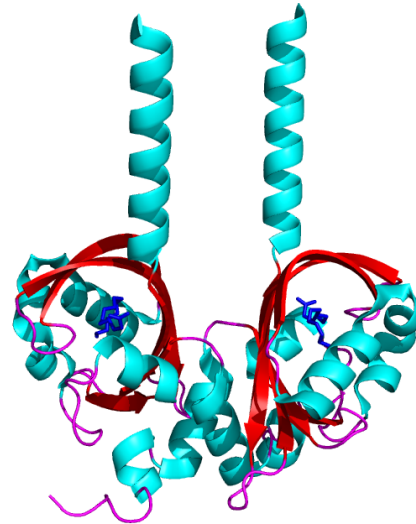


Figure 47 : Représentation du domaine PAS sous forme dimérique de la protéine RV1364C de *M. tuberculosis*, fixant une molécule de palmitate dans la cavité du domaine PAS (colorée en bleu foncé).

## 2. Autres rôles pour le domaine PAS

Les domaines PAS sans rôle avéré de perception de ligand peuvent avoir des fonctions variées comme la dimérisation, la transduction de signaux, le relais de l'information ou encore l'amplification de cette dernière (Witan et al., 2012). A noter que ces différents rôles sont beaucoup moins étudiés que ceux de la fixation de ligands.

Ainsi, les domaines PAS peuvent remplir des fonctions sensorielles et/ou de régulation. Pour permettre la transmission d'information au sein de la protéine, des réarrangements structuraux s'effectuent au niveau du domaine PAS et seront illustrés ci-dessous.

### E. Transduction de signal par changement de structure quaternaire

Le feuillet  $\beta$  et les hélices N- et C-terminales, flanquant le noyau du PAS, jouent un rôle central dans la transduction de signal. La perception d'un signal va induire des changements structuraux, de dynamique et de flexibilité au niveau du domaine PAS (Pandini and Bonati, 2005; Möglich et al., 2009a). Des changements de structures quaternaires induits par la perception d'un stimulus ont été identifiés pour de nombreux domaines PAS.

Ainsi, différents changements de conformation s'effectuant au sein des domaines LOV suite à la perception de lumière ont été rapportés et seront illustrés dans cette sous-partie et résumés grâce à la figure 48.



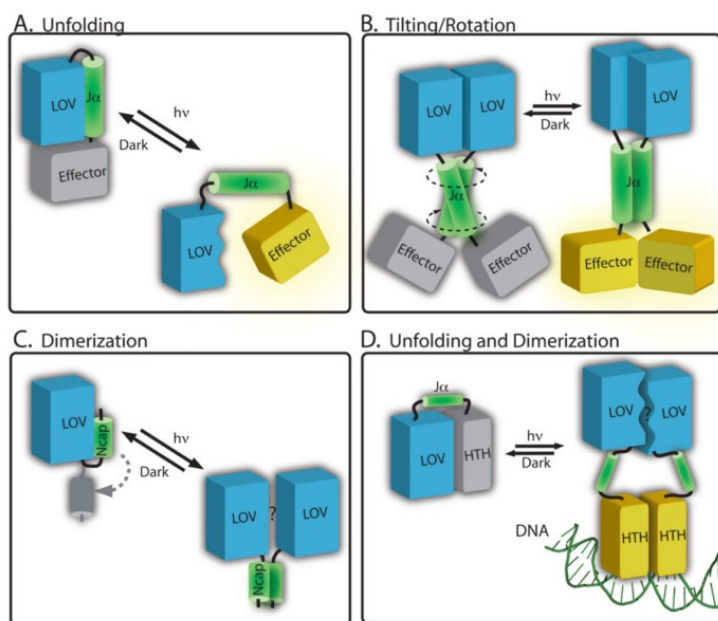


Figure 48 : Représentation schématique de différents modèles de signalisation dans les protéines contenant des domaines LOV, à l'obscurité (dark) ou après perception de la lumière, représentée par hv. A. La formation de l'adduit cysteinyl-flavine induit des changements de conformation du domaine LOV2 (représenté en bleu) de la phototropine d'*Avena sativa*. Ceux-ci affectent les interactions entre l'hélice C-terminale (Ja) et le noyau du domaine LOV, aboutissant à l'activation du domaine effecteur (représenté en jaune). B. Modèle de signalisation pour la protéine YtvA de *Bacillus subtilis*, où l'illumination du domaine induit des mouvements relatifs des deux domaines LOV dans le dimère, qui vont se transmettre aux hélices Ja pour activer le domaine effecteur. C. Exemple de signalisation au sein de la protéine VVD provenant de *Neurospora crassa*, où l'activation par la lumière induit un réarrangement de la coiffe N-terminale (en vert), ce qui modifie la dimérisation de la protéine. D. Représentation de l'activation de la protéine LOV-HTH de *Erythrobacter litoralis*, EL222 où l'activation par la lumière altère l'interaction entre le domaine LOV et le domaine HTH, favorisant ainsi la dimérisation de la protéine et sa fixation à l'ADN. Extrait de Herrou and Crosson., 2012.

## 1. Mouvement de dissociation

L'étude des différentes structures cristallographiques obtenues pour le domaine LOV2 de la phototropine a permis de mettre en évidence l'importance des brins  $\beta$ H et  $\beta$ I dans la propagation du signal. Ainsi, la lumière bleue va induire la formation d'un pont covalent entre le chromophore FMN et un groupement sulfhydryle de la protéine. Celle-ci subit une distorsion du feuillet  $\beta$ , plus particulièrement au niveau des brins  $\beta$ H et  $\beta$ I du domaine LOV2. Ces modifications favorisent la dissipation des interactions du feuillet  $\beta$  avec l'hélice  $\alpha$  C-terminale (Ja), permettant sa libération du noyau du domaine PAS et induisant l'activité kinase (Harper et al., 2004; Khorchid and Ikura, 2006; Hoersch et al., 2007; Zayner et al., 2012; Halavaty and Moffat, 2013). Il a été proposé que cette séparation entre l'hélice Ja et le feuillet  $\beta$  pourrait être due à une augmentation de la dynamique après perception de la lumière (Zayner et al., 2012). Dans la protéine PYP, un pont salin conservé (K110/E12) connecte le feuillet  $\beta$  à la région N-terminale du domaine LOV. Ce pont salin permet la stabilisation du photorécepteur dans un état inactif, à l'obscurité. Après la perception de lumière, celui-ci est déstabilisé permettant ainsi au domaine N-terminal de se détacher de l'échafaud  $\beta$  du PAS (Hoersch et al., 2007).

Ainsi, l'importance de l'interface du feuillet  $\beta$  pour la transduction de signal a été mise en évidence pour le domaine LOV de la phototropine et pour PYP, mais aussi pour d'autres domaines PAS non sensibles à la lumière comme ceux de KinA, hERG ... (Tan et al., 2013).

## 2. Mouvement de rotation

Plusieurs exemples de changements de structure quaternaire des domaines PAS faisant intervenir des mouvements de rotation d'une sous-unité du dimère PAS par rapport à l'autre ont été décrits dans la littérature. En comparant la structure cristallographique dimérique du

domaine LOV de la protéine YtvA de *B. subtilis*, obtenue à l'obscurité ou à la lumière, une rotation de 5° est observable entre les deux sous-unités lors du passage à la lumière, résultant en un mouvement de cisaillement. En effet, l'absorption de lumière induit la formation d'un lien covalent entre un résidu cystéine conservé situé au niveau de l'hélice Eα et l'atome C(4a) du FMN, permettant ainsi un réarrangement du domaine PAS (Möglich and Moffat, 2007; Slavny et al., 2010).

Ce phénomène de rotation a également été observé pour le PAS-A de la protéine Dos d'*E. coli*, où une rotation de 3° de l'une des sous-unités par rapport à l'autre a lieu suite à l'oxydation de l'hème fixé par le domaine PAS (Slavny et al., 2010).

Ce même type de mouvement a été décrit pour le PAS (bjFixLH) de la protéine FixL de *Bradyrhizobium japonicum*, où une rotation de 2° d'une sous-unité du dimère par rapport à l'autre a lieu suite à la fixation de molécules diatomiques, telles que l'oxygène et le monoxyde de carbone, au cofacteur hème déjà lié (Ayers and Moffat, 2008).

La portion périplasmique de DctB, le senseur-kinase impliqué dans la perception d'acides dicarboxyliques, est composée de deux domaines PAS. La fixation de succinate au domaine PAS le plus éloigné de la membrane induit un changement de conformation avec un mouvement de rotation des monomères se comportant comme des corps rigides l'un par rapport à l'autre. Ceci résulte en une augmentation de la distance de plus de 20 Å entre les deux monomères proches de la membrane (Fig. 49). Cette ouverture permettrait le réarrangement du segment transmembranaire et la transmission de l'information jusqu'aux domaines kinase (Nan et al., 2010; Liu et al., 2014).

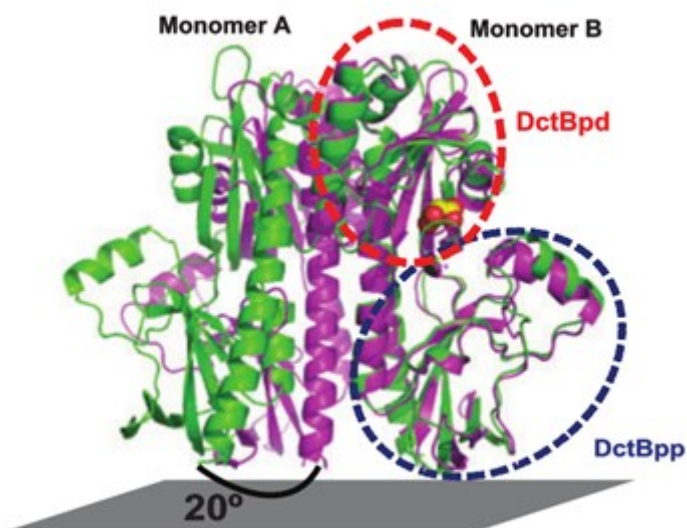


Figure 49 : Superposition de la structure cristallographique de DctB liant le succinate (vert) ou seul (violet), les dimères sont superposés par rapport aux monomères B. La fixation de succinate (représenté par une sphère jaune) au domaine PAS distant de la membrane (DctBpd) induit une rotation des dimères de 20° d'un monomère par rapport à l'autre. Extrait de Nan et al., 2010.

### 3. Dimérisation

Il a également été proposé comme changement de structure quaternaire une dimérisation du domaine PAS suite à la perception du stimulus. La protéine NifL présente deux domaines PAS. Le domaine PAS1 permet la perception de l'état rédox de la cellule. L'oxydation du FAD induit un changement de conformation du PAS1 qui est communiqué au PAS2. Celui-ci subit alors un changement structural, qui permet de moduler l'activité de NifL. Il a été

proposé que le PAS2 puisse adopter deux états, dissocié et associé, et que la dissociation des deux monomères du PAS2 soit nécessaire pour induire le réarrangement de la kinase de NifL et sa fixation à NifA (Slavny et al., 2010). La transduction d'information entre les différents domaines de la protéine se ferait grâce aux hélices flanquant les domaines PAS (Little et al., 2012).

Un changement de l'état de dimérisation est également observable pour le domaine LOV (VVD) du champignon *Neurospora crassa*. Ainsi, après perception de lumière et la formation de l'adduit cysteinyl-flavine, des changements de conformation au niveau de la coiffe N-terminale permettent la déconnexion de cette dernière du noyau du LOV. Ces modifications vont résulter en une transition d'un monomère vers une forme dimérique de VVD (Zoltowski and Crane, 2008; Herrou and Crosson, 2012).

Pour EvgS, un homologue de BvgS chez *E. coli*, un modèle a été proposé selon lequel le domaine PAS jouerait un rôle clé dans la dimérisation de la protéine. Ainsi, EvgS serait inactif lorsque son domaine PAS est sous forme dimérique. La perception d'un ligand par les domaines périplasmiques affaiblirait ce dimère pour induire l'activation de la kinase (Johnson et al., 2014).

Après nous être intéressés aux domaines PAS de manière générale en étudiant leur structure, classification, leurs différentes fonctions ainsi que les mouvements quaternaires qui permettent la transmission d'information au sein de la protéine, nous allons à présent dresser un rapport des données disponibles concernant le domaine PAS de BvgS et son rôle dans l'activité du système.

## F. Le domaine PAS de BvgS

Au sein de BvgS, un domaine PAS cytoplasmique est retrouvé entre le segment transmembranaire et le domaine kinase. Ainsi, il aurait vraisemblablement une fonction de transmission et servirait de relais pour la transduction d'informations des domaines senseurs périplasmiques jusqu'au domaine enzymatique, la kinase. Une fonction supplémentaire de perception d'un signal cytoplasmique est possible, mais rien n'est connu à ce sujet.

Des alignements de séquences du locus *bvgAS* provenant d'isolats de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* et de *B. parapertussis* ont permis de mettre en évidence la remarquable conservation de ce domaine dans BvgS, soulignant son importance fonctionnelle (Herrou et al., 2009). L'étude du rôle du domaine PAS de BvgS a alors été initiée au laboratoire.

Le domaine PAS exprimé chez *E. coli* sous forme de protéine recombinante est dimérique, laissant à penser qu'il le serait également chez *B. pertussis* étant donné que l'activité kinase nécessite une dimérisation. Notons qu'aucun ligand covalent n'a pu être identifié pour la protéine recombinante grâce à des analyses de spectrométrie de masse native. Des essais de cristallisation du domaine PAS ont été entrepris mais se sont révélés infructueux. Un modèle du domaine PAS a alors été construit *in silico* sur base de la structure cristallographique d'un homologue du domaine PAS de BvgS présentant aussi de longues hélices N-terminales (Fig. 50).



Figure 50 : Modèle structural du domaine PAS de BvgS sur base de la structure cristallographique d'un homologue proche provenant de *Haloarcula marismortui* (code PDB 3BWL). Ces deux domaines possèdent des propriétés physicochimiques similaires au niveau de la région N-terminale avec la présence de nombreux résidus chargés. En jaune, sont représentés les résidus dont les substitutions abolissent la réponse de BvgS à la modulation. Extrait de Dupré et al., 2013.

Pour étudier plus en détail la fonction sensorielle du domaine PAS de BvgS, des substitutions ont été réalisées au niveau de la cavité du domaine, en ciblant des résidus généralement impliqués dans la fixation de ligands dans d'autres domaines PAS. Ainsi, des résidus histidine, cystéine, et d'autres résidus, susceptibles de participer respectivement à la fixation d'un hème, la perception du potentiel rédox, ou la fixation d'autres ligands dans les domaines PAS les plus proches, ont été substitués en alanine. Ces substitutions n'ont pas permis de mettre en évidence de ligand ou co-facteur pour le domaine PAS de BvgS (Dupré et al., 2013). Il avait été proposé antérieurement que BvgAS percevrait des signaux rédox par l'intermédiaire de son domaine PAS (Bock and Gross, 2002). Ces auteurs avaient rapporté que la présence d'ubiquinone-0 (Q-0) oxydée à des concentrations  $\mu\text{M}$  permettait d'inhiber l'activité kinase d'un troncat soluble de BvgS *in vitro*, contrairement à la Q-0 réduite qui était sans effet sur l'activité de BvgS. Les quinones sont des transporteurs d'électrons localisés dans la membrane, qui interagissent avec des protéines des chaînes respiratoires. Leur état d'oxydation renseigne donc sur l'état rédox de la cellule. Le domaine PAS de BvgS semblait de plus comporter un motif de liaison de quinone au niveau de son connecteur hélical ([aliphatique-(X)<sub>3</sub>-H-(X)<sub>2,3</sub>-(L/T/S)]). Des mutations de ce motif et de l'échafaud  $\beta$  n'ont cependant pas eu d'effet drastique sur la perception de quinones par BvgS. L'hypothèse des quinones reste donc non validée, d'autant que ces auteurs avaient utilisé des analogues solubles de quinones (Bock and Gross, 2002). Cependant, l'idée que le domaine PAS sentirait l'état métabolique de la bactérie reste envisageable.

Un grand nombre de mutations dans le domaine PAS de BvgS induisent une insensibilité aux modulateurs chimiques. Ces mutations sont retrouvées essentiellement dans une boucle du noyau du PAS orientée vers l'hélice flanquante N-terminale ou dans l'hélice N-terminale elle-même (Fig. 50). Ces mutations affecteraient la connexion entre le noyau du PAS et ses hélices flanquantes et/ou la stabilité du domaine (Miller et al., 1992; Manetti et al., 1994). Récemment, d'autres mutations conférant une insensibilité aux modulateurs ont également été obtenues dans la cavité du domaine (Dupré et al., 2013).

En outre, l'activité de BvgS est fortement altérée en remplaçant certains résidus conservés critiques, à l'interface entre le noyau du PAS et ses hélices flanquantes N- ou C-terminales, mais également dans la cavité. Ces hélices formeraient un enroulement d'hélices et pourraient contribuer à la stabilité du domaine lui-même. Un repliement stable du domaine PAS semble également nécessaire à l'activité de BvgS. Un rôle mécanique a donc été proposé. Le domaine PAS de BvgS aiderait au maintien de la tension/conformation imposée par les VFT et pourrait amplifier un signal conformationnel (Dupré et al., 2013).

Malgré tous ces éléments, le rôle du domaine PAS dans la signalisation au sein de BvgS reste obscur. Il est vraisemblable que ce dernier soit impliqué dans la transduction de signal jusqu'à la kinase indépendamment de la fixation putative d'un ligand. Si ce dernier permet la perception d'un ligand, il s'agirait d'un élément supplémentaire de régulation de l'activité de BvgS.

## V. Transduction de signal

Différents domaines au sein d'une protéine peuvent être impliqués dans la transduction de signal, tels que les domaines HAMP (Histidine kinases, Adénylate cyclases, protéine acceptant un Méthyle et Phosphatases), PAS, GAF ou encore les enroulements d'hélices (en anglais 'coiled coil', terme que nous utiliserons de manière préférentielle pour décrire ces structures). Ces domaines de transduction sont souvent retrouvés dupliqués ou combinés au sein d'une même protéine (Bhate et al., 2015). Environ trois-quarts des senseurs-kinases de systèmes à deux composants présentent une jonction en hélice  $\alpha$  dans la portion cytoplasmique (Liu et al., 2014).

Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux enroulements d'hélices étant donné qu'au sein de BvgS de telles structures sont prédites entre les domaines périplasmiques et le domaine PAS et entre ce dernier et la kinase. Nous verrons aussi brièvement le rôle des domaines HAMP dans la signalisation.

### A. Les enroulements d'hélices : 'coiled coils'

En 1951, Pauling et collaborateurs nommèrent hélice  $\alpha$  la structure secondaire constituée de 3,6 résidus par tour d'hélice (Parry et al., 2008). C'est en 1953, en se basant sur des observations cristallographiques, que Crick découvrit l'existence des coiled coils. La première structure au niveau atomique fut obtenue en 1981 (Gáspári and Nyitray, 2011).

Les coiled coils sont retrouvés dans tout le règne du vivant. Ils sont prédits dans environ 10% des protéines eucaryotes et dans moins de 5% des protéines procaryotes. Les coiled coils sont présents dans toutes les classes de protéines, qu'elles soient fibreuses, globulaires ou membranaires. Il s'agit de motifs permettant des interactions entre protéines et impliqués dans leur oligomérisation (Straussman et al., 2007; Gáspári and Nyitray, 2011).

#### 1. Description générale et composition

Les coiled coils peuvent être constitués de 2 à 5 hélices  $\alpha$  amphipathiques qui s'enroulent l'une sur l'autre pour former un super-enroulement (Burkhard et al., 2001). Notons que des coiled coils présentant plus de 5 hélices ont également été observés. Les coiled coils sont des oligomères composés de chaînes polypeptidiques identiques (homo-oligomère) ou de chaînes différentes (hétéro-oligomère). Les hélices peuvent être parallèles ou antiparallèles (Lupas, 1996; Lupas and Gruber, 2005). Dans cette sous-partie, nous nous intéresserons en détail au coiled coil constitué de deux hélices  $\alpha$  puisque ces structures sont prédites dans le dimère de BvgS.

Ces éléments structuraux sont définis suivant deux catégories : les coiled coils canoniques ou non canoniques. Les coiled coils canoniques dimériques sont composés d'hélices  $\alpha$  à enroulement droit, enroulées l'une autour de l'autre pour former un super-enroulement gauche (Parry et al., 2008; Gáspári and Nyitray, 2011). Les hélices présentent une périodicité de sept acides aminés dénommés par des lettres, 'abcdefg' définissant une heptade (Fig. 51). Chacune de ces heptades correspond à deux tours d'hélices. En effet, la formation de coiled coil à enroulement gauche permet de réduire le nombre de résidus par tour à 3,5 (Lupas and Gruber, 2005).



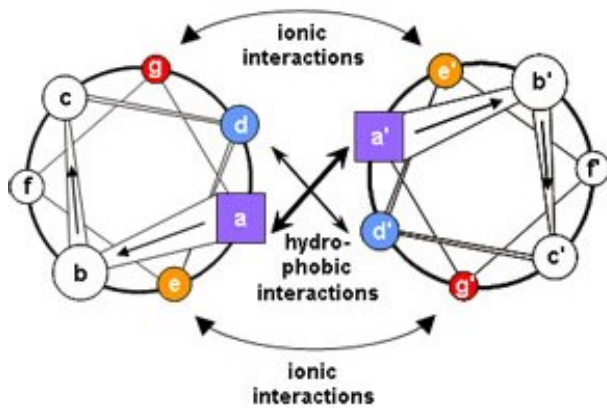


Figure 51 : Représentation schématique d'un coiled coil dimérique. Les résidus 'abcdefg' définissent une heptade. Les interactions hydrophobes et ioniques participent à la stabilité du coiled coil. Extrait de Mason and Arndt, 2004.

Les résidus 'a' et 'd', en position centrale du coiled coil sont généralement hydrophobes (alanine, isoleucine, leucine, méthionine et valine), ce qui permet aux hélices de former des interactions hydrophobes et de Van der Waals à leur interface. Toutefois, des résidus polaires et chargés sont également retrouvés à ces positions dans environ 20% des cas. Ainsi, les résidus chargés tels que l'aspartate, le glutamate, l'arginine et la lysine sont présents dans approximativement 11% des positions 'a' du coiled coil dimérique et en position 'd' dans 8% des cas. De manière similaire, les résidus polaires asparagine, thréonine, sérine et glutamine occupent approximativement 6% des positions 'a' et 8% des positions 'd' dans un coiled coil dimérique (McClain et al., 2002).

Les résidus 'b', 'c', 'e', 'f' et 'g' sont généralement hydrophiles et exposés au solvant (Lupas, 1996; Burkhard et al., 2001; Mason and Arndt, 2004; Woolfson, 2005; Straussman et al., 2007). Il s'agit également de résidus favorisant la formation d'hélices  $\alpha$  (ex : Ala, Glu, Lys et Gln) (Woolfson, 2005). Pour permettre des interactions électrostatiques entre les hélices, des résidus glutamate et lysine sont retrouvés en position 'e' et 'g' du coiled coil (Mason and Arndt, 2004). Les résidus cystéine, glycine et proline, quant à eux, sont présents en faible fréquence. En effet, les glycines et prolines sont considérées comme des acides aminés favorisant les cassures dans les hélices  $\alpha$ . Les cystéines peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures (Woolfson, 2005).

Les coiled coils considérés comme non canoniques ne sont pas basés sur une périodicité en heptade. Ainsi, ces derniers présentent un super-enroulement droit des hélices et sont caractérisés par une périodicité de 11, 15 ou 17 acides aminés (Burkhard et al., 2001; Woolfson, 2005; Meier et al., 2010).

## 2. Conformation et stabilité des coiled coils

Les coiled coils présentent un arrangement particulier des chaînes latérales des acides aminés à l'interface des hélices, appelé 'knobs-into-holes' (boutons dans trous). Dans cette conformation, un résidu 'knob' remplit un espace 'hole' entouré de quatre chaînes latérales de l'hélice d'en face (Lupas, 1996). Cette conformation participe à la stabilité du coiled coil étant donné que les chaînes latérales des acides aminés apolaires sont regroupées en un noyau hydrophobe (Burkhard 2001). Dans un coiled coil constitué de deux hélices parallèles, la liaison  $C\alpha-C\beta$  d'un résidu en position 'a' est parallèle à la liaison peptidique lui faisant face dans l'hélice opposée tandis que pour une position 'd', les liaisons en vis-à-vis sont



perpendiculaires (Fig. 52). Ainsi, la distance entre les carbones C $\beta$  des résidus 'a' est large, favorisant les chaînes latérales  $\beta$ -branchées pour un agencement proche, telles que l'isoleucine, la valine et la thréonine, tandis qu'en position 'd', la distance est plus petite ce qui favorise la présence de résidus non  $\beta$ -branchés tels que la leucine ou l'alanine (Lupas and Gruber, 2005).

Les acides aminés hydrophobes à l'interface du coiled coil participent à la stabilité de ce dernier via deux mécanismes. Le premier correspond à l'enfouissement d'un acide aminé hydrophobe à l'intérieur de la protéine, en l'éloignant du solvant. Le second mécanisme correspond aux interactions de Van der Waals qui s'effectuent entre les atomes des chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes (O'Shea et al., 1991; Alber, 1992). De plus, des interactions électrostatiques intra- et inter-hélices, entre deux résidus de charges opposées, participent à la stabilité de l'enroulement d'hélices (Gáspári and Nyitray, 2011). Les interactions ioniques intra-hélice ont lieu entre les résidus 'i' et 'i+3' ou encore 'i' et 'i+4' et font intervenir principalement des résidus tels que l'arginine et l'acide glutamique (Parry et al., 2008). Les interactions inter-hélices s'effectuent, quant à elles, entre des résidus de charges opposées retrouvés en position 'e' d'une chaîne et 'g' de l'autre chaîne du coiled coil et inversement (Fig. 51). D'autres interactions inter-hélices sont décrites dans la littérature comme faisant intervenir les acides aminés chargés en d'autres positions que le 'e' et 'g'. Celles-ci ne sont pas majoritaires et ne seront donc pas décrites (Parry et al., 2008; Meier et al., 2010).

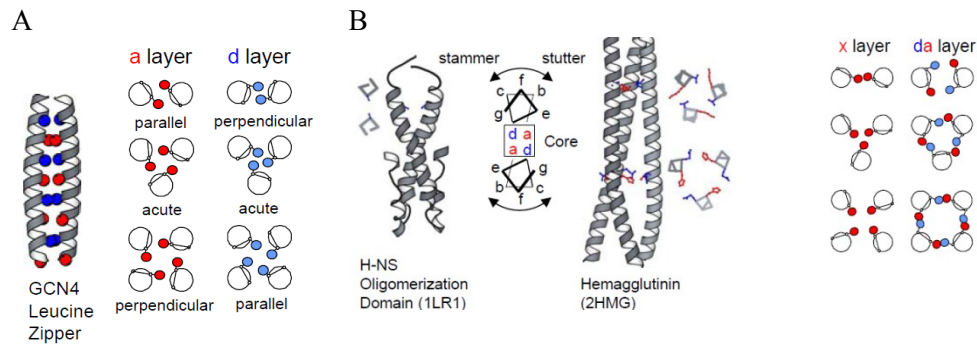
La stabilité des coiled coils peut être affectée par des modifications spécifiques, selon certaines règles. Ainsi, leur déstabilisation est favorisée par l'introduction de cassures au sein de la répétition d'heptades, par la présence de résidus chargés non appariés, la diminution de résidus apolaires en position 'a' et 'd' ou encore la diminution de résidus apolaires volumineux en 'a' et 'd'. Les cassures mentionnées peuvent être induites par la présence d'un acide aspartique ou d'un acide glutamique en position 'a' ou de lysine et d'arginine en position 'd', ou encore par la présence d'une proline n'importe où dans la séquence. La présence de plusieurs glycines favorise la flexibilité de la chaîne peptidique. L'augmentation de la rigidité au sein du coiled coil peut être provoquée par l'introduction d'acides aminés apolaires volumineux en positions 'a' et 'd', par la formation de ponts salins entre les résidus chargés (principalement ceux en positions 'e' et 'g' des différentes chaînes), et par l'augmentation du nombre de résidus aromatiques tels que la tyrosine et la phénylalanine en positions 'a' et 'd', ainsi que grâce à la formation de ponts disulfures inter-chaînes (Cohen and Parry, 1986).

### 3. Altération de la périodicité

Des altérations de la périodicité de 7 acides aminés sont retrouvées dans certains coiled coils. Il s'agit principalement de 'stutters', 'stammers' (bégaiement) ou 'skips' (saut), correspondant respectivement à la délétion de 3, 4 ou 6 résidus (ou dans d'autres termes à l'insertion de 4, 3 ou 1 résidus). D'autres altérations de séquences ont pu être répertoriées, mais n'ont pas été nommées faute de leur faible représentativité au sein des coiled coils (Parry et al., 2008).

### a. Les stutters

Les stutters sont caractérisés par la délétion de 3 ou l'insertion de 4 résidus au sein de l'hélice pour donner un profil d'hydrophobicité 3-4-3-4-4-3-4-3-4 au lieu de 3-4-3-4-3-4-3-4 (correspondant à la représentation donnée pour des heptades dont les résidus apolaires sont séparés alternativement par 3 ou 4 résidus). En introduisant 4 résidus, correspondant à plus d'un tour d'hélice, le stutter favorise un désenroulement du coiled coil caractérisé par des hélices qui deviennent davantage parallèles l'une à l'autre (Gruber and Lupas, 2003; Mason and Arndt, 2004; Lupas and Gruber, 2005; Parry et al., 2008). Cette altération de la périodicité va jouer sur l'organisation interne du coiled coil. Initialement en knobs-into-holes, celui-ci va être modifié au niveau de l'insertion des résidus, et adopter une conformation 'knobs-into-knobs' avec une modification de l'orientation des chaînes latérales des résidus des hélices  $\alpha$  (Fig. 52). Ainsi, cette altération de la périodicité va permettre le basculement d'un résidu 'a' vers le centre du coiled coil, résultant en une géométrie appelée couche 'x' (abcdefgxefg) tandis que les résidus en 'd' seront basculés à l'extérieur de l'interface hydrophobe, le résidu suivant aura la position 'a', résultant en un noyau d'interaction de résidus autour d'une cavité centrale (couche 'da'; abcdabdefg) (Fig. 52B) (Lupas, 1996; Lupas and Gruber, 2005). La présence d'un stutter altère localement les interactions inter-hélices au sein du coiled coil, et est prédit pour déstabiliser les segments de petites tailles.



**Figure 52 : Représentation schématique de l'effet d'un stutter et d'un stammer sur l'organisation du coiled coil. A. organisation d'un coiled coil dimérique en knobs-into-holes. B. L'insertion de 4 ou 3 résidus dans l'hélice va perturber les interactions knobs-into-holes du cœur du coiled coil en favorisant l'organisation knobs-into-knobs au niveau de l'insertion. Pour le stutter, le résidu en position 'a' va former la couche 'x', la couche 'da' étant formée par le résidu 'd' basculé à l'extérieur du cœur et le suivant mis en position 'a'. Le stammer est caractérisé par un résidu 'd' en couche 'x', la couche 'da' étant composée des résidus 'g' et 'a'. Extrait de Lupas and Gruber, 2005.**

### b. Le stammer

Les stammers constituent la deuxième altération de la périodicité la plus couramment observée. Ils sont caractérisés par la délétion de 4 résidus ou l'insertion de 3 pour donner un profil 3-4-3-4-3-3-4-3-4 au lieu de 3-4-3-4-3-4-3-4. Cette délétion correspondant à presque un tour d'hélice, va induire un surenroulement des hélices (Gruber and Lupas, 2003; Parry et al., 2008; Hartmann et al., 2009). Le stammer tout comme le stutter permet d'obtenir une organisation en 'knobs-into-knobs'. Cette fois la couche 'x' est constituée de résidus 'd' tandis que la couche 'da' est formée des résidus en positions 'g' et 'a' (Fig. 52) (Gruber and Lupas, 2003; Lupas and Gruber, 2005).

### *c. Le skip*

Les skips correspondent à l'introduction d'un résidu supplémentaire au niveau de l'heptade (ex : abcdeffgh) ce qui résulte en une perturbation de la géométrie de l'hélice, avec un débobinement de l'enroulement d'hélices sur une longue distance, pouvant induire des coudes (Lupas, 1996; Parry et al., 2008).

Les distorsions induites par les stutters, stammers et skips sont généralement confinées à deux tours d'hélice de chaque côté de la délétion (Mason and Arndt, 2004).

### *d. Exemples d'autres cassures au sein des hélices*

Une grande partie des protéines ayant des coiled coils présentent des cassures au niveau des répétitions d'heptades. Les résidus proline permettent une discontinuité de l'hélice. Il a également été suggéré que des groupes de résidus chargés ou des groupes de larges résidus apolaires puissent résulter en un coude au niveau de l'axe de l'enroulement d'hélice (Cohen and Parry, 1986).

## **4. Coiled coil : l'exemple du leucine zipper**

Le leucine zipper (fermeture en leucines) consiste en un coiled coil parallèle dimérique avec les hélices  $\alpha$  présentant une organisation knobs-into-holes. En position 'd' du coiled coil, des résidus leucines sont retrouvés. Ces dernières réalisent des interactions intra-hélices avec l'acide aminé hydrophobe voisin en position 'a' et des interactions inter-hélices avec la position 'd' de l'hélice opposée. Les leucine zippers ont été caractérisés principalement dans les protéines liant l'ADN, mais sont également retrouvés dans de nombreuses protéines de signalisation.

Des études du leucine zipper du facteur de transcription GCN4 de la levure ont montré l'importance des leucines pour la dimérisation des hélices  $\alpha$ . En effet, la substitution des leucines en isoleucine ou en valine permet d'obtenir des trimères ou tétramères au lieu du dimère initial. Les leucines du leucine zipper du facteur de transcription bZIP sont importantes pour la dimérisation et la stabilité, la leucine permettant une conformation plus stable que l'isoleucine et l'alanine (Moitra et al., 1997). De même, il a été proposé que le leucine zipper de la kinase Nek2, qui régule le cycle cellulaire, soit important pour sa dimérisation et son activation (Croasdale et al., 2011).

## **5. Segment transmembranaire : particularités**

La bicouche lipidique comporte des régions distinctes, caractérisées par la présence des têtes polaires et des queues hydrophobes des phospholipides. Cette bicouche impose un ensemble de propriétés à une protéine membranaire, créant ainsi des contraintes environnementales qui stabilisent les segments transmembranaires et leurs interactions. La région hydrophobe de la bicouche favorise la formation de segments transmembranaires stables grâce à la formation de ponts hydrogène au centre des paquets d'hélices (Matthews et al., 2006).

Les hélices membranaires sont composées majoritairement de résidus apolaires (environ 70%) tels que la leucine, la valine, l'isoleucine, l'alanine et la phénylalanine. Des résidus polaires tels que la sérine, la thréonine et la glycine sont également retrouvés dans les segments membranaires des protéines (Cohen and Parry, 1986; Javadpour et al., 1999) contrairement à

d'autres résidus (Lys, Asp, Glu, Arg, Asn, et Gln) qui sont relativement absents (Eilers et al., 2002). Des études ont été menées pour déterminer les résidus membranaires qui seraient exposés à l'interface membrane-eau. Ainsi, les résidus aromatiques (tryptophane et tyrosine) présentent une affinité pour la région membranaire près des carbonyles des lipides, et sont retrouvés au niveau de l'interface. Les résidus chargés positivement (lysine et arginine) présentent des chaînes latérales qui peuvent s'étendre à travers la membrane par un mécanisme de 'snorkeling' (plongée au tuba) et interagir avec les têtes chargées négativement des groupements phosphate. Les acides aminés chargés négativement, présentent une chaîne latérale plus courte et ne sont pas susceptibles d'interagir de manière favorable avec l'interface lipide-eau étant donné qu'ils seraient repoussés par les groupements phosphate chargés négativement (Killian and Von Heijne, 2000).

Des analyses de l'arrangement des hélices au sein des membranes ont permis de mettre en évidence qu'un enroulement gauche des hélices est la conformation la plus favorable, bien qu'un enroulement droit soit parfois observé. Ainsi, l'agencement gauche des hélices augmente la surface d'interface entre ces dernières, qui adopte une conformation en knobs-into-holes. Toutefois, cette conformation semble moins compacte et moins régulière que celle observée pour les coiled coils solubles (Langosch and Heringa, 1998; Curran and Engelman, 2003).

Les interactions entre les segments transmembranaires peuvent être favorisées par une variété de résidus et principalement ceux de petite taille, polaires, aromatiques et également ionisables (Teese and Langosch, 2015). La stabilisation des hélices transmembranaires se fait par l'intermédiaire d'interactions de Van der Waals, de ponts hydrogène ainsi que d'interactions électrostatiques (Senes et al., 2004; Herrmann et al., 2010).

Au niveau des segments membranaires, des motifs particuliers impliqués dans la structuration et stabilité de la protéine ont été identifiés. Les motifs les plus répandus comprennent la séquence GxxxG où les glycines peuvent être remplacées par d'autres résidus de petite taille. Ces derniers sont retrouvés dans environ 50% des segments à un seul passage transmembranaire et sont connus pour favoriser l'interaction entre les hélices transmembranaires. En effet, la glycine, l'alanine et la sérine permettent des contacts proches entre les hélices, favorisant les interactions de Van der Waals ainsi que la formation de ponts hydrogène de type C $\alpha$ -H---O. Ce type de motif semble conférer stabilité et plasticité structurale aux hélices transmembranaires (Senes et al., 2004; Mueller et al., 2014). D'autres motifs ont été recensés pour favoriser les interactions entre hélices transmembranaires mais restent moins représentés que le motif GxxxG. Nous pouvons citer comme exemple le motif 'GxxxxxxG' (Zhang et al., 2015), le leucine zipper 'LxxLxxxLxx' (Eilers et al., 2002), ainsi que d'autres motifs faisant intervenir des résidus polaires 'SxxSSxxT' et 'SxxxSSxxT' (Curran and Engelman, 2003; Li et al., 2012).

Des analyses de mutagenèse, de 'cysteine scanning' ainsi que de dynamique moléculaire ont été réalisées pour caractériser la structure du domaine transmembranaire de PhoQ. Ce domaine est constitué d'un paquet de 4 hélices  $\alpha$ . Sur base de la structure cristallographique des segments transmembranaires du senseur-kinase HtrII, qui sert de modèle pour ceux de

PhoQ, il a été proposé qu'une asparagine forme une petite poche à eau grâce à des ponts hydrogène au centre du paquet d'hélices transmembranaires. Cette asparagine est effectivement critique pour la transduction de signal au sein du senseur-kinase PhoQ. Ainsi, la perception d'un stimulus induirait un mouvement de cisaillement au niveau des domaines périplasmiques de perception, permettant un réarrangement des segments transmembranaires. La courbure de l'hélice au niveau de cette poche à eau permettrait aux hélices transmembranaires d'effectuer des mouvements de rotation (cf les parties V.B.1.b. et V.C.4. pour la transduction d'information au sein de PhoQ) (Goldberg et al., 2010; Lemmin et al., 2013; Bhate et al., 2015).

## **B. Coiled coil et signalisation**

De longs coiled coils ont été identifiés immédiatement en amont des domaines DHp des senseurs-kinases et seraient impliqués dans la transduction d'information entre les domaines périplasmiques jusqu'à la kinase. Ces enroulements d'hélices ont été annotés comme des hélices de signalisation ou 'S-helix' et sont retrouvés joignant divers domaines de signalisation, tels que les domaines PAS, GAF, HAMP, les hélices transmembranaires, les domaines receveur, GGDEF (diguanylate cyclase), EAL (c-di-GMP phosphodiesterase) et les serine/thréonine-kinases (Gao and Stock, 2009). Ces hélices de signalisation sont retrouvées dans des milliers de protéines de signalisation (Liu et al., 2014). Des études par mutagenèse de ces S-helices ont permis de proposer un modèle dans lequel ces hélices fonctionnent comme un interrupteur en empêchant l'activation constitutive des domaines de signalisation en aval (Anantharaman et al., 2006).

### **1. Différents mouvements impliqués dans la transduction de signal via les coiled coils**

Pour permettre la transmission de signal, les coiled coils peuvent être sujets à différents types de mouvement tels que le piston, la rotation, le cisaillement, ou une combinaison de ces différents mouvements (Matthews et al., 2006; Möglich et al., 2009a).

Nous illustrerons dans cette partie les trois mouvements principaux, à l'aide de quelques exemples.

#### ***a. Le modèle de piston***

Le modèle de piston a principalement été décrit dans les chimiorécepteurs. En effet, l'étude de Tar, le récepteur à l'aspartate, montre que la fixation d'un ligand agoniste génère un mouvement de piston d'environ 1 Å au travers de la membrane vers le cytoplasme (cf partie V.F.1. pour plus de détails sur la transduction d'information au sein de Tar) (Bhate et al., 2015).

Le modèle de piston a également été proposé pour la transmission d'information au sein de plusieurs senseurs-kinases de systèmes à deux composants. Les structures cristallographiques des domaines périplasmiques de NarX (système NarXL) et de TorS (système TorTSR) supportent le fait que la transduction de signal fait intervenir un mouvement de piston au niveau membranaire (Cheung and Hendrickson, 2009; Moore and Hendrickson, 2009). Le senseur-kinase homodimérique NarX est impliqué dans le contrôle de la réponse respiratoire anaérobie chez diverses bactéries suite à la perception de nitrite et nitrate. Le module de

signalisation transmembranaire de NarX est semblable à celui des chimiorécepteurs, avec un domaine périplasmique dimérique constitué d'un paquet de quatre hélices qui transmettent le signal à quatre hélices transmembranaires. Un domaine HAMP cytoplasmique fait suite à ces hélices. En comparant les formes ligandée et non ligandée, il a été mis en évidence que la fixation de ligand permet le déplacement de l'hélice C-terminale vers le périplasm d'environ 1 Å relativement à l'hélice N-terminale, caractérisant ainsi un mouvement de piston (Cheung and Hendrickson, 2009). Le système TorTSR permet de contrôler la respiration anaérobie suite à la perception de triméthylamine-N-oxide (TMAO), un accepteur terminal d'électrons, par la protéine de liaison périplasmique TorT. Cette dernière va interagir avec TorS, le senseur-kinase homodimérique. En comparant également les structures cristallographiques ligandée ou non, il a été mis en évidence la présence d'un mouvement de piston pour permettre la transduction d'information (Falke and Erbse, 2009; Moore and Hendrickson, 2009). Le système à deux composants DcuSR est sensible aux C4-dicarboxylates et di-anions proches. Le senseur-kinase DcuS est composé d'un domaine PAS périplasmique, de deux segments membranaires (TM1 et TM2), d'un domaine PAS cytoplasmique et d'un module kinase, par monomère. Des expériences d'accessibilité de cystéine et de cystéine scanning ont permis de mettre en évidence un mouvement de piston symétrique des deux segments transmembranaires TM2 suite à la perception de fumarate par les domaines PAS périplasmiques. Ce mouvement permettrait la sortie de 4 résidus, soit un déplacement de 4 à 6 Å vers le périplasm (Monzel and Uden, 2015). Le modèle de piston a également été proposé pour le système à deux composants CitA/CitB sensible au citrate et impliqué dans l'induction des gènes de fermentation du citrate en conditions anoxiques (Fig. 53) (Sevvana et al., 2008).

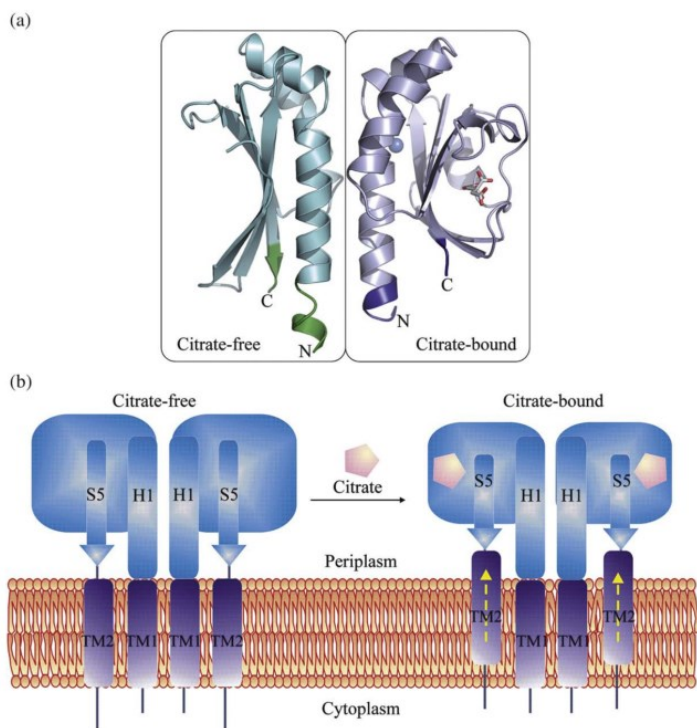


Figure 53 : Transduction de signal via des mouvements de piston transmembranaires. (a) Comparaison des formes non ligandée ou ligandée de CitA. (b) Modèle hypothétique de transduction de signal suite à la fixation d'un ligand faisant intervenir un mouvement de piston des segments transmembranaires TM2. Sans fixation de ligand, le domaine PAS est dans sa forme relâchée (gauche). La fixation de citrate permet la contraction du domaine PAS favorisant les mouvements de piston et par conséquent la transduction de signal jusqu'à la partie cytoplasmique. Extrait de Sevvana et al., 2008.

### b. Le modèle de cisaillement

L'étude des domaines senseurs de la kinase hybride BT4663 de *Bacteroides thetaiotaomicron*, liant des sucres complexes (tel que le  $\Delta$ UA-GlcNAc6S, un disaccharide



non saturé) a permis de proposer un mouvement de cisaillement pour la transduction d'information au sein de la protéine (Fig. 54). Ainsi, la structure cristallographique révèle un changement de conformation entre les domaines extracytoplasmiques avec et sans ligand. La fixation de ce dernier induirait un mouvement de cisaillement (de fermeture) au niveau de la partie C-terminale du domaine (domaine Y\_Y\_Y) qui rapprocherait ces derniers d'environ 15 Å. Ce mouvement de fermeture serait transmis aux hélices transmembranaires jusqu'au domaine kinase pour permettre l'autophosphorylation (Fig. 55) (Lowe et al., 2012).

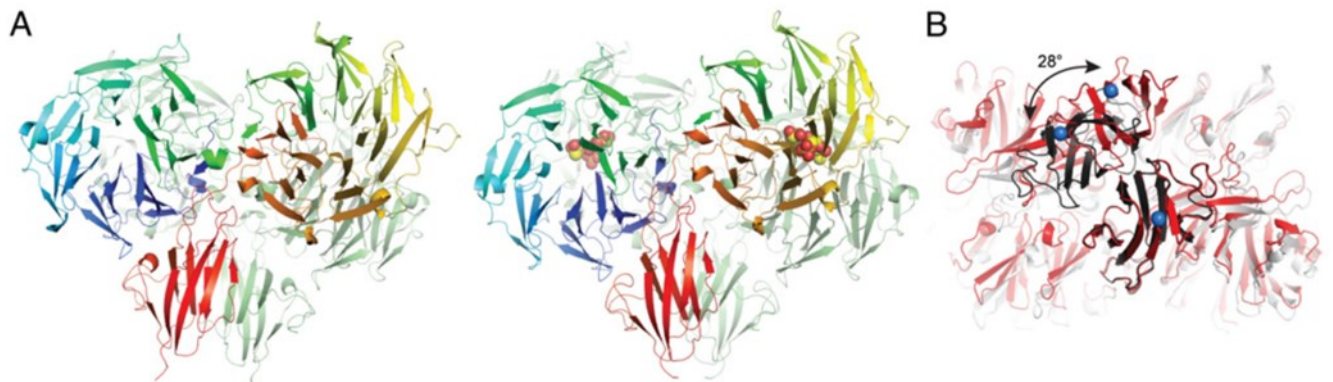


Figure 54 : Représentation des changements de conformation des domaines périplasmiques de BT4663 sous forme dimérique après la fixation de ligand ( $\Delta$ UA-GlcNAc6S). A. A gauche, la forme non ligandée et à droite celle portant le ligand (représenté par des sphères). Les protomères sont colorés du N au C terminus, par un dégradé de bleu-rouge pour l'un, et en vert pour l'autre. B. Observation du dessous du domaine Y\_Y\_Y de la portion périplasmique en présence (rouge) ou en absence de ligand (gris). Les chaînes A sont superposées pour montrer les mouvements au niveau de la chaîne B. Extrait de Lowe et al., 1012.

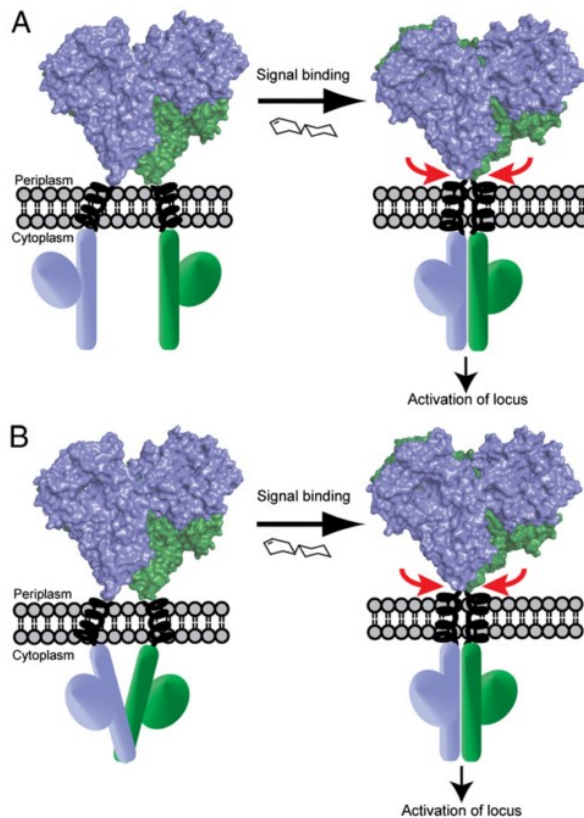


Figure 55 : Représentation schématique illustrant le modèle de cisaillement permettant l'activation du senseur-kinase BT4663. La fixation de ligand induit un mouvement de fermeture en ciseau dans la partie C-terminale du domaine périplasmique représenté par des flèches rouges. Ce mouvement de cisaillement va favoriser le rapprochement des domaines kinase (A) ou le réarrangement du dimère de kinase pré-existant (B) et permettre son autophosphorylation et l'activation des gènes cibles. Extrait de Lowe et al., 2012.



Le modèle de cisaillement a également été proposé pour le senseur-kinase PhoQ. Le système PhoPQ est sensible à divers signaux incluant le pH, des ions divalents et certains peptides cationiques et est impliqué dans la régulation de réponses essentielles telles que le transport d'ions ou la virulence. PhoQ présente un domaine HAMP cytoplasmique, suivi du domaine kinase. Le domaine PAS senseur périplasmique porte un patch de résidus acides proche de la membrane, lui permettant de fixer le  $Mg^{2+}$ . La fixation de cet ion divalent permettrait de maintenir une interaction entre le domaine senseur et les têtes polaires des lipides chargées négativement. Lorsque la concentration extracellulaire en  $Mg^{2+}$  baisse ou lorsqu'un peptide cationique antimicrobien se fixe, l'interaction entre le domaine périplasmique et la membrane est interrompue. La transmission d'information se ferait par des mouvements de cisaillement au niveau du domaine senseur, couplés à un mouvement de rotation des hélices transmembranaires relayé aux hélices des domaines HAMP et DHp pour permettre un changement d'activité (Goldberg et al., 2010; Lemmin et al., 2013; Molnar et al., 2014; Bhate et al., 2015).

### *c. Le modèle de rotation*

Des mouvements de rotation pour permettre la transduction de signal ont été observés pour le système LuxPQ impliqué dans le quorum sensing. LuxP est une protéine de liaison périplasmique qui fixe l'autoinducer-2 (AI-2) puis s'associe au domaine périplasmique de LuxQ, le senseur-kinase, qui est constitué de deux segments membranaires, d'un module kinase et d'un domaine receveur par monomère. La cascade de phosphorylation fait intervenir deux protéines supplémentaires, LuxU et LuxO qui sont respectivement une protéine de phosphotransfert et un régulateur de réponse. La fixation asymétrique de LuxP-AI-2 au domaine périplasmique de LuxQ induit une rotation des hélices transmembranaires nécessaire à la transmission d'information (Neiditch et al., 2006; Bhate et al., 2015).

La virulence de *Staphylococcus aureus* est régulée lorsque des peptides sécrétés (AIP pour 'autoinducing peptides') sont reconnus par le senseur-kinase AgrC du système à deux composants AgrCA. On retrouve des AIP agonistes ou antagonistes de la virulence. Les domaines senseurs comportant six segments transmembranaires sont reliés à la kinase d'AgrC par une jonction hélicale dont la conformation est impliquée dans la régulation de l'activité de la kinase. La fixation d'un agoniste ou d'un antagoniste va entraîner un mouvement de rotation des hélices précédant la kinase dans des directions opposées, permettant respectivement l'activation ou la répression de l'activité kinase (Fig. 56) (Wang et al., 2014).

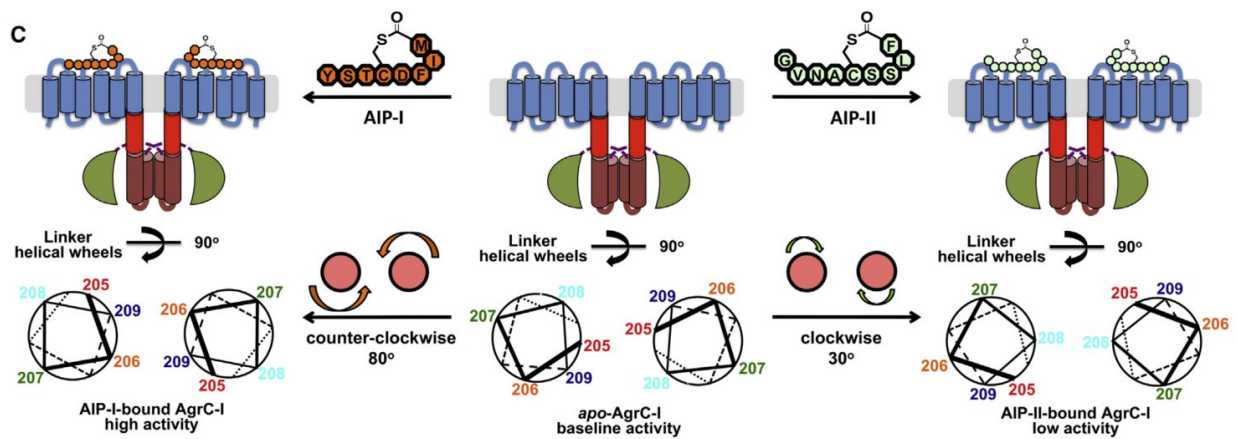


Figure 56 : Représentation schématique de l'effet de la liaison d'AIP sur la conformation des hélices entre les domaines senseur et kinase d'ArgC. La fixation d'AIP-I (agoniste) permet l'activation de la kinase grâce à un mouvement de rotation de 80° du linker TM-DHP dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. La fixation de l'antagoniste, AIP-II, induit un mouvement de rotation des hélices précédant la kinase de 30° dans le sens des aiguilles d'une montre conduisant à une diminution de l'activité kinase. Extrait de Wang et al., 2014.

Les différents exemples de mouvements présentés ci-dessus ont permis de donner un aperçu de la variété de changements de conformation qui permettent la transduction de signal et modifient l'activité des domaines effecteurs. La transmission d'information peut être plus complexe et faire intervenir une combinaison de ces différents mouvements au sein d'une même portion de la protéine ou de manière séquentielle, avec un domaine sujet à un type de mouvement et le domaine sous-jacent à un autre.

Nous allons à présent nous intéresser à la transduction de signal faisant intervenir les domaines HAMP constitués d'hélices  $\alpha$ .

### C. Les domaines HAMP : implication dans la transduction de signal

Les domaines HAMP sont composés d'un paquet de quatre hélices  $\alpha$  parallèles, deux provenant de chaque monomère. Ces hélices sont définies par une répétition d'heptades et la présence de résidus hydrophobes en positions 'a' et 'd'. Un résidu glycine conservé marque la fin de la première hélice et le début de la boucle précédant la seconde hélice. Un résidu glutamate conservé délimite quant à lui le début de la seconde hélice du HAMP. Lorsque le domaine est observé du dessus, le paquet d'hélices présente deux interfaces, une interface entre deux hélices proches, et une interface entre hélices plus éloignées (Bhate et al., 2015). Les domaines HAMP peuvent être échangés entre récepteurs (ex : entre l'histidine-kinase EnvZ et le chimiorécepteur Tar ou entre les deux histidine-kinases CpxA et NarX) permettant la production de chimères fonctionnelles mais qui présentent une activité altérée. Deux modes d'action peuvent être distingués pour les domaines HAMP. Tout d'abord un mode d'action mécanique, permettant de transmettre les changements de conformation entre deux domaines (signalisation en *cis*). Un second mode d'action est interactif grâce à la fixation spécifique aux domaines effecteurs (signalisation en *trans*) (Hulko et al., 2006).

Différents modèles ont été proposés pour expliquer la transduction de signal au sein d'une protéine grâce à ce domaine de signalisation.

## 1. Le modèle 'gearbox'

Le mécanisme de boîte de vitesses ('gearbox') suggère que le domaine HAMP est une structure bistable présentant deux états iso-énergiques proches qui s'inter-convertissement grâce à la rotation des hélices. Ainsi, deux conformations du HAMP ont pu être déterminées, une conformation knobs-to-knobs (organisation 'x-da') et knobs-into-holes (Fig 57) (Hulko et al., 2006; Mondéjar et al., 2012; Bhate et al., 2015).

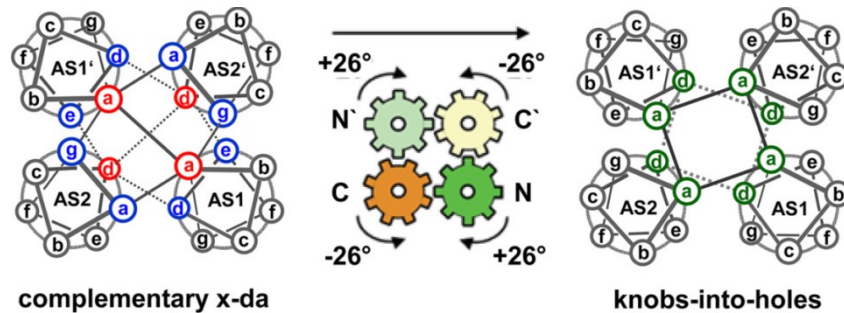


Figure 57 : Représentation schématique du modèle gearbox. Le passage d'une conformation des hélices en 'x-da' à une conformation knobs-into-holes se fait grâce à une rotation de 26° des quatre hélices, indiquée par des flèches. La conformation 'x-da' nécessite des résidus spécifiques à trois positions dans chaque hélice pour former un noyau hydrophobe, une dans la géométrie 'x' (en rouge) et deux dans la géométrie 'da' (bleu). Les knobs-into-holes canoniques utilisent deux résidus centraux dans la même géométrie. Extrait de Mondéjar et al., 2012.

La conformation en 'knobs-to-knobs' présente deux géométries distinctes, la couche 'x' dans laquelle les chaînes latérales pointent directement vers l'axe central du super-enroulement, et la couche 'da' dans laquelle les chaînes latérales pointent à l'extérieur pour former un anneau d'interaction de résidus entourant une cavité centrale. Dans le domaine HAMP, les couches 'x' et 'da' alternent le long des hélices, la structuration du domaine HAMP est possible en combinant les couches 'x' de l'hélice  $\alpha 1$  avec les couches 'da' de l'hélice  $\alpha 2$  et inversement pour former des couches mixtes 'x-da'. Il a alors été proposé que les domaines HAMP permettaient la transduction de signal par modification de leur arrangement des hélices soit en knobs-into-hole, soit en knobs-to-knobs (Hulko et al., 2006).

## 2. Le modèle de paquet dynamique

Le modèle du paquet dynamique ('dynamic bundle model') propose qu'un état de signalisation/conformation du HAMP serait significativement plus désordonné que l'autre. Ainsi, un domaine HAMP bien structuré et compact contraint le domaine en aval dans un état inactif. Un domaine HAMP mal structuré, moins compact, permet l'activation des domaines en aval (Bhate et al., 2015).

## 3. Le mécanisme de cisaillement diagonal

Ce modèle propose que le domaine HAMP alterne entre un état dans lequel les hélices sont compactes et un second dans lequel ces hélices s'étalent en partie C-terminale et forment un paquet instable (Bhate et al., 2015).

## 4. Exemple de transduction de signal dépendant d'un HAMP : PhoQ

Pour illustrer certains éléments exposés dans cette partie sur la transduction par les domaines HAMP, nous prendrons l'exemple du domaine HAMP du senseur-kinase PhoQ qui a été étudié par mutagenèse et grâce à des analyses de cysteine scanning. Il semblerait que

l'activation du système dépend d'une rotation accompagnée d'un mouvement d'écartement de la première hélice du domaine HAMP. Au niveau de ce domaine, est retrouvée une région riche en résidus chargés. Il a été supposé que cette région puisse interagir directement avec le domaine CA et ainsi en le séquestrant empêcher l'activité kinase. Les changements de conformation identifiés au niveau du domaine HAMP vont permettre de déstabiliser cette interaction, de libérer le domaine catalytique et donc permettre l'activité kinase (Fig. 58) (Matamouros et al., 2015).

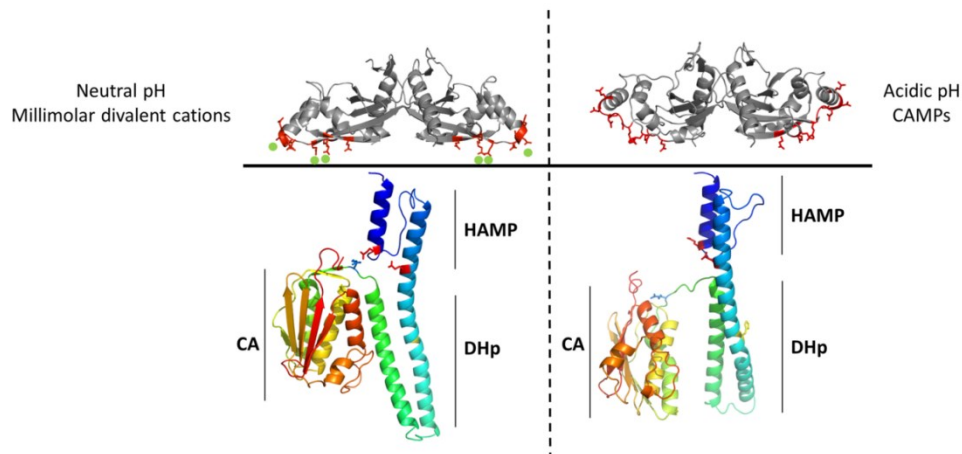


Figure 58 : Modèle d'activation de PhoQ. En absence de signal activateur (gauche), le domaine périplasmique est en contact avec la membrane par l'intermédiaire de cations divalents (point vert) se fixant entre le patch acide (représenté en rouge) et les têtes des phospholipides chargés négativement. Le domaine catalytique est maintenu à l'écart du domaine DHP (état de répression de l'activité kinase), menant à l'activité phosphatase. Les interactions entre le domaine CA et le DHP mais également les interactions au sein du domaine HAMP (en conformation 'a-d') et de la boucle connectant le CA au DHP participent à la stabilisation de l'état de répression. Après la perception d'un signal activateur (droite), un changement de conformation au niveau des domaines périplasmiques a lieu et est propagé à travers la région transmembranaire permettant la déstabilisation du domaine HAMP avec la mise en place de mouvement de rotation qui vont permettre probablement au HAMP d'adopter la conformation 'x-da'. Les interactions entre les domaines HAMP, DHP et CA sont déstabilisées, libérant ainsi le domaine CA pour favoriser l'activité kinase. Extrait de Matamouros et al., 2015.

Des exemples ont été choisis pour illustrer la transduction d'information au sein de protéines de signalisation et seront présentés dans les parties suivantes.

#### D. Transduction de signal d'un domaine PAS jusqu'à la kinase : l'exemple de la protéine chimérique YF1

Dans une étude visant à caractériser des mécanismes universels de transduction au sein des senseurs-kinases, le domaine PAS-B sensible à l'oxygène de l'histidine-kinase FixL de *Bradyrhizobium japonicum* a été remplacé par un domaine LOV sensible à la lumière provenant d'YtvA et liant le FMN. La protéine chimérique dénommée YF1 permet la phosphorylation de son régulateur de réponse FixJ dans le noir, de manière similaire à la protéine sauvage. Après l'absorption de lumière bleue, un lien covalent se forme entre le chromophore FMN et une cystéine au niveau du senseur LOV, résultant ainsi en une activité phosphatase d'YF1. Ceci supporte le fait que les domaines senseurs au sein des histidine-kinases peuvent être interchangeables. En effet, la protéine chimérique conserve la capacité de passer d'un état kinase à un état phosphatase suite à la perception d'un stimulus (cette fois la lumière bleue et non plus l'oxygène, qui est perçu par la protéine FixL sauvage). La structure cristallographique de cette chimère a été obtenue et différentes analyses de mutagenèse ont été

réalisées dans le but d'étudier la transduction de signal au sein de la protéine (Fig. 59). Dans cette structure, deux coiled coils existent de part et d'autre du domaine LOV, l'hélice A' $\alpha$ , insérée à l'interface entre les deux noyaux des domaines LOV du côté N-terminal et l'hélice J $\alpha$  C-terminale qui s'étend jusqu'au domaine DHp (Diensthuber et al., 2013).

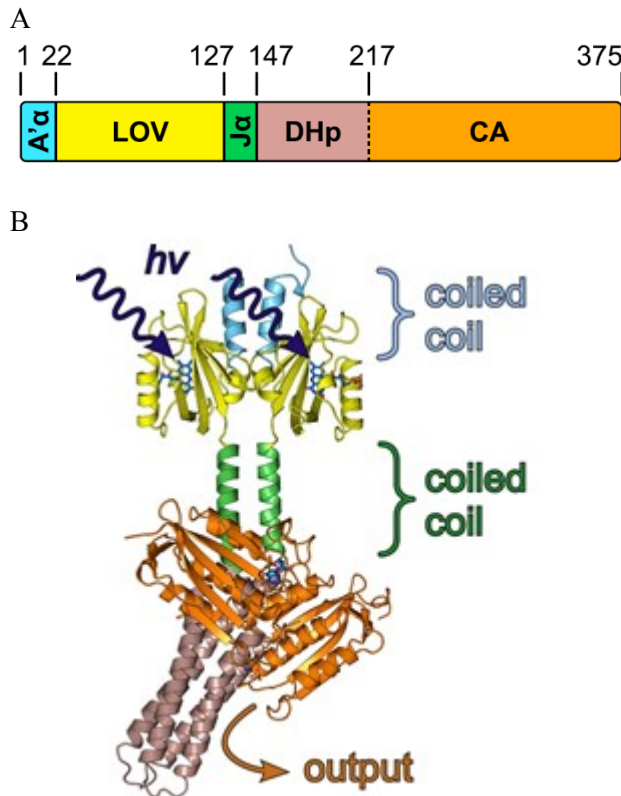


Figure 59 : La protéine chimérique YF1.

A. Représentation schématique de l'organisation d'YF1 avec ses différents domaines. B. Structure cristallographique d'YF1 (code PDB 4GCZ) dans son état actif à l'obscurité. Les différents domaines sont représentés par le même code couleur utilisé en A. Le FMN est représenté en bleu dans le domaine PAS, et les flèches bleues notées *hv* représentent le stimulus perçu pour permettre le passage en mode phosphatase. De l'ADP, représenté en bleu, a co-cristallisé dans le domaine catalytique. Les deux coiled coils de la protéine constitués des hélices A' $\alpha$  ou J $\alpha$  sont annotés. Extrait de Diensthuber et al., 2013.

Des travaux sur divers domaines PAS suggèrent que la transduction de signal est possible par des changements structuraux au niveau du feuillet  $\beta$  central (Möglich et al., 2009b). Les hélices A' $\alpha$  semblent cruciales pour l'activité de la chimère puisqu'elles gouvernent comment les signaux entrants sont transmis pour permettre le changement d'état d'activité : de simples mutations au niveau de ce coiled coil sont suffisantes pour abolir, atténuer ou même inverser la réponse au signal. Des analyses de mutagenèse ont aussi souligné le rôle du motif 'DIT' en sortie du domaine PAS. Ce motif se situe à l'interface entre le domaine LOV et le coiled coil J $\alpha$ . Destabiliser un pont hydrogène critique au niveau de cette région est suffisant pour altérer l'activité. Ainsi, la transduction de signal dépend de l'intégrité de la connexion entre les domaines PAS et les hélices J $\alpha$ . Il a été proposé un modèle de transduction de signal pour YF1 faisant intervenir un mécanisme de rotation d'hélices. En observant la structure de YF1, un axe peut être défini par l'interface entre les feuillets  $\beta$  et l'alignement des coiled coils A' $\alpha$  et J $\alpha$  (Fig. 60). Suite à l'absorption de la lumière, le domaine LOV subirait une rotation de 15° par rapport à cet axe. Notons que les hélices en amont subirait également cette rotation, augmentant ainsi l'angle de croisement de 29° à 70° après absorption de lumière. Le changement de structure quaternaire du domaine LOV induirait alors la rotation des hélices J $\alpha$  dont l'angle de croisement passerait de 33° à 49° après perception de la lumière et permettrait des torsions et l'obtention d'un sur-enroulement. Ces changements de



conformations des hélices se répercuteraient sur celles du DHP pour induire le passage vers la conformation phosphatase (Diensthuber et al., 2013).

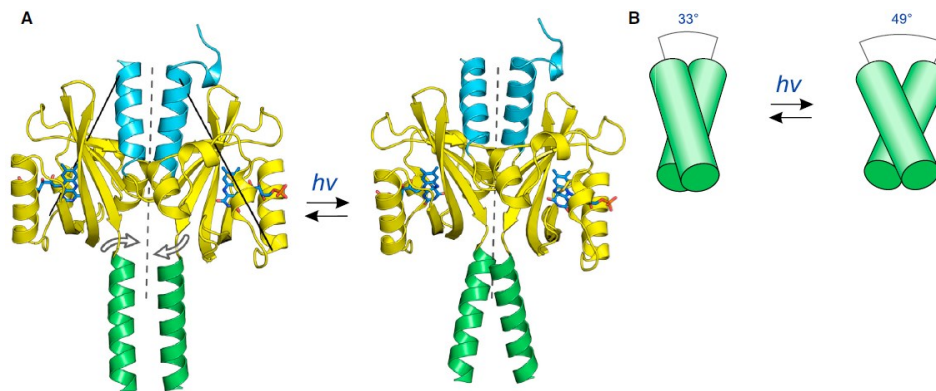


Figure 60 : Modèle de transduction de signal au sein d'YF1. A. A gauche est représentée la structure cristallographique obtenue pour la protéine chimérique en état kinase, à l'obscurité (code PDB 4GCZ). A droite est représenté un modèle de la protéine exposée à la lumière, obtenu par homologie avec la structure du domaine LOV de SB1 provenant de *Pseudomonas putida*. L'absorption de lumière induirait le réarrangement de structure quaternaire du domaine LOV causant un super-enroulement des hélices  $J\alpha$ , représenté par les flèches blanches. Le code couleur utilisé est le même que pour la figure 59. B. Représentation schématique de l'effet de l'absorption de lumière sur l'angle de croisement des hélices  $J\alpha$ . Extrait de Diensthuber et al., 2013.

### E. Transduction de signal des domaines senseurs membranaires jusqu'à la kinase : l'exemple de DesK

Le système à deux composants DesKR permet à *B. subtilis* de percevoir et de répondre au changement de température, en maintenant la fluidité de sa membrane. La protéine senseur DesK est sensible à l'épaississement de la membrane suite à une chute de la température, et va ainsi permettre l'activité kinase grâce à un changement de conformation. En effet, certaines données biophysiques suggèrent que la bicouche lipidique devient plus ordonnée après une baisse de la température, ce qui résulte en son épaississement. DesK phosphorylée active DesR, un activateur de la transcription des gènes *des* codant pour une désaturase d'acide gras ( $\Delta 5$  désaturase). Cette dernière permet la production d'acides gras insaturés afin de restaurer la fluidité de la membrane. Suite à cette modification de la membrane, DesK repassera alors en état phosphatase, caractérisé par un arrêt de la transcription des gènes *des* (Saita et al., 2015).

DesK est dépourvue de domaines extracellulaires mais comporte cinq hélices transmembranaires, dont la dernière s'étend dans le cytoplasme jusqu'au domaine kinase de classe I (HisKA\_3) (Albanesi et al., 2009; Trajtenberg et al., 2010; Saita et al., 2015).

#### 1. La région membranaire de DesK

Diverses délétions de la région membranaire ont montré que le domaine senseur et de transduction de signal pouvaient être contenus en un seul segment membranaire. En effet, la partie N-terminale de la première hélice transmembranaire peut être fusionnée à la partie C-terminale de la 5<sup>ème</sup> hélice transmembranaire sans affecter la capacité de DesK à percevoir la modification de la membrane, ni la transduction de signal (Cybulski and Mendoza, 2011).

Dans la partie N-terminale de la membrane de ce 'senseur minimaliste', un motif constitué de deux acides aminés hydrophiles (K10 et N12) semble être impliqué dans la perception de

l'épaisseur de la membrane. En effet, ces derniers sont situés juste en-dessous de l'interface eau-lipide et sont essentiels pour l'activité de DesK (Fig. 61 et 62). Il a été proposé que ces acides aminés agissent comme une bouée, stabilisant la position du segment transmembranaire. En effet, leurs chaînes latérales peuvent s'étendre jusqu'à l'interface hydrophile eau-membrane. Pour cette raison, ce motif a été appelé 'SB' pour 'sunken-buoy' (bouée immergée) (Cybulski et al., 2015).

De plus, en position C-terminale du segment transmembranaire, trois sérines sont importantes pour l'activité. En effet, la formation d'un serine zipper semble observable après une diminution de la température. Notons qu'à 37°C, il a été proposé que ces sérines interagiraient avec la surface hydrophile de la membrane (Fig. 61, Cybulski et al., 2015).

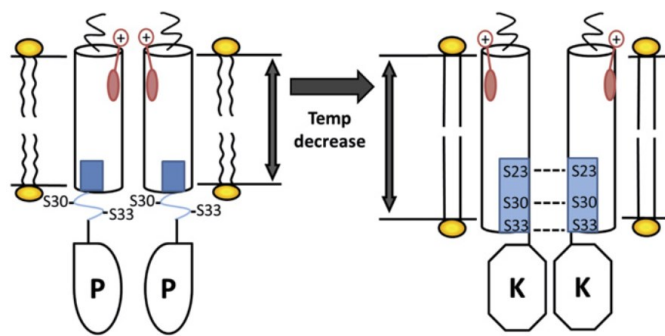


Figure 61 : Représentation schématique du fonctionnement du senseur minimaliste de DesK. En partie N-terminale du segment transmembranaire, le motif hydrophobe SB est retrouvé (K10, N12 en rouge). La partie C-terminale du segment transmembranaire présente le motif hydrophile composé des trois sérines (S23, S30 et S33 en bleu). A 37°C, la membrane est fluide, ces trois sérines interagiraient avec la surface hydrophile de la membrane. DesK est alors en mode phosphatase. Une diminution de la température augmente l'épaisseur de la membrane, permettant ainsi la formation du motif serine-zipper et le passage en mode kinase. Extrait de Cybulski et al., 2015.

## 2. La région sous-membranaire de DesK

De nombreuses charges (séquence KSRKERERLEEK) sont retrouvées dans l'hélice  $\alpha$  qui connecte les domaines senseurs transmembranaires au domaine catalytique cytoplasmique (Fig. 62). Il a été proposé que ce linker adopte deux états conformationnels en réponse au changement d'épaisseur de la membrane (Inda et al., 2014).

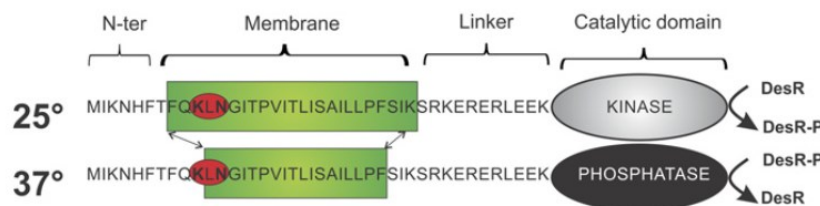


Figure 62 : Séquence de DesK sous sa forme minimaliste dépendante de la température. Sur ce schéma, sont représentés le domaine N-terminal, la membrane avec le motif SB entouré en rouge, le linker et le domaine catalytique. A 25°C, la membrane est épaisse, enfouissant ainsi le motif SB dans un environnement hydrophobe. A cette température, le domaine catalytique présente une activité kinase. A 37°C, la membrane est plus fine permettant ainsi d'exposer le motif SB à l'interface eau-lipide, DesK est alors en état phosphatase et déphosphoryle DesR. Extrait de Inda et al., 2014.

Ainsi, ce linker pourrait interagir avec les têtes des phospholipides et adopter une conformation 'déstructurée' caractérisée par une hélice discontinue lorsque l'épaisseur de la membrane est faible (37°C) ou adopter une conformation en hélice  $\alpha$  continue après augmentation de l'épaisseur de la membrane (25°C). La conformation déstructurée serait stabilisée par des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement du linker et les lipides membranaires chargés négativement. La conformation en hélice serait stabilisée



par la formation de ponts salins intra-hélices entre des résidus de charges opposées (Fig. 63) (Inda et al., 2014).

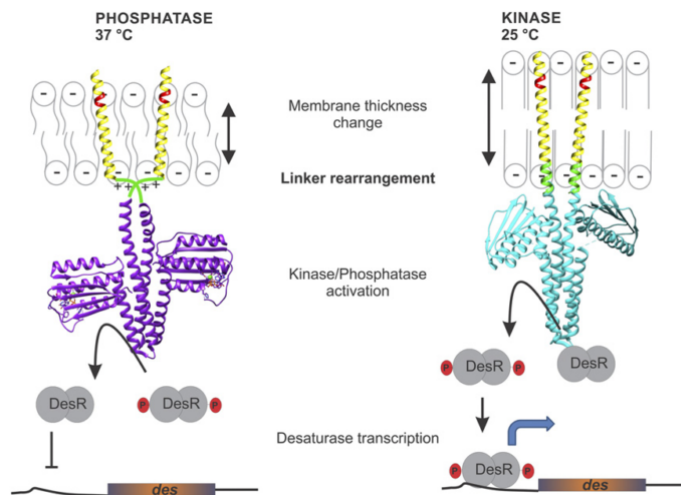


Figure 63 : Modèle d'activité de DesK suite à des changements de température. Le passage de l'état kinase vers l'état phosphatase et inversement dépendrait de l'interaction de la région chargée du linker (en vert) avec les têtes des lipides en surface de la membrane. L'augmentation de l'épaisseur de la membrane suite à une diminution de la température, entrave ces interactions, ce qui favorise la continuité de l'hélice entre le segment transmembranaire et le domaine kinase. Des interactions réversibles du linker avec les lipides de la membrane interviendraient ainsi dans le passage d'un mode à l'autre. Extrait de Inda et al., 2014.

Il a ensuite été proposé que la portion qui connecte le segment transmembranaire et le domaine DHp de la kinase forme un coiled coil (Fig. 64). Ce dernier correspondrait à une hélice de signalisation ('S-helix', voir ci-dessus). Récemment, le modèle d'une transition entre hélice et segment déstructuré, présenté ci-dessus, a été remis en cause. Un mécanisme alternatif est basé sur des transitions entre stabilisation et déstabilisation du coiled coil précédant le domaine kinase. Ainsi, lorsque la membrane est fluide, le domaine transmembranaire va stabiliser le coiled coil et le domaine catalytique en une conformation compacte et rigide, avec les domaines CA liant l'ATP attachés au domaine DHp. Cette conformation inhibe l'activité kinase, la surface du DHp peut alors interagir avec DesR phosphorylé. Le coiled coil est stabilisé grâce à des contacts internes hydrophobes, les résidus chargés restant exposés au solvant. Après une diminution de la température, la membrane devient plus épaisse, imposant un stress sur le coiled coil qui va aboutir à la libération du domaine portant l'ATP et ainsi permettre l'activité kinase. Le passage de l'état phosphatase à kinase serait caractérisé par une rotation de 90° de chacune des hélices, permettant ainsi l'exposition de plusieurs résidus hydrophobes, tandis que les résidus chargés seront retrouvés au centre de l'enroulement d'hélices. Ce modèle de stabilisation/déstabilisation est en accord avec un grand nombre de résultats déjà décrits ainsi qu'avec le modèle de serine zipper. La formation de ce dernier permettrait la stabilisation du coiled coil et serait dépendante de la rotation de 90° des hélices. Le serine zipper serait ainsi formé en mode phosphatase, contrairement au modèle précédent (Saita et al., 2015).

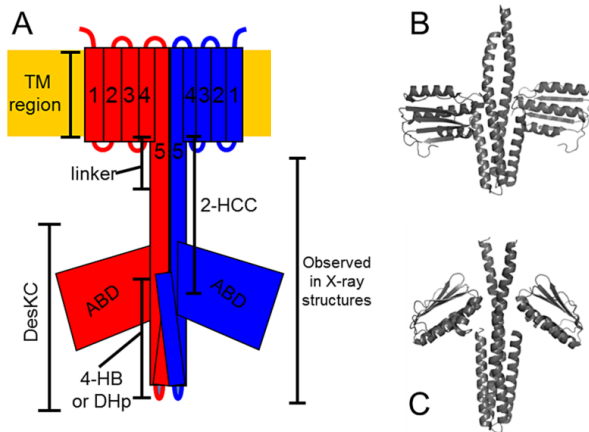


Figure 64 : A. Topologie de DesK déterminée à partir de structures connues, de prédictions de structure secondaire et de formation de coiled coil. Des structures de l'état phosphatase (B, code PDB 3EHJ) et de l'état kinase (C, code PDB 3GIE) sont présentées. Adapté de Saita et al., 2015).

Ainsi, la régulation de l'activité de DesK dépendrait de la conformation du linker précédant la kinase. Une stabilisation de ce coiled coil favorise l'état phosphatase tandis qu'une déstabilisation permet l'état kinase. Des mouvements de rotations des hélices sont impliqués dans le passage entre ces deux états du coiled coil (Saita et al., 2015).

#### F. Transduction de signal au sein des chimiorécepteurs

Les systèmes du chimiotactisme permettent à la bactérie de sentir et de réagir à des changements chimiques de son environnement, en modifiant le sens de rotation de son flagelle et donc son déplacement (Yu et al., 2015). Les chimiorécepteurs bactériens sont de longues protéines présentant un domaine périplasmique de liaison de ligand, une région transmembranaire, un domaine HAMP cytoplasmique, et un module de contrôle de la kinase (Fig. 65). Ce dernier est composé d'une région d'adaptation, d'une région charnière et d'une région d'interaction protéique (PIR). La région PIR permet la liaison à l'histidine-kinase CheA, grâce à l'intermédiaire de CheW, qui joue le rôle d'adaptateur entre les deux protéines. CheA sous sa forme active permet la phosphorylation de CheY, le régulateur qui contrôle la direction des moteurs flagellaires en fonction de son état de phosphorylation. Ce dernier est régulé par l'activité phosphatase de CheZ. La région d'adaptation du récepteur présente des résidus glutamine conservés qui sont sujets à une méthylation/déméthylation par des protéines auxiliaires, respectivement CheR et CheB. Notons que CheB requiert une phosphorylation par CheA pour permettre l'adaptation sensitive. La fixation de chimio-attractant va inhiber l'activité de CheA (kinase inactive, rotation du flagelle dans le sens inverse des aiguilles d'une montre permettant la nage). Cet effet est contré par la méthylation qui réactive la kinase et diminue l'affinité pour l'attractant. La fixation de répulsifs ou la libération de l'attractant active CheA (kinase active, rotation du flagelle dans le sens des aiguilles d'une montre, ce qui cause une nage désordonnée, dite 'tumbling') et ceci est contrecarré par la déméthylation. De manière générale, les systèmes de chimiotaxie sont regroupés en réseau au niveau de la membrane interne des bactéries, ce qui permet une réponse concertée (Samanta et al., 2015).

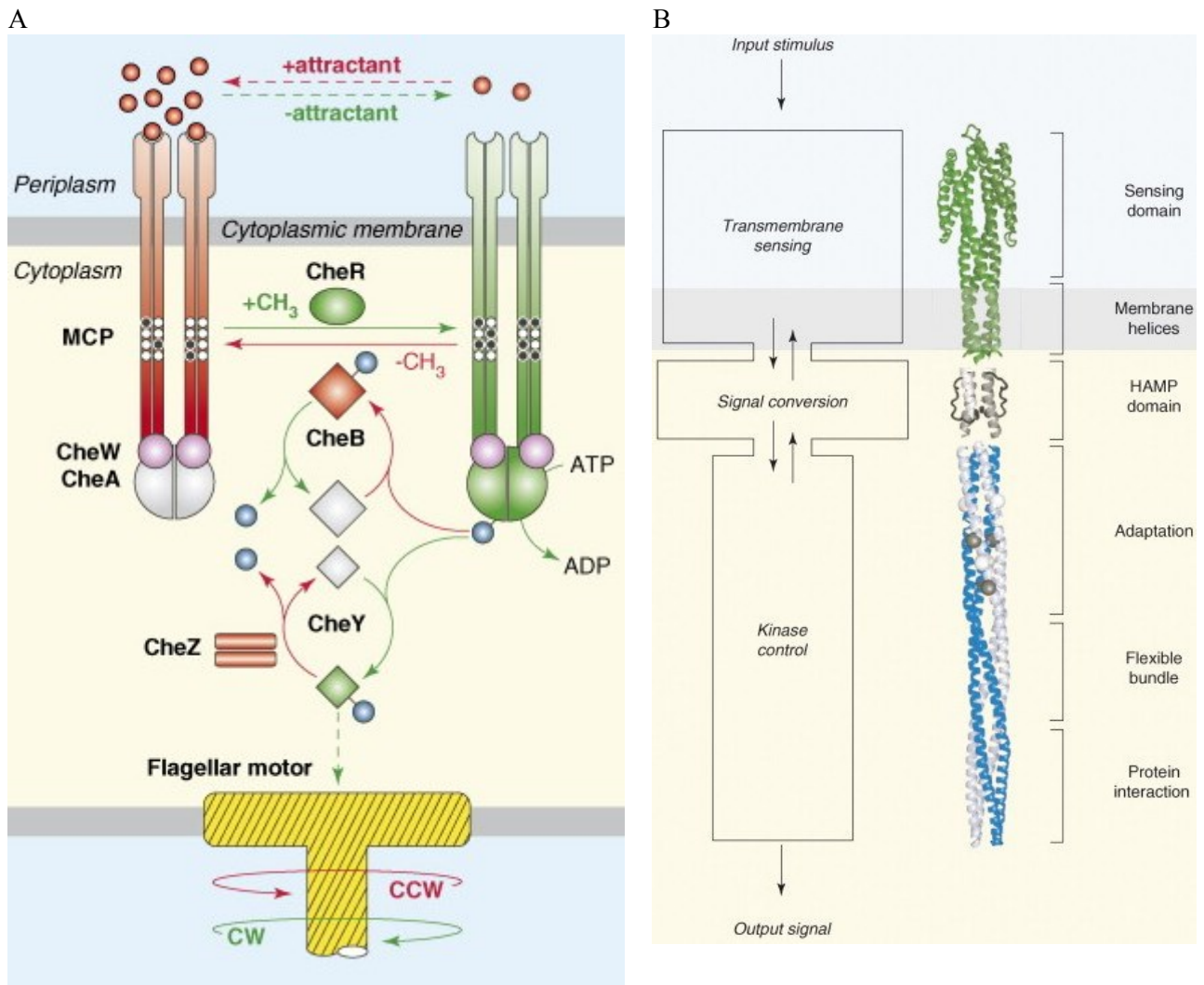


Figure 65 : La chimiotaxie chez *E. coli*. A. L'attractant représenté par des sphères rouges, se fixe au niveau du récepteur (MCP pour 'methyl-accepting chemotaxis proteins'). Les différentes protéines Che impliquées dans la transduction de signal sont représentées. En vert sont illustrés les réactions et composants qui favorisent la rotation horaire induisant des changements de direction aléatoire lors du déplacement de la bactérie ('tumbling'), tandis qu'en rouge sont représentés ceux qui favorisent la rotation anti-horaire du flagelle ('swimming'). Par défaut, les flagelles ont une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW), favorisant la nage. Les réactions enzymatiques sont représentées avec des lignes continues tandis que les lignes discontinues représentent les interactions de liaison. Les sphères bleues correspondent à CheA sous sa forme phosphorylée. Au niveau du récepteur, l'absence ou la présence de méthylation est indiquée respectivement par des cercles blancs ou noirs. B. Organisation du chimiorécepteur. Les modules sont indiqués sur la gauche, tandis qu'à droite les domaines sont davantage détaillés. Extrait de Hazelbauer et al., 2007.

Différents récepteurs de la chimiotaxie sensibles à divers stimuli ont pu être mis en évidence chez *E. coli*. Ainsi, nous pouvons citer Tsr qui fixe la sérine, Tar l'aspartate et le maltose, Tap les dipeptides et pyrimides, Trg le galactose et le ribose ou encore Aer qui est sensible à l'oxygène. Pour étudier la transduction de signal au sein des chimiorécepteurs, nous prendrons comme exemples ceux des récepteurs Tar et Aer.

### 1. Le chimiorécepteur Tar

Le domaine Tar est un récepteur liant l'aspartate et le maltose (Parkinson et al., 2015). Deux monomères Tar forment un homodimère stable (Yu et al., 2015). Le domaine senseur de Tar est constitué d'un enroulement de quatre hélices antiparallèles. La première et la quatrième hélice sont intégrées à la membrane et s'étendent dans le cytoplasme. Le domaine senseur

présente deux sites symétriques de liaison de l'aspartate (Baker et al., 2005). Il a été proposé sur base de structures cristallographiques que la transduction de signal au travers de la membrane se ferait par un mouvement de piston. Ainsi, après la liaison d'un attractant, la dernière hélice du domaine périplasmique, correspondant à la seconde hélice transmembranaire, coulisserait dans le cytoplasme. Ce modèle de piston est supporté par diverses expérimentations et simulations de dynamique moléculaire. Il a également été proposé qu'un mouvement de rotation soit couplé au mouvement de piston (Chervitz and Falke, 1996; Baker et al., 2005; Yu et al., 2015). D'autres acides aminés agissent comme des attractants pour Tar, mais avec des sensibilités plus faibles. Des ions métalliques tels que  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$  sont perçus comme des répulsifs, mais le mécanisme moléculaire mis en jeu n'est pas connu (Yu et al., 2015).

Suite à la perception de l'attractant, le mouvement de piston transmembranaire est relayé jusqu'au domaine HAMP grâce à un connecteur situé du côté cytoplasmique (Samanta et al., 2015). Le domaine HAMP de Tar forme un paquet de quatre hélices parallèles, organisé en un dimère de deux hélices amphipatiques connectées par un lien flexible (Wright et al., 2011). Le HAMP subirait un changement structural et de dynamique pour transmettre l'information au sein du récepteur selon un modèle de 'ying-yang'. Dans ce modèle, la région cytoplasmique du récepteur est divisée en deux unités : le module d'adaptation et la région PIR. Ces deux régions alternent leur degré de fluctuation de conformation suivant l'état de signalisation. Entre ces modules, une région flexible facilite le couplage conformationnel (Samanta et al., 2015). Il a été proposé que le domaine HAMP convertisse le mouvement de piston en un changement de conformation symétrique (Ames et al., 2008). Ainsi, des mouvements de rotations et de déplacement longitudinaux des hélices du domaine HAMP pourraient être impliqués dans le passage d'un état d'activité à un autre. Les hélices AS2 du domaine HAMP pourraient également être sujettes à des mouvements d'ouverture/cisaillement pour la transition entre les états inactif et actif de la kinase.

Beaucoup de récepteurs bactériens ou de protéines de transduction de signal présentent une construction modulaire. Pour permettre la propagation de signaux conformationnels, un domaine influence la stabilité des domaines adjacents grâce à des connexions qui sont souvent sous forme d'hélices  $\alpha$ . Ainsi, la fixation d'un attractant au niveau des domaines périplasmiques de Tar va permettre un mouvement de piston des hélices membranaires. Ce mouvement va relâcher le domaine HAMP, ce dernier adoptera une conformation déstabilisée fortement dynamique, et sera alors incapable d'influencer PIR, le laissant dans un état plus rigide, qui caractérise l'état d'activation de la kinase. A l'inverse, lorsque le domaine HAMP est stabilisé, la portion C-terminale du récepteur est moins stable et présente une dynamique accrue (Fig. 66, Samanta et al., 2015).

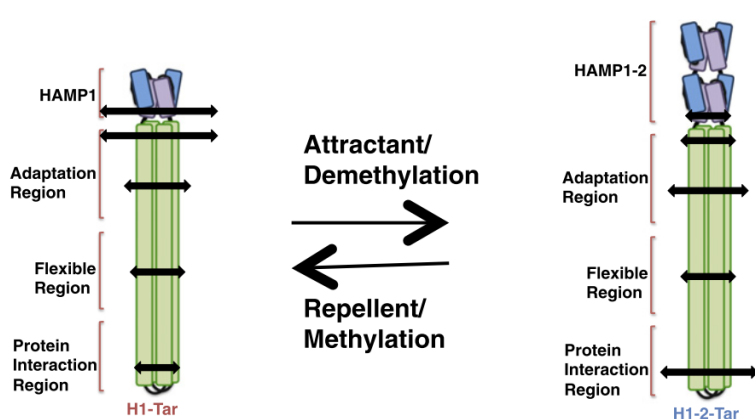


Figure 66 : Dynamique différentielle au niveau de Tar. Le domaine HAMP et la région PIR présentent des profils de dynamique différents dépendant de l'état d'activation du récepteur (représenté par la longueur des doubles flèches horizontales). H1-Tar caractérise la forme kinase active et H1-2-Tar la forme kinase inactive. Il s'agit de chimères présentant les domaines périplasmiques du chimiorécepteur Aer2 de *Pseudomonas aeruginosa*, fusionnés au module de contrôle de la kinase Tar. Extrait de Samanta et al., 2014.

## 2. Le chimiorécepteur Aer

Le récepteur pour l'aérotaxie Aer, permet de jauger le potentiel rédox de la bactérie grâce à son domaine senseur situé en partie N-terminale de la protéine (Fig.67). Il s'agit d'un domaine PAS cytoplasmique liant un cofacteur, le FAD. Un connecteur dénommé F1 suivi d'un ancrage membranaire en épingle permet de relier le domaine PAS à un domaine HAMP. Faisant suite à ce dernier, le module de contrôle de la kinase porte dans sa partie C-terminale une zone d'interaction protéique permettant le contrôle de la phosphorylation de CheA (Garcia et al., 2016).

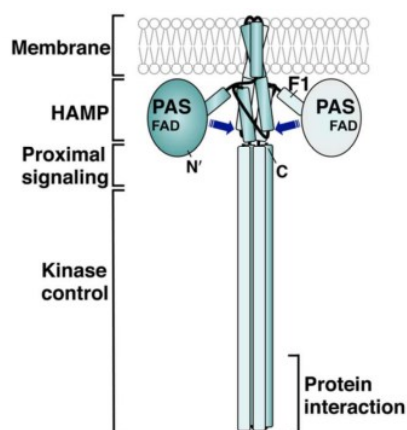


Figure 67 : Organisation du récepteur Aer sous forme dimérique. Le domaine PAS est proposé pour avoir des interactions avec le domaine HAMP et le domaine de signalisation proximal (représenté par des flèches bleues). Extrait de Garcia et al., 2016.

Chez Aer, le domaine HAMP est contrôlé par des interactions latérales avec le domaine PAS cytosolique. Le modèle actuel basé sur le degré de dynamique des différents modules (statique/dynamique) explique la transduction de signal au sein d'Aer (Fig. 68). Ainsi, la conformation inactive de la kinase est associée à une conformation stable et plus rigide du domaine HAMP, tandis que la conformation du récepteur donnant une kinase active est associée à un domaine HAMP plus dynamique. Un domaine HAMP peu stable semble être associé à un domaine de signalisation proximal stable, induisant une déstabilisation de la région de contrôle de la kinase, ce qui rend possible la phosphorylation de CheA. En condition d'aérobiose, les domaines PAS et HAMP peuvent interagir, le FAD au niveau du PAS est oxydé, favorisant ainsi l'inactivation de la kinase. Lors de l'activation de la kinase, une réorientation du domaine PAS aiderait à déstabiliser les interactions PAS-HAMP, permettant au domaine HAMP d'augmenter sa dynamique.

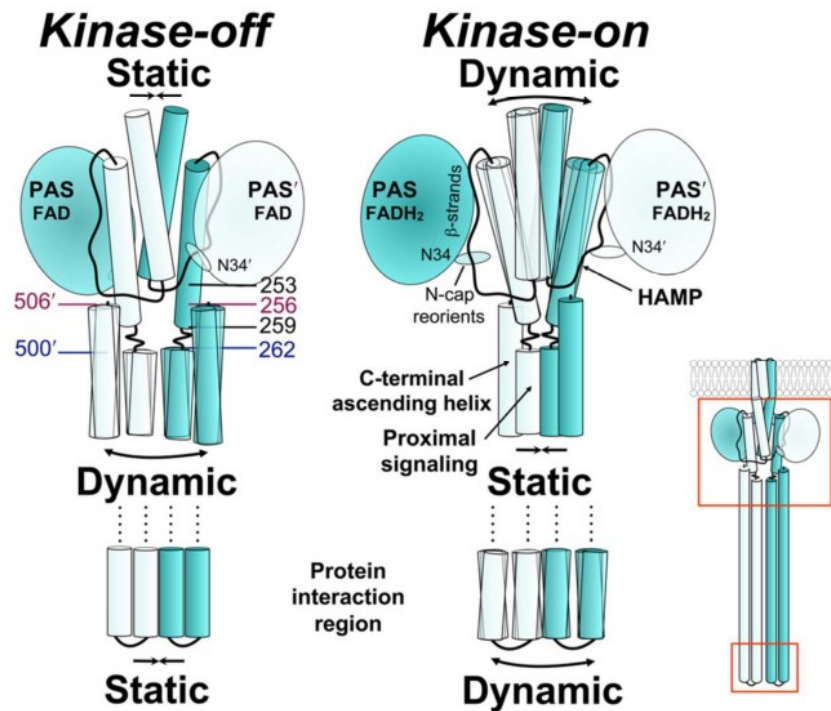


Figure 68 : Régulation de l'activité kinase d'Aer faisant intervenir différents états de dynamique. La réduction du FAD lié au PAS permet un changement de conformation qui diminue l'interaction entre les domaines PAS et HAMP. L'orientation relative entre le N-cap et le noyau du PAS subit également un changement, probablement par une altération de la stabilité des interactions PAS-HAMP. La diminution des interactions entre les domaines PAS et HAMP est accompagnée de l'inclinaison des hélices du HAMP, permettant à ce dernier d'adopter une structure plus relâchée et dynamique. Le domaine HAMP, le domaine de signalisation proximal ainsi que les régions d'interactions protéiques (PIR) sont en opposition de telle sorte qu'un domaine HAMP relâché résulte en un domaine proximal de signalisation statique et une région d'interaction protéique dynamique. Extrait de Garcia et al., 2016.

Le modèle suivant a été proposé pour le fonctionnement d'Aer. Lorsque *E. coli* rencontre un environnement dont la concentration en oxygène n'est pas suffisante pour maintenir le transport d'électrons, le FAD dans le domaine PAS est réduit et protoné. Ceci conduit à un réarrangement conformationnel du domaine PAS, altérant ainsi ses interactions avec le domaine HAMP. Ce dernier sera alors plus dynamique permettant l'activation de la kinase et la modification de direction pour chercher une source d'oxygène. Lorsque la bactérie sera en environnement aérobie, le FAD sera oxydé et les interactions entre le PAS et le HAMP seront maintenues, résultant en un domaine HAMP statique et une kinase inactive (Garcia et al., 2016).



## VI. Objectifs de la thèse

Le système à deux composants BvgAS joue un rôle clé dans l'infection de *Bordetella pertussis*, grâce au contrôle de l'expression des gènes de virulence. Le senseur-kinase BvgS, présente comme particularité une activité kinase à l'état basal. La perception de basse température ou de molécules chimiques abolit l'activité kinase et permet le passage de la bactérie en phase avirulente. BvgS est composé de trois domaines putatifs de perception. Il s'agit des deux domaines VFT périplasmiques ainsi que du domaine PAS cytoplasmique. Des études précédemment menées au laboratoire ont permis d'initier leur caractérisation. Ainsi, BvgS serait sous forme dimérique. La portion périplasmique jouerait un rôle important dans l'activité de BvgS et serait le site de fixation du nicotinate, un modulateur de la virulence. Le domaine PAS, quant à lui, pourrait avoir un rôle mécanique en transmettant à la kinase les changements de conformation imposés par les VFT. En effet, l'activité de BvgS requiert un domaine PAS présentant une conformation compacte et stable. Les mécanismes impliqués dans la perception de signaux ainsi que dans la transmission de cette information au sein de BvgS restent à élucider. Ces analyses permettront de caractériser les états actif et inactif de BvgS ainsi que la transition entre ces deux états.

L'objectif de cette thèse a été d'analyser la relation structure/fonction de BvgS en développant deux axes majeurs de recherche : la caractérisation des domaines putatifs de perception et l'étude de la transmission de signaux au sein de BvgS.

Ainsi, la région périplasmique de BvgS a été étudiée afin de déterminer les conditions qui maintiennent le senseur-kinase actif et comment les modulateurs sont perçus et affectent le système. Des études préliminaires *in silico* et *in vivo* avaient suggéré que la dynamique de la portion périplasmique régule l'activité du senseur-kinase. Une étude approfondie de la dynamique de cette portion de BvgS a donc été réalisée. Les seuls ligands inhibiteurs de l'activité kinase sont efficaces à de fortes concentrations et ne sont possiblement pas les ligands naturels rencontrés par la bactérie à l'intérieur de l'hôte. Il faut ajouter qu'aucun ligand n'a jusqu'à ce jour été identifié pour le domaine VFT1. Celui-ci pourrait être le site de fixation d'un ligand antagoniste pour induire la variation phénotypique. Une recherche de ligands a donc été entreprise.

La transmission d'information des domaines périplasmiques jusqu'à la kinase reste une énigme. Au sein de BvgS et des homologues de BvgS présentant deux domaines VFT, des connecteurs en hélices  $\alpha$  permettent la liaison des

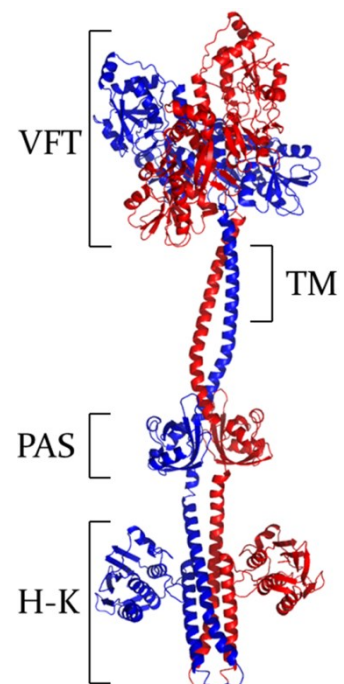


Figure 69 : Modèle *in silico* de BvgS jusqu'au domaine histidine-kinase (H-K) comprenant les domaines périplasmiques (VFT), les hélices transmembranaires (TM) ainsi que le domaine PAS. Les couleurs bleue et rouge correspondent à chacun des deux monomères.

différents domaines de la protéine (Fig. 69). La topologie et la dynamique des connecteurs présents entre les domaines périplasmiques et le domaine enzymatique de BvgS ont été analysées pour comprendre leur rôle dans la régulation de l'activité de BvgS.

Mon dernier objectif a été de caractériser la fonction du domaine PAS pour déterminer s'il est impliqué dans la fixation d'un ligand ou s'il sert uniquement à la transduction mécanique du signal. Une analyse topologique a été initiée pour caractériser l'interface du domaine PAS et le changement de structure quaternaire qui s'opère suite à la perception d'un stimulus.

# Résultats



## **VII. Les domaines périplasmiques de BvgS : siège de l'activité et de la perception des stimuli chimiques impliqués dans la régulation de la virulence.**

Le senseur-kinase BvgS présente au niveau de sa portion périplasmique deux domaines VFT, appelés VFT1 et VFT2. Ces domaines semblent jouer un rôle important pour l'activité du système étant donné que de courtes délétions dans chacun d'eux ou des mutations ponctuelles de leurs interfaces au sein du dimère inactivent BvgS. Le domaine proximal à la membrane, le VFT2, lierait un modulateur négatif de la virulence, l'ion nicotinate, ainsi que d'autres ions apparentés. La structure cristallographique de la portion périplasmique de BvgS sous sa forme dimérique montre une conformation compacte avec un entrelacement des monomères. Les VFT1, présentant une charnière dépourvue de structure secondaire, sont en conformation ouverte, tandis que les VFT2 sont en conformation fermée sans fixation de ligand, leur charnière étant constituée de brins  $\beta$ . Il a alors été proposé que la mobilité des domaines VFT1 ainsi que les interfaces entre les deux chaînes du dimère soient importantes pour l'activité de BvgS.

### **A. Effet du nicotinate sur la portion périplasmique de BvgS**

Les travaux ayant permis de déterminer le rôle du nicotinate sur la conformation et dynamique des domaines VFT de BvgS ont été valorisés par une publication d'article dans le journal JBC 'Journal of Biological Chemistry' (Dupré et al., 2015b). Cet article dans lequel je suis premier auteur co-équivalent avec le Dr Elian Dupré sera présenté ci-après dans sa version originale et résumée.

#### **1. Signal Transduction by BvgS Sensor Kinase: Binding of modulator nicotinate affects the conformation and dynamics of the entire periplasmic moiety.**

## 2. Résumé

Les figures qui seront référencées dans ce résumé correspondent à celles de l'article ci-dessus.

Dans ce travail, l'activité phosphatase de BvgS a été analysée grâce à la technique de Phos-tag permettant de déterminer la quantité de BvgA phosphorylé dans un lysat de culture bactérienne. De manière générale pour déterminer l'activité de BvgS, nous utilisons un gène rapporteur *lacZ* en fusion transcriptionnelle avec des gènes appartenant au régulon BvgS (soit *ptx* soit *fhaB*). Ici, nous avons pu suivre directement l'activité de BvgS, en s'intéressant au régulateur de réponse. Après l'addition de modulateur négatif tel que le nicotinate ou le chloronicotinate, une déphosphorylation rapide du régulateur de réponse est observable (Fig. 2a et 2c). L'ajout de nicotinamide, molécule s'apparentant au nicotinate mais qui n'est pas un modulateur, n'influence pas la quantité de BvgA phosphorylé (Fig. 2d). La déphosphorylation spontanée de BvgA a été vérifiée avec un lysat de *B. pertussis* incubé à 37°C. Il s'est avéré que la forme phosphorylée de BvgA est stable dans le temps (Fig. 2b). Ainsi, la diminution de la quantité de BvgA phosphorylé après l'ajout de modulateur reflète une activité phosphatase plutôt qu'une déphosphorylation spontanée au cours du temps. L'effet *in vivo* des modulateurs est alors rapide et spécifique. Le nicotinate ou des molécules apparentées ont ensuite été utilisés pour déterminer les mécanismes qui régulent l'activité de BvgS.

Des études préliminaires sur les domaines VFT isolés, par la technique de dénaturation thermique TSA ('Thermal Shift Assay') avaient permis de mettre en évidence la stabilisation du domaine VFT2 contre la dénaturation thermique, suite à l'ajout de nicotinate (Herrou et al., 2010). Nous avons décidé de caractériser les interactions des modulateurs avec la protéine périplasmique entière sous sa forme dimérique. Pour ce faire, des expériences d'ITC ('Isothermal Titration Calorimetry') ont d'abord été entreprises. Malheureusement, aucune courbe de liaison interprétable n'a été obtenue, soulignant le fait que l'affinité du modulateur pour la protéine est trop faible pour être détectée par cette technique. En effet, des concentrations millimolaires sont nécessaires pour obtenir des effets *in vivo*. Des analyses d'ITC sur la protéine dimérique présentant la mutation F<sub>317</sub>A dans la cavité du domaine VFT2, qui confère une sensibilité accrue de BvgS à la modulation, ont également été réalisées en utilisant le chloronicotinate comme modulateur puisqu'il permet de moduler BvgS à de plus faibles concentrations que le nicotinate *in vivo*. Deux sites de fixation par dimère, avec une constante de dissociation (K<sub>d</sub>) d'environ 200 μM, ont alors pu être déterminés (Fig. 3a). Une seconde technique a ensuite été utilisée pour déterminer l'affinité du ligand pour la protéine. Il s'agit de la thermophorèse, qui permet de mesurer des affinités nanomolaires à millimolaires en solution grâce à des changements dans la diffusion de la protéine entre ses états libre et ligandé, à travers un gradient de température induit par un laser. J'ai participé aux analyses de thermophorèse et à la production des protéines recombinantes, à leur marquage, l'acquisition des données ainsi que l'analyse des résultats. Avec la protéine dimérique présentant la mutation F<sub>317</sub>A, des K<sub>d</sub> de 200 et 1200 μM ont été déterminés respectivement pour le chloronicotinate et le nicotinate (Fig. 3b et c), alors qu'aucune affinité n'a été détectée pour le nicotinamide pris comme contrôle. De même la protéine dimérique sauvage a été analysée et a montré des états lié et libre, mais aucune constante d'affinité n'a pu être déterminée avec les deux modulateurs testés. Ainsi, les deux techniques utilisées ont



permis de mettre en évidence que BvgS présente un site de liaison de faible affinité par monomère pour le chloronicotinate et le nicotinate. Les constantes de dissociation obtenues sont cohérentes avec les concentrations utilisées pour la modulation *in vivo*.

Des mutations dans la cavité du VFT2 ont un effet sur la sensibilité aux modulateurs. Ainsi, la mutation F<sub>317</sub>A confère une plus grande sensibilité aux modulateurs, et les mutations F<sub>375</sub>E+Q<sub>461</sub>E altèrent le potentiel électrostatique positif de la cavité, abolissant ainsi les effets du nicotinate (Herrou et al., 2010). Ceci supporte le fait que le nicotinate exerce son effet sur BvgS en se liant au VFT2. Nous avons alors décidé de contraindre le VFT2 dans une conformation fermée pour empêcher la fixation de modulateur. Ainsi, deux ponts disulfure distincts ont été introduits entre les deux lèvres de ce domaine (Fig. 4a et b). L'activité des variants obtenus a été déterminée par l'utilisation de notre système rapporteur chez *B. pertussis*. Ils présentent tous deux une activité kinase quasi normale à l'état basal, mais leur sensibilité aux modulateurs est altérée. L'un est devenu non modulable (BvgS<sub>C355-C442</sub>) et l'autre hypersensible aux modulateurs (BvgS<sub>C316-C445</sub>) (Fig. 5). Ainsi, la transition vers le mode phosphatase induite par la perception de modulateur, implique un changement de conformation des VFT2, qui est facilité par le pont disulfure entre les résidus 316 et 445 et inhibé par le pont entre les résidus 355 et 442. Des simulations de dynamique moléculaire ont alors été réalisées pour mesurer l'évolution au cours du temps des distances séparant ces résidus cystéine, avec ou sans ajout de nicotinate. Les simulations réalisées avec du nicotinate montrent que les distances entre les résidus diminuent, ce qui suggère que le nicotinate stabilise une forme plus compacte du VFT2 (Fig. 4c). La fixation du modulateur induirait un mouvement des lobes du VFT2 l'un par rapport à l'autre, ce qui pourrait expliquer les phénotypes obtenus pour les deux variants avec un pont disulfure.

Les lobes des VFT peuvent être considérés comme des corps rigides. Afin de déterminer l'importance de l'intégrité de ces derniers pour la modulation, des résidus présentant des chaînes latérales impliquées dans des interactions pour le maintien de la structure du lobe ont été remplacés par des alanines (Fig. 5). L'activité des variants a été déterminée *in vivo*. L'intégrité du lobe 2 du VFT1 serait nécessaire pour permettre la transition du mode kinase vers le mode phosphatase puisque le mutant BvgS<sub>D175A-Y178A</sub> est insensible à la modulation. Au contraire, un lobe 1 du VFT1 moins contraint facilite la réponse au modulateur car le mutant BvgS<sub>W280A</sub> est hypersensible. Au niveau du VFT2, relâcher l'un ou l'autre lobe entrave le passage vers le mode phosphatase (mutants BvgS<sub>W525A</sub> et BvgS<sub>Q463A</sub>, insensibles). Il avait été montré précédemment que des interactions entre VFT1 et VFT2 sont nécessaires pour la réponse à la modulation (Dupré et al., 2015a). Différentes combinaisons de mutants ont alors été réalisées pour étudier les interactions entre les domaines VFT (Fig. 5). Elles ont indiqué que l'intégrité des lobes et les interfaces entre VFT sont nécessaires pour permettre le passage du mode kinase vers le mode phosphatase.

Afin d'étudier la dynamique des domaines périplasmiques ainsi que la communication entre ces derniers, des analyses de résonance paramagnétique électronique (RPE) en onde continue ont été réalisées. Cette technique permet d'étudier des systèmes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés (Ferhat, 2008).

Avec les protéines, elle est utilisée pour caractériser la mobilité de certaines régions, par le greffage ciblé d'une 'sonde de spin', le MTSL ((1\_oxyl-2,2,5,5-tetraméthyl- $\Delta$ 3-pyrroline-méthyl) Méthanethiosulfonate) sur un résidu cystéine (Fig. 70).

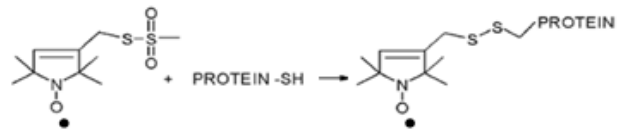


Figure 70 : Greffage du MTSL sur le groupement SH d'une protéine. Adapté de Crane et al., 2010.

La RPE permet d'obtenir, grâce à la détection de l'absorption par l'échantillon d'un rayonnement électromagnétique, des informations sur la mobilité de la sonde et de la protéine. La sonde une fois fixée sur la protéine est contrainte et perd son caractère isotrope (Pfeiffer et al., 1999). La mobilité de la sonde dépend alors du mouvement interne de sa chaîne latérale, du mouvement global de la protéine et de l'environnement de la sonde, donc de la structure secondaire à laquelle elle est greffée et de ses contacts tertiaires.

J'ai réalisé les différentes expériences se rapportant aux analyses de résonance paramagnétique électronique de la portion périplasmique de BvgS, incluant la construction des différents mutants, la production des protéines, leur purification et marquage, ainsi que l'acquisition et l'analyse des différents résultats.

La portion périplasmique de BvgS ne contient pas de résidu cystéine. Ainsi, des résidus exposés à la surface et situés en bordure des lèvres des lobes (appelés L1 et L2) des VFT1 et VFT2, ont été substitués en cystéine pour permettre la fixation de la sonde de spin. Trois cystéines permettent un marquage au MTSL, il s'agit des résidus C<sub>113</sub> pour VFT1-L1 (lobe 1 de VFT1), C<sub>177</sub> pour VFT1-L2 et C<sub>316</sub> pour VFT2-L1 (Fig. 6a). Aucun marquage n'a été obtenu sur le résidu C<sub>442</sub> dans le VFT2-L2. Le spectre de BvgS-p113-R1 (portion périplasmique de BvgS marquée sur le résidu 113 du VFT1-L1), présente des pics fins caractéristiques d'un mouvement rapide de la sonde. Pour le marquage du lobe 2 du VFT1 (BvgS-p177-R1) le spectre est plus large mais le pic central reste encore assez fin, montrant une mobilité plus limitée. Le marquage au niveau du VFT2-L1 (BvgSp-316-R1) présente un spectre avec des pics larges, très étalé et à plusieurs composantes, indiquant un ensemble de conformations dont la dynamique est très limitée. Ainsi, en conditions basales, un gradient de mobilité décroissant est observable au niveau des domaines périplasmiques, avec le lobe 1 du VFT1 très mobile, le lobe 2 du VFT1 avec une mobilité intermédiaire et le VFT2 majoritairement peu mobile. L'acquisition des spectres a également été réalisée après l'ajout de modulateur à la protéine recombinante dimérique. Seule la protéine BvgS-p177-R1 présente une modification de son spectre après la perception de modulateur. Ce dernier est caractérisé par une augmentation de la composante lente et une diminution de la composante rapide (Fig. 6c). L'effet de modification du spectre est faible mais reproductible, et les concentrations utilisées sont celles qui permettent la modulation *in vivo*. Pour valider ces observations, d'autres modulateurs tels que le chloronicotinate et l'isonicotinate ainsi que deux molécules ne présentant pas de pouvoir de modulation (succinate et nicotinamide) ont été utilisés. Les mêmes modifications de spectres sont observables avec les autres modulateurs tandis qu'aucune modification n'est détectable avec les molécules ne permettant pas le passage en mode phosphatase *in vivo* (Fig. 6d). La fixation du nicotinate au niveau du

VFT2 a donc un effet à longue distance au sein des domaines périplasmiques, avec notamment le ralentissement du lobe 2 du VFT1. L'interface entre le lobe 2 du VFT1 et le lobe 1 du VFT2 serait alors renforcée. Ce bloc plus rigide pourrait exercer une force sur les hélices transmembranaires et ainsi modifier leur conformation et leur dynamique pour permettre la transition du mode kinase vers le mode phosphatase du domaine enzymatique cytoplasmique.

La technique de RPE a également été utilisée pour déterminer les effets de substitutions spécifiques qui rendent BvgS insensible à la modulation par le nicotinate (mutations F<sub>375</sub>E+Q<sub>461</sub>E, Q<sub>463</sub>A, W<sub>525</sub>A et D<sub>175</sub>A+Y<sub>178</sub>A). Deux marquages ont été utilisés, au niveau du lobe 2 du VFT1 ou du lobe 1 du VFT2. Les différents spectres obtenus présentent des altérations de la dynamique des domaines VFT, excepté pour les mutations F<sub>375</sub>E+Q<sub>461</sub>E qui dissipent le potentiel électrostatique positif de la cavité du VFT2 et entravent la fixation du nicotinate (Fig. 7). Ainsi, les spectres obtenus pour la protéine BvgS-p<sub>F375E+Q461E</sub> sont semblables à ceux de la protéine sauvage, mais aucune modification de spectre n'est observable après ajout de nicotinate à la protéine présentant un marquage sur le résidu 177. La mutation Q<sub>463</sub>A dans le VFT2-L2, dissipe les interactions qui s'établissent entre ce résidu glutamine et le lobe 2 du VFT1 de l'autre monomère mais également avec la charnière du VFT2. Le spectre obtenu pour la protéine BvgS-p<sub>Q463A</sub> avec un marquage sur le résidu C<sub>316</sub> est différent de celui de la protéine sauvage (augmentation de la composante rapide avec un élargissement de la composante lente) tandis qu'aucune modification de spectre n'est observable pour un marquage du lobe 2 du VFT1 en absence ou en présence de nicotinate. Cette substitution qui affecte le VFT2 semble donc perturber les interactions VFT2-VFT1 nécessaires pour la transduction de l'information. Pour la substitution W<sub>525</sub>A dans le VFT2-L1, qui affaiblit les interactions entre le VFT2-L1 et l'hélice H18 au centre du dimère, une augmentation de la composante lente du spectre de la protéine marquée dans le VFT1-L2 est observable, tandis qu'aucune modification de spectre n'est détectable pour un marquage du lobe 1 du VFT2. La diminution de la dynamique du VFT1-L2 suggère qu'en perturbant l'intégrité structurelle du lobe 1 du VFT2 par l'introduction de la mutation W<sub>525</sub>A, les contacts entre VFT1-L2 et VFT2-L1 sont renforcés. Toutefois, cette mutation rend BvgS insensible à la modulation probablement car les VFT2 sont trop lâches pour permettre la transduction de l'information aux hélices C-terminales H19. La combinaison de mutations D<sub>175</sub>A+Y<sub>178</sub>A dans le VFT1-L2 donne un spectre présentant une augmentation de la composante rapide pour un marquage au niveau du VFT2-L1. Les mutations du VFT1-L2 permettent alors une légère augmentation de la dynamique du VFT2-L1, ce qui pourrait causer l'insensibilité aux modulateurs. Ainsi, les mutations étudiées qui rendent BvgS insensible au nicotinate sans affecter son activité kinase, ont permis de mettre en évidence l'importance de l'intégrité des lobes ainsi que d'une communication entre VFT2 et VFT1 pour le transfert du signal négatif au sein des domaines périplasmiques.

Nous avons pu mettre en évidence que le VFT2 est le site de fixation du nicotinate et que cette liaison réduit la mobilité du lobe 2 du VFT1 grâce au renforcement des interfaces entre VFT2 et VFT1-L2. Le bloc rigide ainsi formé, constitué du VFT2 et du lobe 2 du VFT1, va imposer une force/tension au niveau des hélices H19 périplasmiques s'étendant dans la

membrane, pour permettre le passage du mode kinase vers le mode phosphatase de la région cytoplasmique de BvgS.

### 3. Résultats complémentaires

Différentes analyses ont été réalisées en parallèle de celles exposées dans le papier ci-dessus. Les résultats ainsi obtenus seront présentés dans la partie suivante.

#### a. Dynamique des VFT

Les analyses de résonance paramagnétique électronique ont été poursuivies pour quelques mutants insensibles à la modulation (BvgS<sub>N231A</sub> et BvgS<sub>D175A+Y178A</sub>).

La mutation N<sub>231A</sub> au niveau du lobe 2 du VFT1 permet d'altérer la connexion entre le VFT1-L2 et la boucle C-terminale qui précède l'hélice H19, la dernière hélice périplasmique. Le mutant ainsi obtenu est actif mais ne répond pas à la modulation induite par le nicotinate. Il semblerait que la mutation perturbe/dissipe les interactions s'effectuant entre le VFT1 et l'extrémité C-terminale du VFT2. La mutation a été introduite dans la protéine recombinante dimérique pour les analyses de RPE avec un marquage au niveau du lobe 2 du VFT1 (177-R1) et du lobe 1 du VFT2 (316-R1). Les spectres ainsi obtenus sont semblables à ceux de la protéine sauvage, mais aucune modification de spectre n'est observable après l'ajout de modulateur, en accord avec l'insensibilité induite par la mutation N<sub>231A</sub> (Fig. 71).

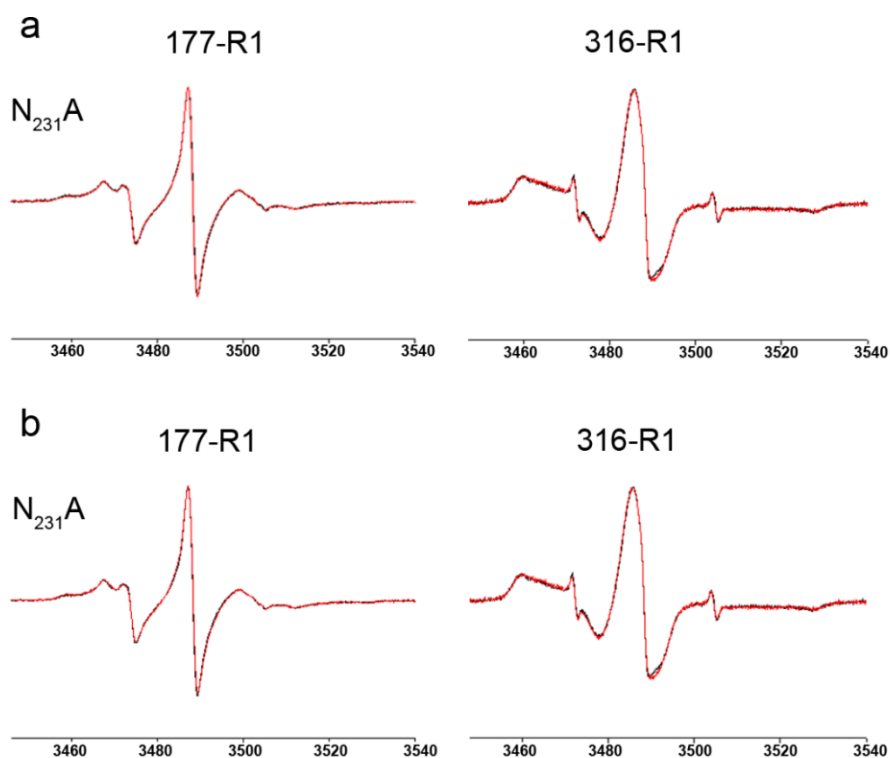


Figure 71 : Etude de l'effet de la mutation N<sub>231A</sub> (VFT1-L2) sur la dynamique de la portion périplasmique de BvgS par analyse de RPE. a. Comparaison des spectres obtenus après marquage au niveau du lobe 2 du VFT1 (177-R1) et du lobe 1 du VFT2 (316-R1) pour la protéine sauvage (courbe en noir) et la protéine présentant la mutation N<sub>231A</sub> (courbe en rouge). b. Comparaison des spectres obtenus pour la protéine mutée en absence (courbe en noir) ou en présence de 20 mM de nicotinate (courbe en rouge) pour les deux positions de marquage (177-R1 et 316-R1).

Ainsi, il semblerait que la déconnexion du lobe 2 du VFT1 de la boucle C-terminale empêche la transmission d'information entre le VFT2 et le VFT1-L2, puisque ce dernier n'est plus ralenti après la perception de modulateur. Pour expliquer ces résultats deux hypothèses peuvent être proposées. La mutation N<sub>231A</sub> relâche le VFT1-L2, celui-ci ne pourrait alors plus former de bloc rigide avec le VFT2 après la perception de modulateur. Il se pourrait

également que la boucle C-terminale joue un rôle dans l'interaction entre le VFT2 et le VFT1-L2 après la fixation de nicotinate au VFT2. Dans ce cas, la boucle déconnectée du VFT1 ne pourrait plus exercer son action sur ce dernier. On peut imaginer que le VFT2, suite à la fixation de nicotinate déforme la boucle C-terminale qui va 'tirer' le VFT1-L2 vers le VFT2 au lieu d'effectuer son action directement sur le VFT1-L2.

Pour le mutant BvgS<sub>D175A+Y178A</sub>, la dynamique du lobe 2 du VFT1 n'a pas pu être déterminée étant donné que les mutations présentes de part et d'autre du site de marquage (177-R1) risquaient d'affecter la dynamique de la sonde par un changement de son environnement proche. La position 113, en bordure du lobe 1 du VFT1 a été utilisée pour déterminer la dynamique de ce mutant. Le spectre obtenu montre une très légère augmentation des pics correspondant à une forme de plus forte mobilité, comparé à celui obtenu pour la protéine sauvage (Fig. 72). Ainsi, les mutations D<sub>175</sub>A+Y<sub>178</sub>A augmentent légèrement la dynamique du VFT1, il se peut que ce dernier n'arrive plus à adopter sa conformation modulée ce qui expliquerait son insensibilité aux modulateurs. Il a été montré que le VFT2 était également rendu plus mobile par ces mutations, et cette mobilité accrue pourrait entraver le transfert de l'information au niveau du VFT1, ou la fixation du nicotinate pourrait être perturbée. Malheureusement les techniques dont nous disposons pour déterminer la fixation de nicotinate au niveau du VFT2 dans la protéine dimérique ne nous permettront pas de déterminer une constante de dissociation pour ce mutant étant donné la faible affinité de nos modulateurs (cf les résultats de thermophorèse obtenus pour la protéine sauvage et celle portant la mutation F<sub>317</sub>A).

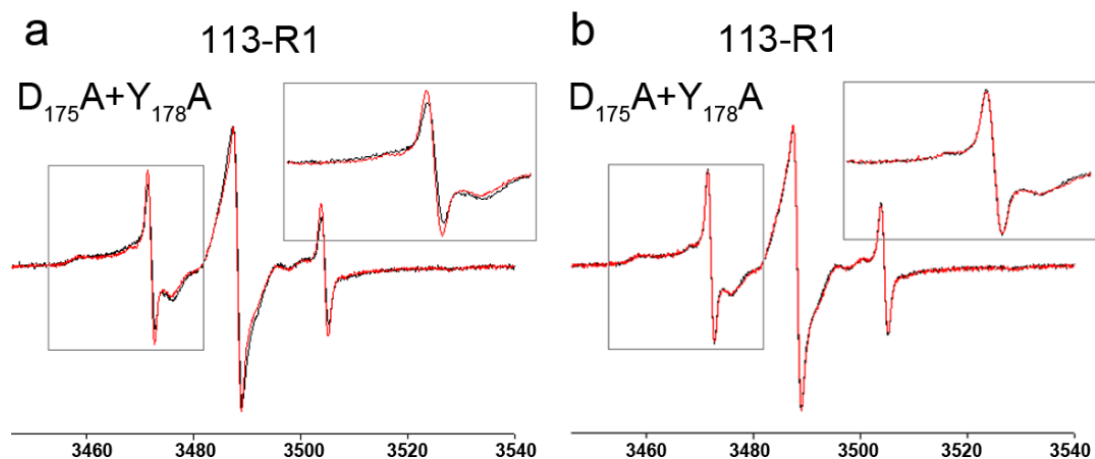


Figure 72 : Complément d'étude de l'effet des mutations D<sub>175</sub>A+Y<sub>178</sub>A (VFT1-L2) sur la dynamique de la portion périplasmique de BvgS par analyse de RPE. a. Comparaison des spectres obtenus après marquage au niveau du lobe 1 du VFT1 (113-R1) pour la protéine sauvage (en noir) et la protéine présentant la mutation (en rouge). b. Comparaison des spectres obtenus pour la protéine mutée en absence (noir) ou en présence de 20 mM de nicotinate (rouge).

### *b. Importance de l'intégrité des lobes des VFT*

Nous avons voulu déterminer, grâce à des analyses de TSA, si des mutations au niveau du VFT2 qui rendent BvgS insensible à la modulation entravaient la fixation du nicotinate. Avec cette technique, seule la protéine VFT2 isolée permet d'obtenir des résultats convaincants et analysables. En effet, il est difficile d'obtenir un profil de dénaturation interprétable pour la protéine dimérique complète. Les mutations W<sub>525</sub>A (VFT2-L1) et Q<sub>463</sub>A (VFT2-L2) ont été introduites dans la protéine VFT2 monomérique, mais il s'est avéré que ces dernières

perturbait la production ou la stabilité de cette protéine recombinante, puisque très peu de protéine était détectable sur gel après induction et lyse bactérienne (non montré). Ainsi, ces différentes mutations semblent affecter de manière considérable le domaine VFT2 isolé, ce qui souligne la nécessité de l'intégrité de ces domaines pour l'activité de BvgS. Au sein du dimère, ces mutations semblent être acceptées et ceci peut s'expliquer par la compacité du dimère, stabilisé par de nombreuses interactions.

### B. Effet du sulfate de magnésium sur la portion périplasmique de BvgS

Le sulfate de magnésium permet suite à sa perception au niveau d'un ou plusieurs sites de BvgS encore non défini(s), le passage en mode phosphatase. Nous avons ainsi voulu déterminer quels seraient les effets de l'ajout de  $MgSO_4$  sur la dynamique de la portion périplasmique. La démarche expérimentale a été la même que celle présentée dans le papier précédemment décrit (Dupré et al., 2015b), à l'exception que 50 mM de  $MgSO_4$  ont été ajoutés à la protéine sauvage présentant un marquage au MTSL soit du lobe 1 ou du lobe 2 du VFT1, ou du lobe 1 du VFT2, avant acquisition des différents spectres. L'ajout de  $MgSO_4$  aux protéines marquées au niveau du lobe 1 du VFT1 (113-R1) ou du lobe 1 du VFT2 (316-R1) ne semble pas modifier l'allure générale des spectres obtenus, indiquant l'absence d'effet sur ces régions de la protéine (non montré). L'ajout de  $MgSO_4$  à la protéine marquée dans le lobe 2 du VFT1 (177-R1) induit une légère modification du spectre, avec principalement une augmentation de la composante lente (Fig. 73). Le sulfate de magnésium induit donc un effet comparable à celui du nicotinate sur la dynamique du lobe 2 du VFT1. Ces résultats laissent à penser que le sulfate de magnésium pourrait se fixer au niveau de la portion périplasmique de BvgS, et que ces deux types de modulateurs induiraient des effets semblables au niveau des domaines périplasmiques du senseur-kinase. Ceci n'exclut bien sûr pas la possibilité qu'il se fixe également en d'autres sites, cytoplasmiques, de BvgS.

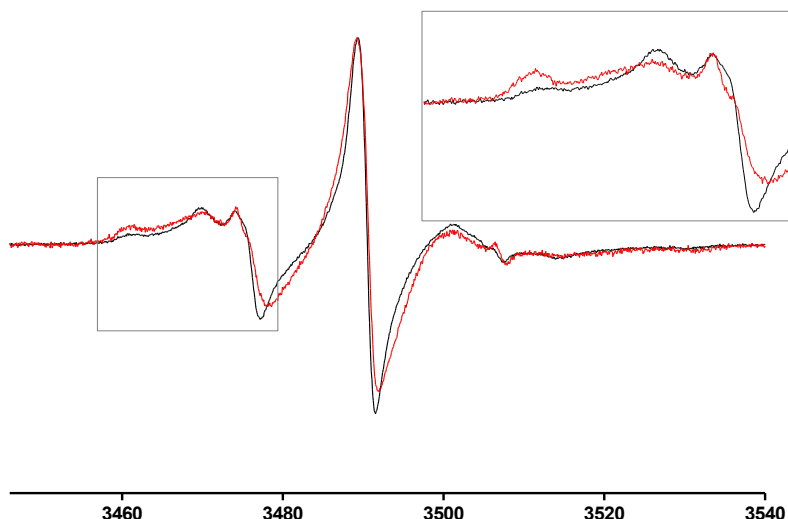


Figure 73 : Effet de l'ajout de sulfate de magnésium (50 mM) sur la dynamique du lobe 2 de VFT1 (protéine BvgS-p177-R1). Superposition des spectres obtenus en absence (courbe en noir) ou suite à l'ajout de sulfate de magnésium (courbe en rouge).

Il est à noter que l'effet du  $MgSO_4$  sur la portion périplasmique a été testé pour différentes mutations induisant une insensibilité de BvgS aux modulateurs (mutations  $Q_{463}A$  et  $W_{525}A$ )



grâce à un marquage du VFT1-L2, mais aucune modification des spectres n'a été obtenue, comme observé pour le nicotinate.

### C. Bilan sur l'analyse des domaines périplasmiques de BvgS

Différentes études ont été menées pour aider à la compréhension de la perception et de l'effet du nicotinate sur la portion périplasmique de BvgS. Les résultats ainsi obtenus ont été synthétisés dans le schéma bilan, présenté ci-dessous (Fig. 74).

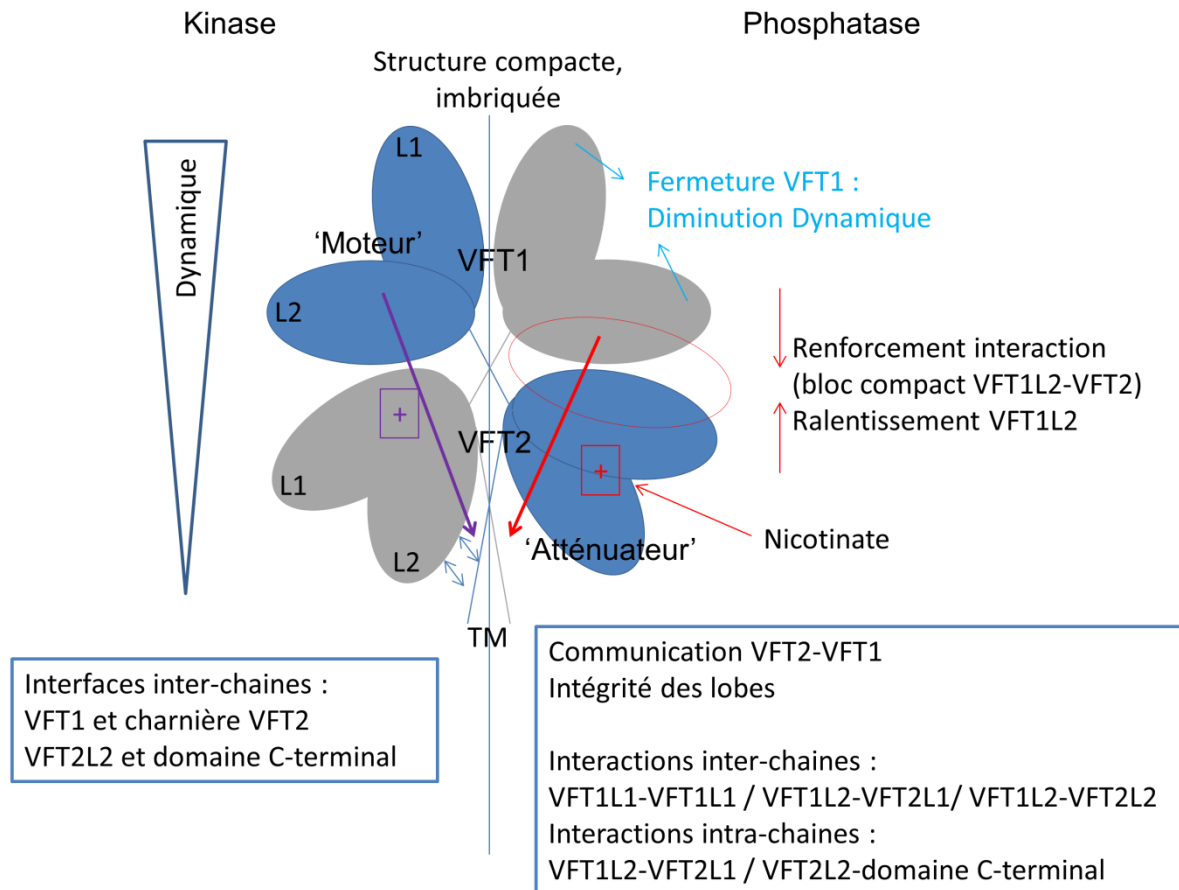


Figure 74 : Les domaines périplasmiques de BvgS présentent une organisation dimérique compacte avec un entrelacement des deux chaînes colorées en bleu ou gris. Le VFT1 est en conformation ouverte et servirait de moteur à l'activité du système tandis que le VFT2 est en conformation fermée sans fixation de ligand et jouerait un rôle d'atténuateur suite à la perception de nicotinate pour permettre le passage en mode phosphatase. A l'état kinase, un gradient décroissant de dynamique est observable au sein des domaines VFT, avec le lobe 1 du VFT1 très mobile, le lobe 2 du VFT1 présentant une mobilité moindre et le lobe 1 du VFT2 avec une dynamique très ralentie. Pour l'activité basale kinase, l'importance de la dynamique des VFT1 et des interfaces inter-chaînes a été mise en évidence. La dynamique des domaines périplasmiques serait relayée (représentée par une flèche et une croix violette) par les hélices H19 s'étendant à travers le segment transmembranaire pour permettre l'activité kinase. La fermeture du VFT1 par l'introduction d'un pont disulfure pour mimer la fixation d'un ligand antagoniste permet le passage à l'état phosphatase. La cavité du VFT2 présentant un potentiel électrostatique positif (représenté par une croix rouge) est le site de fixation du nicotinate. Ce dernier stabilise une forme compacte du domaine et induit des mouvements relatifs des lobes du VFT2 l'un par rapport à l'autre. La fixation de nicotinate renforce l'interface VFT2-VFT1-L2, ce qui favorise la formation d'un bloc rigide et ralentit la dynamique du lobe 2 du VFT1. Les modifications de conformation et de dynamique suite à la fixation de nicotinate (représentées par une flèche rouge) causent une modification de la conformation/dynamique des segments transmembranaires pour permettre la transmission d'information jusqu'au module enzymatique. Pour la transition de l'état kinase à l'état phosphatase, la communication entre les VFT2 et les VFT1 ainsi que l'intégrité des lobes sont importants, suggérant un état de transition de plus haute énergie. De nombreuses interactions inter- et intra-chaînes sont nécessaires pour opérer cette transition suite à la fixation du nicotinate.

## VIII. Etude de la transduction de signal au sein de BvgS

Nous avons vu précédemment les effets d'un modulateur négatif, le nicotinate, sur la portion périplasmique de BvgS. Les modifications de dynamique et de conformation, suite à la perception du modulateur, vont être transmises au sein de BvgS pour permettre le passage en mode phosphatase du domaine enzymatique. Au sein de BvgS, les dernières hélices de la portion périplasmique s'étendent au travers de la membrane et il est prédit qu'elles se poursuivent jusqu'au domaine PAS cytoplasmique. Ce dernier est également relié par des hélices  $\alpha$  à la kinase. Ces connecteurs en hélices  $\alpha$  sont prédits pour former des coiled coils et servent vraisemblablement de 'linkers' mécaniques. En effet, ils sont très conservés parmi les isolats de *B. pertussis* et joueraient un rôle dans la transduction de signal en modifiant la position relative des hélices ou leur dynamique. Pour comprendre la transmission d'information au sein de BvgS, nous nous sommes intéressés aux hélices  $\alpha$  reliant les VFT à la kinase en étudiant leur topologie ainsi que leur dynamique.

### A. Régulation de la kinase de BvgS : importance du coiled coil situé entre les domaines PAS et kinase

Le coiled coil reliant le domaine PAS à la kinase va avoir un impact direct pour la régulation de l'activité de BvgS suite à la perception du modulateur par les VFT et la transmission du signal par le domaine PAS. Différents travaux ont été menés pour étudier la topologie et la dynamique du linker et ainsi pouvoir déterminer les règles pour la régulation de BvgS. Les résultats obtenus ont été valorisés par une publication d'article dans le journal mBio (Lesne et al., 2016) et seront présentés ci-dessous dans leur version originale et grâce à un résumé.

#### 1. Balance between coiled coil stability and dynamics regulates activity of BvgS sensor-kinase in *Bordetella*

## 2. Résumé

Les figures citées dans ce résumé correspondent à celles du papier ci-dessus.

Le coiled coil reliant le domaine PAS au domaine DHp de la kinase est composé de trois heptades présentant des résidus leucines et alanines au niveau de cinq des six positions centrales du coiled coil ('a' et 'd') définissant un motif 'LxxxLxxAxxxAxxA' (Fig. 1). Différentes insertions et délétions ont été réalisées en se basant sur les travaux de Möglich et al. (2009) afin de déterminer comment le registre du coiled coil influence la régulation de la kinase. L'insertion de 1, 4 et 7 résidus ou la délétion de 7 résidus ont le même effet et inactivent BvgS (Fig. 2). Grâce à des alignements de séquence d'homologues de BvgS présentant deux domaines VFT, nous avons pu mettre en évidence que la taille du linker de BvgS (21 résidus) était conservée dans 96% des séquences d'homologues contenant un domaine PAS. Il semblerait également que la composition de cette région soit conservée dans la famille (Fig. 3). La taille ainsi que l'interface des hélices semblent importantes pour l'activité de BvgS, supportant un rôle mécanique pour ce linker.

Des analyses de 'cysteine scanning' ont été entreprises pour étudier la topologie et la dynamique du linker. Pour ce faire, une protéine tronquée présentant les domaines VFT jusqu'à la kinase et avec une étiquette de six histidines ajoutée en partie C-terminale de la protéine pour faciliter sa détection, a été produite chez *E. coli* (protéine dénommée BvgS<sup>t</sup>). Notons que les deux cystéines natives du domaine PAS et du site catalytique de la kinase ont été substituées, ce qui n'affecte pas l'activité de base de BvgS mais diminue sa sensibilité aux modulateurs chimiques. Un modulateur plus efficace, le chloronicotinate, a donc été utilisé pour permettre le passage en mode phosphatase. Les mutations ont également été introduites chez *B. pertussis* (la protéine sous sa forme complète mais modifiée est appelée BvgS<sup>fl</sup>) pour déterminer l'activité des différents variants obtenus (Fig. S2). Un traitement oxydant à l'aide de cuivre o-phenanthroline a été réalisé pour favoriser la formation de pont disulfure intra-dimère de BvgS<sup>t</sup> dans le cytoplasme d'*E. coli*. A l'état basal, la formation de pont disulfure est observée pour toutes les positions testées, dans des proportions différentes. Ainsi, une proportion plus importante de dimère est observable pour les substitutions en cystéine aux positions 'a' et 'd' du coiled coil, mais également au niveau des positions flanquant ces résidus (Fig. 4). Ces résultats indiquent qu'à l'état kinase, le coiled coil est fortement dynamique. La topologie et la dynamique du linker ont également été étudiées en condition phosphatase après l'ajout de chloronicotinate 30 minutes avant oxydation. Les résultats obtenus montrent que pour les positions 'a' et 'd' du coiled coil, une augmentation de la production de dimère est observable. Une diminution de la formation de pont disulfure est visible pour les autres positions du coiled coil. L'état phosphatase de BvgS semble caractériser par un coiled coil plus rigide entre le domaine PAS et la kinase, adoptant son interface hydrophobe centrée sur les positions 'a' et 'd'.

Le motif LLAAA semble jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de BvgS. Ainsi, des modifications de ce dernier ont été entreprises dans le but de renforcer ou déforcer le coiled coil. Les trois alanines ont été successivement remplacées par des leucines pour obtenir un leucine zipper, et les deux leucines ont été remplacées par des alanines afin d'affaiblir l'interface hydrophobe (Fig. 5). Des calculs de l'énergie d'interaction au sein de

chaque coiled coil ont été réalisés et montrent que l'introduction de leucines permet la stabilisation du coiled coil (Fig. 5B). Le remplacement des leucines par des alanines, permet quant à lui l'obtention de valeurs plus élevées de pseudo-énergie d'interaction par résidu, indiquant une déstabilisation du coiled coil. Ces différents remplacements ont également été effectués *in vivo* chez *B. pertussis*. Le remplacement de la première alanine du motif par une leucine donne un mutant actif et davantage sensible à la modulation que la souche sauvage tandis que les remplacements de 2 ou 3 alanines du motif par des leucines, mènent à l'inactivation de BvgS. Ainsi, le remplacement de la première alanine par une leucine va induire un coiled coil plus stable que celui de la protéine sauvage, ce qui va favoriser le passage en mode phosphatase en nécessitant une plus faible concentration de modulateur. La stabilisation trop importante du coiled coil (avec le remplacement de 2 ou 3 alanines) empêche la kinase d'adopter sa conformation active. Le remplacement des leucines par des alanines permet quant à lui l'obtention de mutants actifs mais insensibles à la modulation. Le coiled coil ainsi généré semble trop déstabilisé pour adopter la conformation correspondant à l'activité phosphatase.

Au sein de la famille de BvgS, 35% des senseurs-kinases ne possèdent pas de domaine PAS et présentent à la place, des hélices  $\alpha$  s'étendant de la membrane jusqu'au domaine DHp de la kinase (Fig. 3). Ces dernières présentent des tailles variées et portent généralement le motif LLAAA. Pour déterminer le rôle du domaine PAS dans la signalisation, nous avons procédé à la délétion de ce dernier sur base d'un homologue dépourvu de domaine PAS. Trois délétions ont alors été réalisées et diffèrent chacune d'un résidu pour reconnecter les hélices flanquantes de manière fonctionnelle. Aucun variant obtenu n'a présenté d'activité kinase (Fig. S4). Ces résultats suggèrent que les régions en amont et aval du domaine PAS n'ont pas évolué pour fonctionner ensemble en absence de domaine PAS. Nous avons alors décidé de changer d'approche en remplaçant la portion entre le segment transmembranaire de BvgS et le domaine kinase par des séquences provenant d'homologues dépourvus de domaine PAS et présentant des tailles différentes. Toutes les chimères obtenues sont dotées d'une activité kinase (Fig. 6). La sensibilité au modulateur dépend notamment de la taille du linker, ainsi les chimères présentant un linker de grande taille entre la membrane et le DHp, sont sensibles au modulateur, alors que les plus petites ne le sont pas. Les deux chimères sensibles au modulateur (BvgS $\Delta$ PAS-R3 et BvgS $\Delta$ PAS-R4) présentent une énergie d'interaction par résidu considérablement plus faible que les autres chimères (BvgS $\Delta$ PAS-R1 et BvgS $\Delta$ PAS-R2, non sensibles au modulateur et présentant un linker de plus petite taille), indiquant ainsi que les linkers des deux longues chimères adoptent plus facilement une conformation stable du coiled coil (Fig. S5).

Etant donné que le motif LLAAA est également retrouvé dans les séquences de nos chimères sans PAS, des modifications de celui-ci ont été entreprises dans la chimère de plus petite taille, qui est insensible au modulateur (BvgS $\Delta$ PAS-R1). Le renforcement du coiled coil par la substitution de la première alanine du motif par une leucine permet de restaurer la sensibilité au modulateur (Fig. 7). Le remplacement successif des autres alanines permet d'obtenir des mutants inactifs. Ainsi, la stabilité du coiled coil favorise le passage en mode phosphatase. Les mêmes règles de régulation de la kinase sont observables avec et sans domaine PAS. Il est

probable que les homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS régulent leur activité kinase par la fermeture de leur domaine VFT. Nous avons ainsi voulu tester cette hypothèse en induisant la fermeture du VFT1 de BvgS par l'introduction d'un pont disulfure pour deux de nos chimères, BvgS $\Delta$ PAS-R1 et BvgS $\Delta$ PAS-R1-1L, respectivement insensible et sensible au modulateur. La fermeture du VFT1 affecte l'activité du variant R1 et abolit totalement celle du variant R1-1L (Fig.7). La fermeture des domaines VFT par un pont disulfure, mimant la fixation d'un ligand antagoniste, permet le passage en mode phosphatase même pour les linkers de petite taille. Il s'agit donc d'un signal plus fort que celui donné par le nicotinate.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la taille et l'interface du coiled coil entre le domaine PAS et la kinase sont critiques pour l'activité de BvgS. L'état kinase serait favorisé par un coiled coil dynamique, tandis que l'état phosphatase serait permis lorsque le coiled coil adopte une conformation plus rigide centrée sur son interface hydrophobe. Cette balance entre rigidité et dynamique s'applique également en absence de domaine PAS et semble en accord avec les récents travaux impliquant un mécanisme de flip-flop pour la régulation de la kinase (Mechaly et al., 2014). Le domaine PAS de BvgS est dispensable pour l'activité kinase mais semble jouer un rôle amplificateur de signaux négatifs et faciliter la transition vers l'état phosphatase. Nous proposons un modèle dans lequel le domaine PAS pourrait présenter deux interfaces. A l'état kinase, l'interface de ce dernier empêcherait le coiled coil en dessous d'adopter son interface hydrophobe, ce qui induirait la dynamique du coiled coil. La perception du signal modulateur devrait modifier l'interface du domaine PAS, permettant ainsi au coiled coil en aval d'adopter une conformation rigide caractéristique de l'état phosphatase.

## B. Transmission d'information des domaines VFT jusqu'au domaine PAS

Nous avons vu que la régulation de la kinase de BvgS dépendait d'une balance entre rigidité et flexibilité du coiled coil entre le domaine PAS et la kinase. Un second linker prédit pour former un coiled coil et être impliqué dans la transduction de signal par changement conformationnel relie les domaines périplasmiques au domaine PAS (Herrou et al., 2009). L'étude de ce dernier a alors été entreprise et les différents résultats obtenus et à obtenir seront valorisés dans une publication d'article.

Les expériences réalisées pour étudier la transmission d'information entre les domaines VFT et PAS sont semblables à celles présentées dans le papier ci-dessus (Lesne et al., 2016). Les protocoles utilisés et déjà décrits dans cette publication ne seront pas repris en détail dans cette partie, mais lorsque des précisions sont nécessaires ou de nouveaux protocoles sont utilisés, ceux-ci seront présentés ci-dessous avec les résultats qu'ils ont permis de générer.

### 1. Organisation du connecteur mécanique

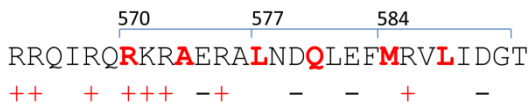
#### a. Description et caractéristiques

Les domaines périplasmiques sont reliés au domaine PAS par une longue hélice H19 qui s'étend à travers la membrane jusque dans le cytoplasme (Fig. 75).

A



B



C

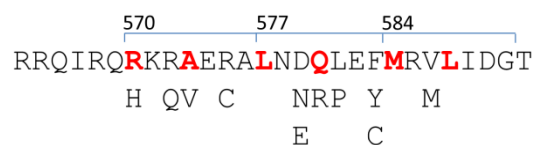


Figure 75 : Organisation du connecteur mécanique entre les domaines périplasmiques (VFT) et le domaine PAS cytoplasmique. A. Séquence protéique du connecteur. En bleu est colorée la séquence de la portion périplasmique de H19, en vert le segment membranaire prédit et en noir la jonction cytoplasmique. La prédiction de coiled coil est indiquée par les lettres 'a' et 'd'. B. Répartition des résidus chargés dans la jonction entre la membrane et le domaine PAS. Les signes '+' et '-' sont utilisés pour illustrer les résidus chargés positivement ou négativement. C. Répartition des substitutions apparues de manière spontanée pour compenser des mutations au niveau des domaines VFT induisant l'inactivation de BvgS. Ces différentes mutations référencées induisent l'obtention de mutants actifs et insensibles à la modulation. Dans B et C, les résidus prédits pour adopter une position 'a' ou 'd' du coiled coil sont colorés en rouge.

Au niveau périplasmique, l'hélice H19 est constituée de 15 résidus. De manière générale, cette taille est conservée dans la famille de BvgS mais la composition en séquence semble relativement variable. Le segment membranaire prédit de BvgS est constitué d'un ensemble de 22 résidus principalement hydrophobes, mais comprenant également deux sérines et deux glycines. Un motif GxxxA connu pour favoriser les contacts proches entre les hélices transmembranaires est retrouvé mais ne semble pas conservé dans la famille de BvgS. En effet, un alignement de séquences de différents homologues de BvgS présentant deux domaines VFT et un domaine PAS a mis en évidence une conservation du caractère hydrophobe des résidus sans réelle conservation de séquence (Fig. 76). Rappelons qu'en général, les segments membranaires sont constitués de plus de 70% de résidus hydrophobes.



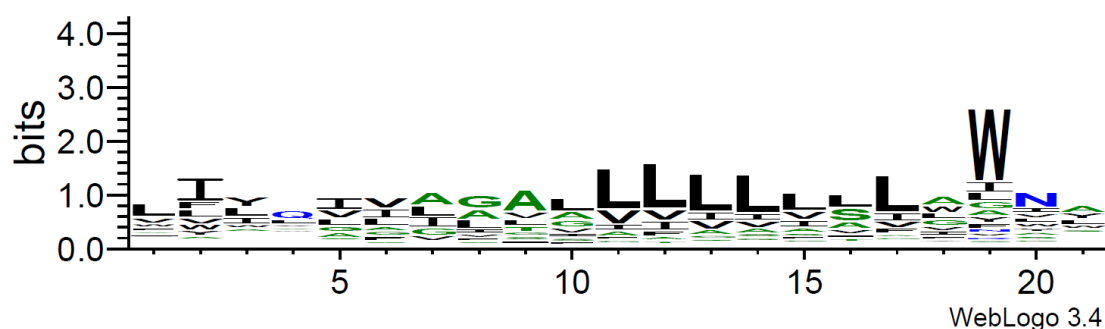


Figure 76 : Alignement de séquence d'homologues de BvgS présentant deux domaines VFT et un domaine PAS montrant la représentativité des résidus du segment membranaire grâce à la représentation WebLogo. Les segments transmembranaires ont été prédits par le logiciel Topcons 2 (<http://topcons.cbr.su.se>).

Au niveau cytoplasmique, les hélices sont constituées de 28 résidus prédits pour former un coiled coil (Fig. 75A). Une certaine diversité de taille est observable parmi les homologues de BvgS présentant deux domaines VFT et un domaine PAS (de 27 à 31 résidus, avec un petit nombre de cas à 20 ou 23 résidus). Un grand nombre de résidus chargés sont retrouvés (Fig. 75B) et semblent conservés dans cette sous-famille (Fig. 77). Grâce à l'alignement WebLogo des séquences de ces homologues de BvgS, présentant deux domaines VFT et un domaine PAS avec un motif d'entrée du domaine PAS 'PxP', nous pouvons observer la relativement grande conservation de séquence.

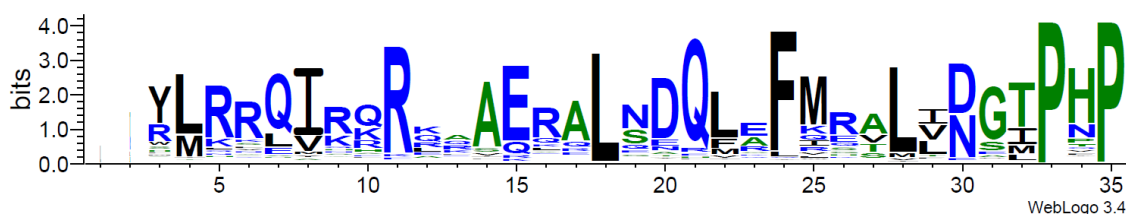


Figure 77 : Alignement de séquence d'homologues de BvgS présentant deux domaines VFT et un domaine PAS avec un motif d'entrée 'PxP' montrant la représentativité des résidus de la jonction entre la membrane et le domaine PAS, grâce à la représentation WebLogo.

De plus, la région cytoplasmique du connecteur est très particulière de par la grande quantité de mutations induisant une insensibilité à la modulation, qui sont apparues de manière spontanée pour compenser le phénotype inactif obtenu suite à l'introduction de mutations spécifiques dans la portion périplasmique de BvgS (Fig. 75C) (Miller et al., 1992; Goyard et al., 1994; Manetti et al., 1994; Uhl and Miller, 1996; Dupré E., Thèse de doctorat, 2013).

L'analyse de séquences de BvgS provenant d'isolats de *Bordetella* a permis de mettre en évidence une grande conservation en acides aminés du connecteur reliant les domaines périplasmiques au domaine PAS (Herrou et al., 2009).

#### *b. Importance de la taille de la jonction cytoplasmique pour l'activité de BvgS*

Etant donné la grande diversité de taille observable dans la famille entre la membrane et le domaine PAS, même si la taille de 28 acides aminés correspondant à la taille du linker de BvgS semble la plus fréquente, nous avons voulu déterminer les conséquences sur l'activité de BvgS, d'un changement de taille de ce linker. Pour ce faire, nous avons procédé au remplacement de la jonction entre la membrane et le domaine PAS par celle provenant

d'homologues de BvgS présentant des tailles différentes. Les différentes constructions ont été réalisées à partir de gènes synthétiques (Genecust, Luxembourg) qui codent le segment membranaire de BvgS, la jonction provenant de l'homologue et le début du domaine PAS de BvgS (Fig. 78). Un clonage dans le vecteur intermédiaire pUC19mpla a été réalisé avec le couple d'enzymes de restriction BglIII et Kpn2I. La suite du protocole expérimental est la même que celle décrite dans (Lesne et al., 2016). Ces expérimentations ont été réalisées par Mlle Maryem Ben Aissa, étudiante en dernière année d'école d'ingénieur, que j'ai encadrée personnellement durant ma thèse. Ses travaux ont fait l'objet d'un mémoire de recherche et lui ont permis l'obtention de son diplôme de fin d'étude.

A

TM de BvgS PAS de BvgS

BvgS (28AA) IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLRRQI---RQRKRAERALNDQLEEMRVLIDGTPNPPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPE

*Pni* (27AA) IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLRKM---RRRRDSEKELSYRLEFKRALIDGIPNPPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPE

*Pdi* (29AA) IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLR-GK-EVKHRRRAEADLQAELEFRDALLNGLPNPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPE

*Psp* (30AA) IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLR-LKVQVRRQRAAQHQLSQDLAFQFSLNGLPNPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPE

*Pag* (31AA) IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLRRLNIQIRQRQAERELENDRLAFQRALLDGIPNPPIYVRDKEGRMLLCNDAYLDTFGVTADAVLGKTIPE

B

Souches	Charges pos.	Charges nég.
BvgS	8	4
BvgS <sub>27AA</sub>	10	5
BvgS <sub>29AA</sub>	9	5
BvgS <sub>30AA</sub>	5	1
BvgS <sub>31AA</sub>	8	4

Figure 78 : Effet sur l'activité de BvgS de la longueur du segment entre la membrane et le domaine PAS. A. Alignement de séquences des différentes chimères de BvgS construites de telle sorte à conserver le segment transmembranaire (TM) de BvgS ainsi que le domaine PAS. Le coiled coil de 28 acides aminés (28 AA) a été remplacé par celui provenant des homologues de BvgS indiqués à gauche dans l'alignement : *Pni* pour *Pseudomonas nitroreducens* (GI 516088738), *Pdi* pour *Pantoea dispersa* (GI 545152798), *Psp* pour *Pseudomonas sp. CF161* (GI 520812285) et *Pag* pour *Pseudomonas agarici* (GI 984943149). Les résidus conservés entre ces séquences sont surlignés en bleu et jaune. B. Détermination du nombre de résidus chargés positivement (pos.) et négativement (nég.) pour les différents variants.

La composition des différents linkers choisis est semblable à celle du linker natif de BvgS, avec la présence de certains résidus très conservés (Fig. 78A). De plus, une même proportion de résidus chargés est observable entre les séquences, excepté pour le mutant BvgS<sub>30AA</sub> qui est moins chargé (Fig. 78B). La séquence native du linker cytoplasmique de BvgS, précédant le domaine PAS, est composée de 28 résidus. L'ajout ou la délétion d'un acide aminé entraînerait une modification du registre de chacune des deux hélices du coiled coil de 100°. Ainsi, la délétion d'un résidu ou l'ajout de 1, 2 ou 3 résidus (correspondant aux mutants BvgS<sub>27AA</sub>, BvgS<sub>29AA</sub>, BvgS<sub>30AA</sub> et BvgS<sub>31AA</sub>) affecterait le registre des hélices et donc l'interface putative du coiled coil en le décalant respectivement de -100, +100, +200 et de -60°.

Ces différentes constructions ont été introduites chez *B. pertussis* sous forme plasmidique et ont toutes donné des variants de BvgS inactifs (non montré). J'ai ensuite vérifié la production de BvgS sur des lysats de cultures bactériennes (Fig. 79). Les différents mutants semblent bien produits, écartant un défaut de repliement ou de stabilité dû aux mutations générées. Il faut noter que ces variants sont produits à partir de plasmides, ce qui pourrait expliquer leurs niveaux élevés de production.

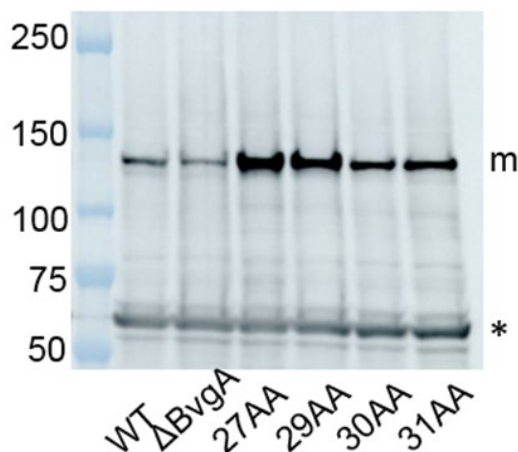


Figure 79 : Détermination par immunodétection de la quantité de BvgS dans des extraits membranaires de *B. pertussis* pour les différentes chimères où le coiled coil entre la membrane et le domaine PAS a été substitué par ceux provenant d'homologues de BvgS et présentant une longueur variable. La forme monomérique de BvgS (m) est indiquée. La souche  $\Delta bvgA$  est prise comme contrôle pour montrer l'abondance de BvgS dans une souche avirulente. La souche sauvage (WT) est utilisée comme contrôle positif. Le contrôle de charge indiqué par un astérisque correspond à une protéine non identifiée de *B. pertussis* reconnue de manière fortuite par les anticorps.

Lors de cette analyse, nous avons joué sur la composition et la taille du linker, tout en conservant la séquence du segment transmembranaire. Il est probable que ces deux paramètres soient importants pour l'activité de BvgS. Ces résultats suggèrent un rôle mécanique pour ce linker qui inclurait aussi le segment membranaire. Nous avons donc décidé de poursuivre nos investigations en étudiant le linker entre les domaines VFT jusqu'au domaine PAS dans sa globalité dans le but de déterminer les résidus importants pour l'activité et la réponse aux modulateurs ainsi que la topologie et la dynamique de ce segment en hélice  $\alpha$ .

## 2. Caractérisation de la portion membranaire de BvgS

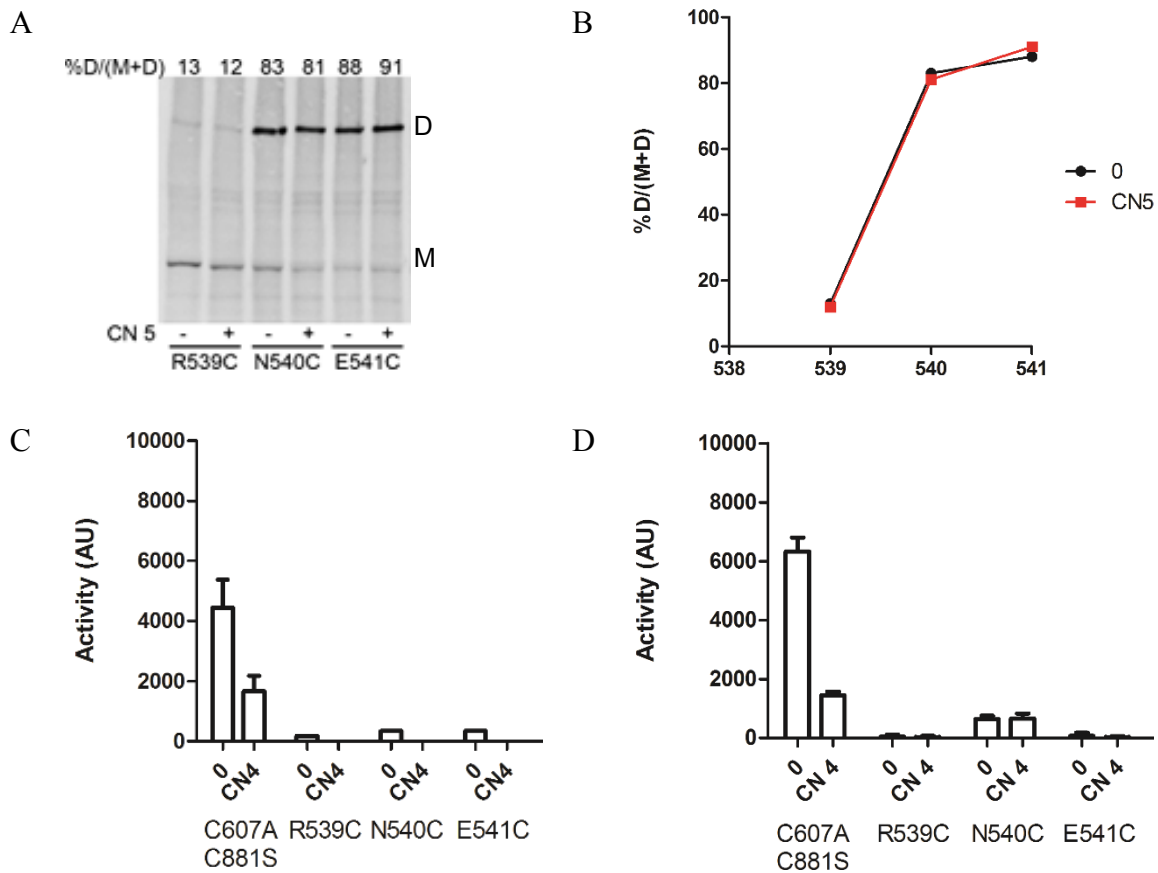
La technique de cysteine scanning est généralement utilisée pour déterminer l'oligomérisation, l'interface de dimérisation, la flexibilité et dynamique structurale ainsi que la position relative des hélices l'une par rapport à l'autre (Monzel and Uden, 2015). Des analyses de cysteine scanning ont été réalisées chez *E. coli* en utilisant la protéine BvgS tronquée décrite plus haut, BvgS<sup>t</sup>. Les résidus ciblés pour l'analyse ont chacun été substitués par une cystéine grâce à de la mutagenèse dirigée. Le principe de la technique ainsi que le protocole utilisé sont détaillés dans l'article (Lesne et al., 2016) et le résumé s'y référant (cf partie VIII. A.2.). Quelques variantes au protocole de cysteine scanning ont été introduites pour les mutants présentant une cystéine dans le segment membranaire. Ainsi, les cultures se font en milieu LB Difco filtré et l'oxydation est réalisée dans le même milieu de culture grâce à l'ajout de 1 mM de copper o-phenanthroline pendant 20 minutes. L'effet de la substitution en cystéine sur l'activité de BvgS a été vérifié pour chaque mutation réalisée et pris en compte pour l'interprétation des résultats.

### a. Analyse de la portion cytoplasmique de l'hélice H19 de BvgS

Nous avons tout d'abord voulu étudier la topologie de l'hélice H19 au niveau des derniers résidus périplasmiques étant donné que dans la structure cristallographique des domaines VFT, ces hélices s'écartent fortement. Au vu de leur orientation, il est difficile de comprendre comment s'effectue la transduction de signal entre les domaines périplasmiques et le segment membranaire.

Trois résidus consécutifs prédits pour être situés juste avant le segment membranaire (R<sub>539</sub>, N<sub>540</sub> et E<sub>541</sub>) ont été ciblés pour la réalisation de cysteine scanning. Une bonne proportion de dimère est observable pour les résidus C<sub>540</sub> et C<sub>541</sub> (Fig. 80A et B). La perception de

modulateur ne modifie pas le profil de formation de dimère. Toutefois, les différents mutants générés présentent une activité  $\beta$ -galactosidase très faible (BvgS<sup>fl</sup><sub>N540C</sub>) ou nulle indiquant que BvgS est inactif (Fig. 80C et D).



**Figure 80** : Etude de la topologie et dynamique des hélices H19 au niveau des derniers résidus de la portion périplasmique de BvgS. A. Des analyses de cystéine scanning pour différents variants de BvgS<sup>fl</sup> ont été réalisées en conditions basales (-) ou après l'ajout (+) de 5 mM de chloronicotinate (CN 5). Les formes monomérique et dimérique sont respectivement annotées M et D. Les proportions de dimères sont indiquées en haut de chaque ligne. L'immunodétection a été réalisée en utilisant des anticorps anti-His<sub>6</sub>. B. Les résultats de cystéine scanning provenant d'une expérience représentative ont été repris sous forme de graphique pour faciliter la lecture. Les proportions de dimère sont montrées en conditions basales (0, courbe noire) ou après la perception de chloronicotinate (CN 5, courbe rouge). C et D. Activités  $\beta$ -galactosidase réalisées sur des lysats bactériens de *B. pertussis*, représentant l'activité du promoteur de l'opéron *ptx* (C) ou de *phaB* (D) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 4 mM (CN 4) au milieu de culture. Lorsque les valeurs présentées proviennent de plusieurs expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

La perte d'activité de BvgS pourrait s'expliquer par la formation du pont disulfure ou par l'importance du résidu muté pour l'activité kinase de BvgS. Chez *B. pertussis*, la production de BvgS ainsi que la formation de pont disulfure de manière spontanée au niveau des cystéines introduites ont été déterminées (Fig. 81A). Les trois protéines présentent de fortes proportions de dimère, de l'ordre de 70%. De plus, la mutation N<sub>540</sub>C semble déstabiliser la protéine, puisqu'une très faible bande de BvgS est observable (principalement sous forme dimérique) comparée à la quantité détectable pour nos contrôles. Le réducteur TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, Sigma) a été ajouté six heures avant la fin de la culture pour déterminer ce qui cause la perte d'activité. Le variant BvgS<sup>fl</sup><sub>R539C</sub> recouvre de l'activité lorsque le TCEP est ajouté (Fig. 81B). Aucune réactivation de BvgS, après l'ajout de TCEP, n'a été détectée pour les souches portant les mutations N<sub>540</sub>C et E<sub>541</sub>C. Une immunodétection de BvgS provenant d'extraits membranaires de cultures traitées ou non au

TCEP montre que le traitement réducteur a un effet partiel sur BvgS<sup>fl</sup><sub>R539C</sub> mais aucun sur les autres variants (Fig. 81C). Un autre réducteur, le DTT (Dithiothreitol, Sigma) ne semble pas non plus permettre la réactivation des souches BvgS<sup>fl</sup><sub>N540C</sub> et BvgS<sup>fl</sup><sub>E541C</sub> (Fig. 81B) ni de diminuer la quantité de dimère formé pour le mutant BvgS<sup>fl</sup><sub>E541C</sub>. Une très faible diminution du ratio de dimère est observable pour la souche BvgS<sup>fl</sup><sub>N540C</sub> (Fig. 81D). Pour les substitutions des résidus N<sub>540</sub> et E<sub>541</sub> en cystéine, les réducteurs utilisés ne nous permettent pas de restaurer l'activité kinase, ni de réduire les ponts disulfures, possiblement parce que ces résidus sont insérés dans la partie polaire de la membrane. La perte d'activité de ces mutants pourrait donc être due à la formation du pont disulfure, mais il est probable que ces résidus, surtout N<sub>540</sub> et E<sub>541</sub>, soient également essentiels pour l'activité du système.

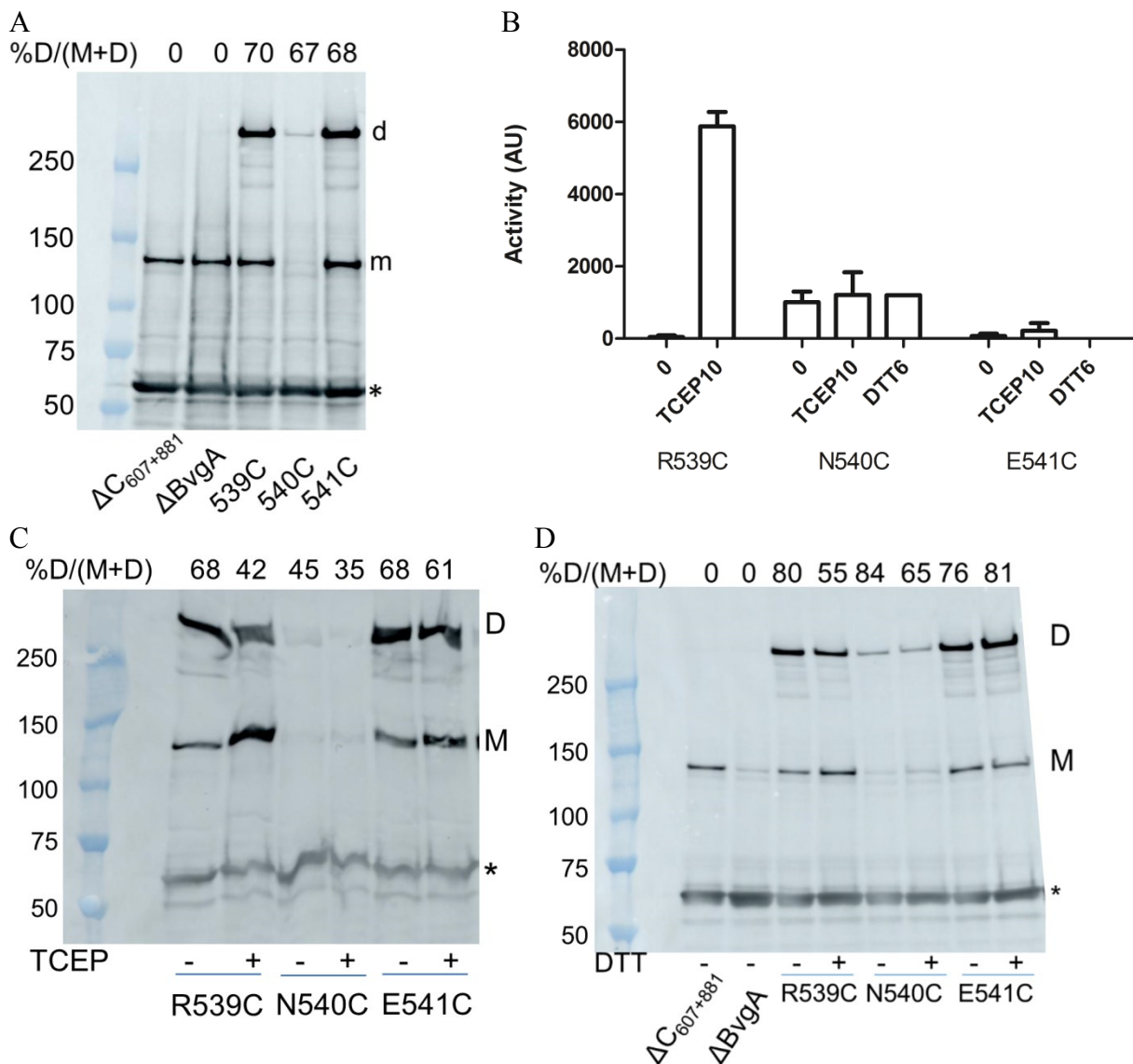


Figure 81 : Caractérisation des variants de BvgS<sup>fl</sup>. A. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque. Notons que les différents variants de BvgS<sup>fl</sup> présentent en plus de leur substitution cystéine, les substitutions C<sub>607</sub>A et C<sub>881</sub>S, tout comme le contrôle ΔC<sub>607+881</sub>. B. Activités β-galactosidase de lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *phaB* en conditions basales (0) ou après l'ajout de réducteur (TCEP à 10 mM ou DTT à 6 mM) six heures avant l'arrêt des cultures. C et D. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (M) ou dimérique (D) sans ajout d'oxydant, dans des lysats bactériens provenant de cultures en conditions basales (-) ou supplémentées de 10 mM de TCEP (+, C) ou de 6 mM de DTT (+, D).



Ainsi, les hélices H19 périplasmiques semblent avoir pris dans le cristal une orientation favorable à l'empilement cristallin, mais qui ne serait pas leur conformation *in vivo*, étant donné que nos résultats montrent la proximité des hélices aux positions testées. Ces résultats peuvent être interprétés de deux manières. Il est possible que H19 doive être dynamique pour permettre l'état kinase, étant donné le taux élevé de formation spontanée de pont disulfure chez *B. pertussis* et l'effet négatif de ces ponts disulfure sur l'activité de BvgS. Alternativement, il se pourrait que le segment 539-541 ne soit pas en hélice  $\alpha$ , ce qui expliquerait que trois résidus contigus puissent former des ponts disulfures. Il est possible que ces résidus soient en interaction avec les têtes polaires des lipides et que ces interactions soient importantes pour la fonction de BvgS.

#### *b. Analyse de la portion membranaire de BvgS*

Les analyses de cystéine scanning ont été poursuivies au niveau du segment transmembranaire jusqu'au motif GxxxA (Fig. 82A et B) et les conséquences de ces substitutions en cystéine sur l'activité de BvgS ont été déterminées chez *B. pertussis* (Fig. 82 C et D). Au vu des résultats obtenus, la région ciblée peut être séparée en deux portions (Fig. 82A et B). Ainsi, le cystéine scanning du segment 542-549 souligne des contacts proches entre les hélices du dimère de BvgS. Des proportions importantes de pont disulfure pour trois positions consécutives (544 à 546), indiquent une forte dynamique rotationnelle dans cette région. L'ajout de chloronicotinate n'affecte pas la formation de pont disulfure pour la région 542-549. Dans le segment 550-553, de faibles proportions de pont disulfure existent à l'état basal, suggérant un écartement marqué des hélices. Suite à la perception de la modulation, une légère augmentation de formation de dimère est détectable pour ce segment, suggérant un léger rapprochement des hélices.

Il est intéressant de noter que le remplacement de la plupart des résidus par une cystéine, qui est compatible avec un environnement membranaire de par son caractère hydrophobe, ne modifie ni l'activité de base, ni la réponse à la modulation de BvgS (Fig. 82C et D). Toutefois, deux variants (BvgS<sup>n</sup><sub>I542C</sub> et <sub>L544C</sub>) présentent une activité basale légèrement plus faible que celle de la souche contrôle. La mutation I<sub>542C</sub> permet la formation de 66% de pont disulfure de manière spontanée chez *B. pertussis* pouvant être responsable de cette diminution d'activité (Fig. 82E). Pour les deux résidus glycine ciblés, le remplacement en cystéine affecte l'activité de base de BvgS pour le variant G<sub>547C</sub> ou la réponse à la modulation pour le variant G<sub>549C</sub>. Aucune formation de pont disulfure de manière spontanée chez *B. pertussis* n'est observée pour ces deux mutants (Fig. 82E). Rappelons que ces glycines ne semblent pas conservées chez les homologues de BvgS (Fig. 76). Le résidu G<sub>549</sub> est en première position du motif GxxxA, typiquement connu pour favoriser les contacts proches entre hélices transmembranaires. Cependant, les hélices s'écartent après le résidu G<sub>549</sub> suggérant que ce motif ne joue pas le rôle attendu. Au contraire, ce résidu glycine marquerait la limite entre un segment où les hélices sont très proches et un autre où elles se séparent. L'ajout de modulateur permet un léger rapprochement des hélices en aval du résidu 549. Il se pourrait alors que le résidu G<sub>549</sub>, dont la substitution en cystéine empêche la transition de BvgS vers le mode phosphatase, cause un petit défaut ('kink' pour coude) du segment membranaire qui serait nécessaire pour permettre le changement d'état de BvgS.



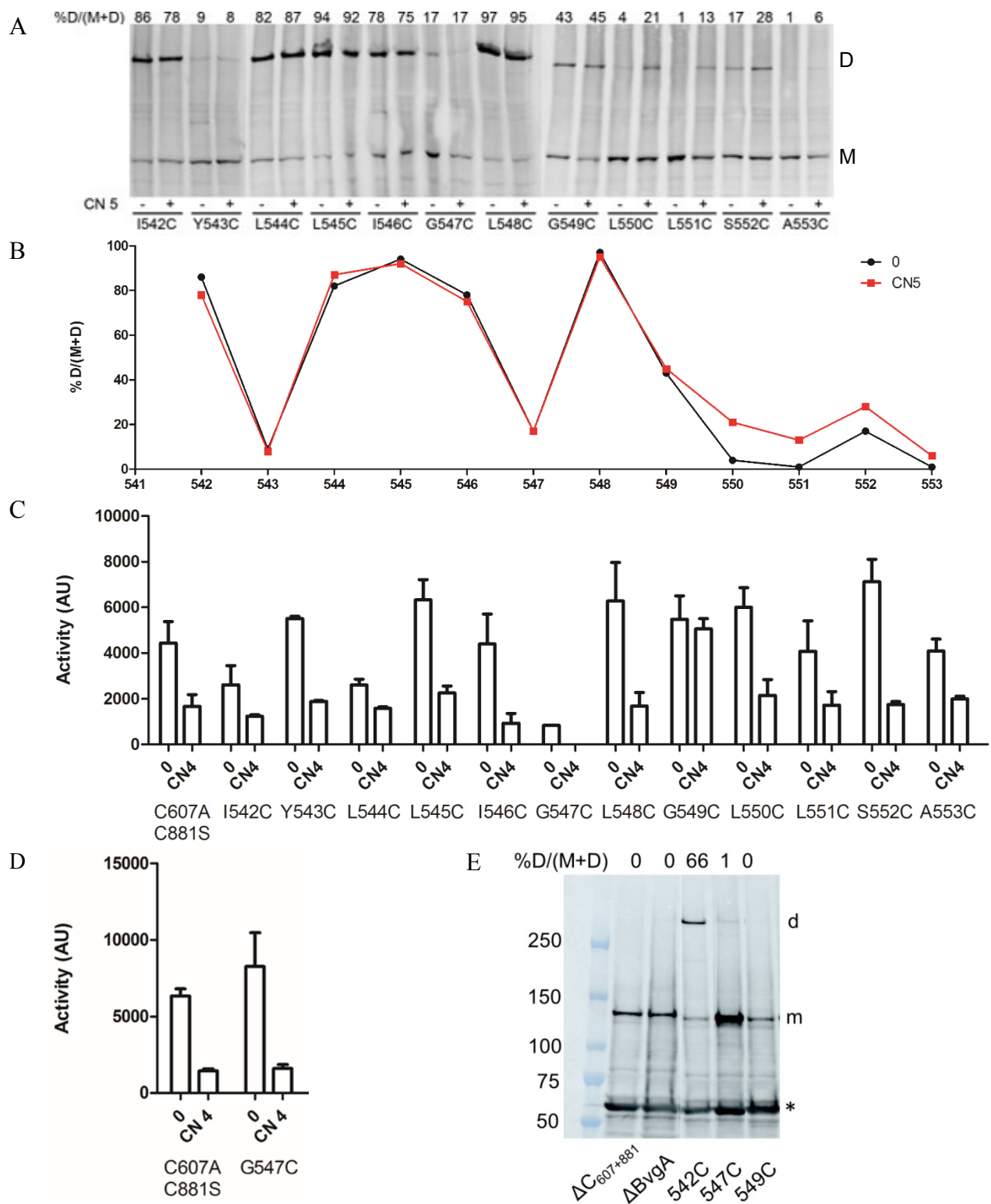


Figure 82 : Etude de la topologie et dynamique du segment membranaire de BvgS. A. Des analyses de cysteine scanning pour différents variants de BvgS<sup>1</sup> ont été réalisées en conditions basales (-) ou après l'ajout (+) de 5 mM de chloronicotinate (CN 5). Les formes monomérique et dimérique sont annotées M et D respectivement. Les proportions de dimères sont indiquées en haut de chaque ligne. B. Les résultats provenant d'une expérience représentative ont été repris sous forme de graphique pour faciliter la lecture. Les proportions de dimères sont montrées en conditions basales (0, courbe noire) ou après la perception de chloronicotinate (CN 5, courbe rouge). C et D. Activités  $\beta$ -galactosidase de lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* (C) ou du promoteur *phaB* (D) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 4 mM (CN4) au milieu de culture. Les valeurs présentées proviennent de trois expériences indépendantes, la moyenne et l'écart-type de la moyenne sont représentés. E. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque.

Des résultats de cysteine scanning semblables aux nôtres ont été obtenus chez DcuS d'*E. coli*. Lors de cette analyse, un mouvement de piston des hélices transmembranaires a été proposé. En effet, un déplacement parallèle des hélices dénommé 'piston symétrique' est censé ne pas affecter les résultats de cysteine scanning entre les deux états du système, tandis que des mouvements de rotation ou de cisaillement affecteraient l'interface des deux hélices et donc la formation de pont disulfure (Monzel and Unden, 2015). Sur base de ces travaux, l'hypothèse d'une transduction d'information entre les portions périplasmique et cytoplasmique de BvgS par un mouvement de piston a été testée.

Des analyses d'accessibilité de cystéines par fixation de Peg-maléimide-20K ont été entreprises. Des cultures de 20 mL d'*E. coli* UT5600 portant les différentes constructions codant BvgS<sup>t</sup> avec une mutation cystéine d'intérêt, ont été ensemencées à une DO<sub>600nm</sub> de 0,05 et incubées à 37°C, 200 rpm pour atteindre une DO<sub>600nm</sub> supérieure à 1,4. Pour déterminer l'effet du modulateur, 5 mM de chloronicotinate ont été ajoutés 30 minutes avant de récolter les cellules par centrifugation à température ambiante. Un lavage au sodium phosphate (50 mM, pH 6,8, NaPi) a été effectué, puis le culot a été repris dans 2 mL de NaPi supplémenté d'un inhibiteur de protéases (Complete EDTA-free, Roche), 5 mM de chloronicotinate (quand nécessaire) et 5 mM de NEM (N-Ethylmaléimide, Sigma). Les tubes ont été placés à 37°C pendant 1 h sans agitation et régulièrement mélangés. Après deux lavages au NaPi, les culots bactériens ont été congelés, puis resuspendus à une DO<sub>600nm</sub> de 17 dans du NaPi supplémenté d'inhibiteur de protéases et de DNase (10 µg/mL). Une ribolyse (force 6, 50 sec) suivie d'une centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C) et d'une ultracentrifugation d'1 mL de lysat (90 000 g, 1h, 6°C) ont été effectuées pour isoler les protéines membranaires. Les culots ont été repris avec 80 µl de NaPi contenant 2% de SDS. Après une heure à 37°C sous une légère agitation, 5 mM de Peg-maléimide (20 kDa) (polyéthylène glycol maléimide, Tebu-bio) ont été ajoutés aux protéines. Le mélange a ensuite été laissé à 37°C sans agitation pendant une heure. Le tampon de charge (33,3µl de lithium dodécyl sulfate LDS, NuPAGE, Life Technologies) a été ajouté puis les échantillons ont été chauffés à 70°C pendant 10 minutes. Une immunodétection a ensuite été réalisée comme dans l'article Lesne et al., 2016.

Le traitement au NEM permet de bloquer les cystéines libres présentes dans les régions périplasmique et cytoplasmique, puisque ce composé chimique traverse les membranes mais ne peut pas se fixer au niveau du segment membranaire. En effet, cette molécule réagit avec les groupements thiols sous forme ionisée et la fixation du maléimide requiert une molécule d'eau comme accepteur de proton (Bogdanov et al., 2005) (Fig. 83). La lyse suivie d'une perméabilisation des membranes permet au Peg-maléimide d'aller se fixer sur les cystéines non marquées au NEM. Une migration sur gel en conditions dénaturantes permettra d'identifier un retard sur gel correspondant à BvgS modifié par la fixation de Peg-maléimide (20 kDa). Ceci caractérisera alors l'exposition au milieu des résidus membranaires dans les états kinase et phosphatase.

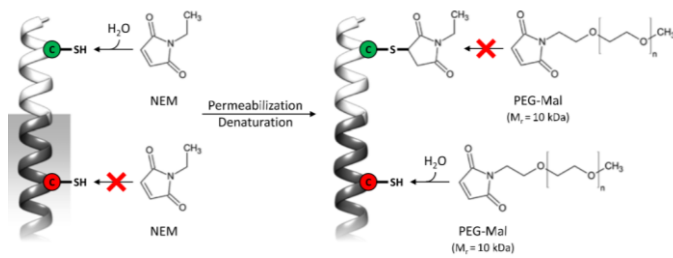


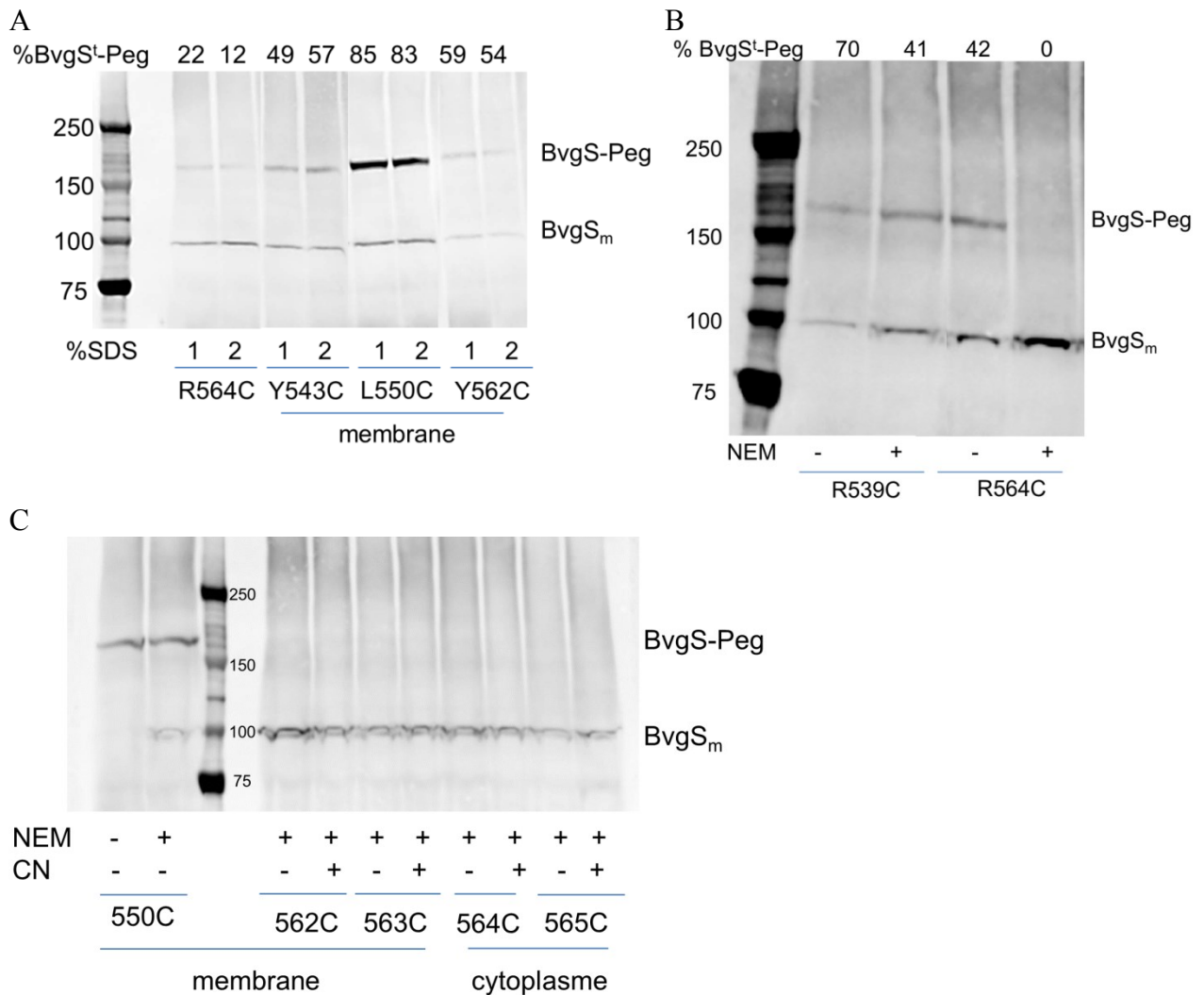
Figure 83 : Principe de la technique d'accessibilité de cystéine. Extrait de Monzel and Uden, 2015.

Pour mettre au point le protocole présenté ci-dessus, des positions du coiled coil non favorables à la formation de pont disulfure ont été préférentiellement ciblées pour favoriser la fixation de NEM ou de Peg-maléimide. Les premières expériences ont mis en évidence qu'un marquage au Peg-maléimide était réalisable au niveau périplasmique, membranaire ainsi que cytoplasmique sans traitement préalable au NEM (Fig. 84A et B). Il est intéressant de noter que la bande correspondant au BvgS<sup>t</sup>-Peg présente une migration aberrante puisqu'elle est retrouvée plus haut qu'elle ne le devrait (environ 150 au lieu de 120 kDa). Le fait que cette bande disparaisse quand un traitement au NEM est effectué avant le marquage au Peg-maléimide pour la souche portant la Cys564 permet de confirmer l'identité de la forme BvgS<sup>t</sup> modifiée par le Peg-maléimide, puisqu'au niveau cytoplasmique la fixation de NEM est possible et entrave celle du Peg-maléimide (Fig. 84B).

Au niveau de la portion périplasmique de H19 (résidu 539), le Peg-maléimide se fixe avec et sans traitement au NEM (Fig. 84B) quoique moins efficacement après traitement au NEM (41% comparé à 71%). Il semble donc que le NEM ne parvient pas à modifier quantitativement la Cys539, mais que le traitement au SDS augmente l'accessibilité du résidu et ainsi la fixation de Peg-maléimide.

La perméabilisation au SDS favorise la fixation de Peg-maléimide sur les différents résidus membranaires testés (Fig. 84A). L'efficacité du marquage au Peg-maléimide varie suivant la position du résidu au sein du coiled coil. Après traitement au NEM (Fig. 84C et non montré) aucun marquage n'est observable pour les différents mutants avec et sans ajout de chloronicotinate, excepté pour les positions C<sub>539</sub> et C<sub>550</sub>, ce qui exclut un problème d'activité du Peg-maléimide ou de perméabilisation membranaire. Ainsi, le NEM modifierait les résidus au début et à la fin du segment hydrophobe (C<sub>543</sub>, C<sub>544</sub>, C<sub>562</sub>, C<sub>563</sub>), ce qui empêcherait de voir ensuite un changement de leur exposition au milieu grâce au Peg-maléimide. De tels problèmes n'ont pas été rapportés lors de l'étude de DcuS chez *E. coli*. Il se pourrait que la membrane d'*E. coli* présente une composition et une épaisseur légèrement différentes de celles de *B. pertussis* et il serait donc intéressant d'effectuer ces analyses dans leur environnement naturel, chez *B. pertussis*. Toutefois, cette technique présente des limitations puisque les résidus induisant la formation de pont disulfure seraient peu accessibles au NEM sans dénaturation. De plus, les cystéines au niveau de l'hélice H19 périplasmique permettent de fortes proportions de dimère, et les différents réducteurs utilisés précédemment ne semblent pas diminuer de manière drastique l'abondance de ces ponts disulfures, soulignant ainsi le fait que toutes les positions membranaires et extra-membranaires ne peuvent pas être testées. Ces analyses d'accessibilité des cystéines chez *B. pertussis* n'ont pas pu être initiées, puisque la forme complète de BvgS inclut les domaines receveur et de phospho-transfert qui portent des cystéines absentes de la forme BvgS<sup>t</sup> tronquée. Il serait plus judicieux de

substituer ces cystéines ou d'utiliser une forme tronquée chez *B. pertussis*. Il faut également noter qu'une construction de BvgS tronqué portant une étiquette de six histidines n'est pas détectée avec l'anticorps monoclonal anti-His<sub>6</sub> chez *B. pertussis*, sans doute parce que l'étiquette de détection est protéolysée. Malheureusement, l'anticorps polyclonal utilisé pour détecter BvgS chez *B. pertussis* est moins spécifique qu'un anticorps monoclonal, et ce sera peut-être un facteur limitant pour la détection d'une faible bande de BvgS modifié.



**Figure 84 : Accessibilité des cystéines pour différents variants de BvgS<sup>l</sup> chez *E. coli*.** Les formes de BvgS<sup>l</sup> monomérique ou fixée au Peg-maléimide sont indiquées respectivement par 'BvgS<sub>m</sub>' et 'BvgS-Peg'. Le pourcentage de fixation de Peg-maléimide est indiqué en haut de chaque ligne lorsqu'il est mesurable (A, B et C). A. 1 ou 2 % de SDS ont été utilisés pour perméabiliser la membrane avant traitement au Peg-maléimide. Dans cette première expérience aucun traitement au NEM n'a été réalisé avant perméabilisation. B. Les échantillons ont été traités au NEM, puis un traitement de perméabilisation de la membrane plasmique avec 1% de SDS a été effectué préalablement au marquage au Peg-maléimide. C. Du chloronicotinate à 5 mM (CN) a été ajouté au milieu de culture 30 minutes avant centrifugation et traitement au NEM. Le chloronicotinate a été conservé lors des différents lavages et du traitement au NEM. Un traitement au SDS 2% suivi d'un marquage au Peg-maléimide a été effectué.

Pour résumer, des contacts proches sont détectables au niveau de la première portion du segment transmembranaire, ensuite les hélices semblent plus écartées. Le segment transmembranaire pourrait comporter un 'défaut' dans l'hélice expliquant les résultats de cysteine scanning. Peu de variation dans le profil de formation de dimère est observable après la perception de modulateur, suggérant un mouvement de piston symétrique pour la

transduction d'information. Les analyses d'accessibilité des cystéines chez *E. coli* ne nous ont pas permis de confirmer ou d'affirmer cette hypothèse. Celles-ci seront poursuivies en effectuant les tests chez *B. pertussis* et en ciblant plus de résidus.

### 3. Caractérisation de la portion sous-membranaire du connecteur mécanique

#### a. Importance des résidus chargés pour l'activité de BvgS

La portion sous-membranaire de BvgS comprend de nombreux résidus chargés assez conservés dans la famille, soulignant leur rôle potentiel dans la conformation du connecteur ou dans la transduction de signal (Fig. 75B). Si notre modèle de piston est correct, ces charges pourraient servir de 'frein' et empêcher la remontée des résidus cytoplasmiques dans la membrane. Au niveau périplasmique de H19, des résidus chargés sont également retrouvés et pourraient aussi contraindre ces mouvements verticaux. Rappelons que les arginines peuvent être sujettes à un phénomène de 'snorkeling' si elles sont proches des extrémités d'un segment membranaire (voir partie V.A.5.). Il est également possible que de part et d'autre de la bicouche les résidus chargés interagissent avec les têtes polaires des lipides et que ces interactions contribuent à la fonction du système.

Les trois premières charges sous-membranaires ont été remplacées par des résidus alanine de manière graduelle avec la construction de trois variants BvgS<sub>R564A</sub>, BvgS<sub>R564-565A</sub> et BvgS<sub>R564-565-568A</sub>. Ces mutations réalisées par mutagenèse dirigée sur le plasmide pUC19TM HK puis échange de cassette entre vecteurs (XbaI-SacI pour construire le vecteur intermédiaire pUC19mos muté, puis EcoRI-HindIII pour le vecteur final pSORT mobilisable pour la conjugaison) ont été introduites dans le chromosome de *B. pertussis* par double recombinaison (Herrou et al., 2009). Les activités  $\beta$ -galactosidase ont été déterminées à l'état basal et suite à l'ajout de concentrations croissantes de modulateur au milieu de culture (Fig. 85).

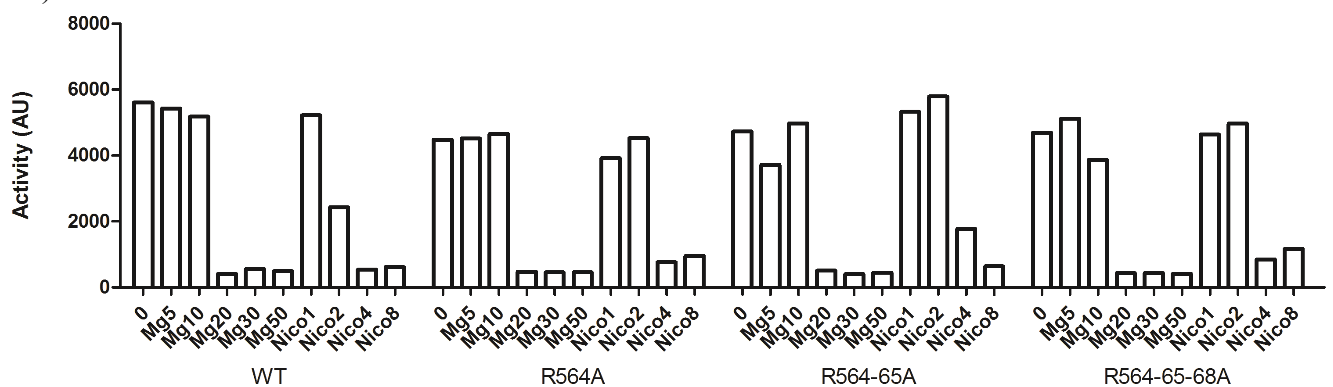


Figure 85 : Activités  $\beta$ -galactosidase pour les mutants de remplacement de charges sous-membranaires, reflétant l'activité du promoteur *ptx* en conditions basales (0) ou après la perception de concentrations croissantes de modulateurs (Mg, sulfate de magnésium, Nico, nicotinate, X concentration exprimée en millimolaires).

La substitution de ces arginines par des alanines permet l'obtention de mutants présentant des activités comparables à celle de la souche sauvage et légèrement moins sensibles au nicotinate. La réponse à la modulation induite par de faibles températures (20°C) a également été testée, dans l'idée qu'une température plus faible pourrait affecter l'épaisseur de la membrane, mais les trois variants présentent le même profil de réponse à la température que

la souche sauvage (non montré). Ainsi, ces résidus chargés ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'activité du système. L'arginine en position 570, qui correspondrait à une position 'a' de la prédiction de coiled coil faite pour ce segment de BvgS, a ensuite été substituée en leucine et en alanine. Ces mutations ont été introduites chez *B. pertussis* sous forme plasmidique. Les deux mutants présentent une activité à l'état basal légèrement plus faible que celle de la souche sauvage, et sont insensibles aux modulateurs (Fig. 86). Une mutation spontanée de cette arginine en histidine, décrite précédemment, donnait une protéine active et insensible aux modulateurs (Miller et al., 1992). Ainsi, cette arginine très conservée dans la famille (Fig. 77) est importante pour le passage en mode phosphatase. La charge positive semble requise pour la sensibilité de BvgS à la modulation puisque la substitution en alanine, leucine ou encore histidine, non chargée dans nos conditions expérimentales (pH > 7,4), bloque BvgS en état kinase. La chaîne latérale de cette arginine pourrait former des interactions ioniques avec d'autres chaînes latérales de charge opposée pour stabiliser l'hélice ou avec les têtes polaires des lipides. Si l'hypothèse de piston symétrique s'avère correcte, les interactions de l'arginine avec les têtes polaires des lipides pourraient limiter la remontée des hélices dans la bicouche lipidique. Ce résidu arginine est remplacé par une lysine ou un glutamate chez certains homologues de BvgS (Fig. 77), qui pourraient également être impliqués dans des interactions ioniques. Ainsi, la présence d'un résidu chargé en cette position ('a' du coiled coil) semble être requise pour la transmission de l'information et le passage en mode phosphatase de BvgS.

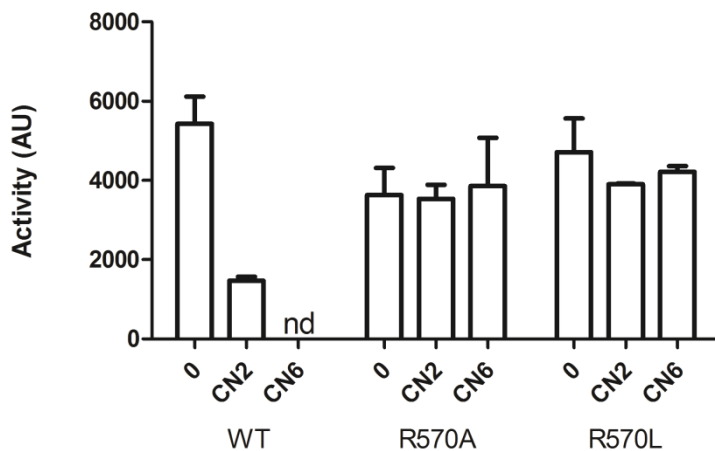


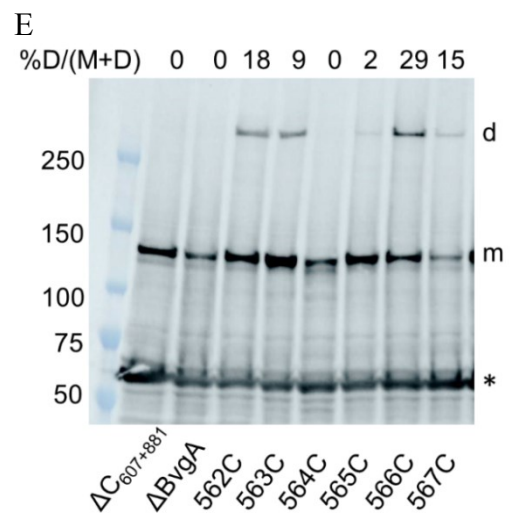
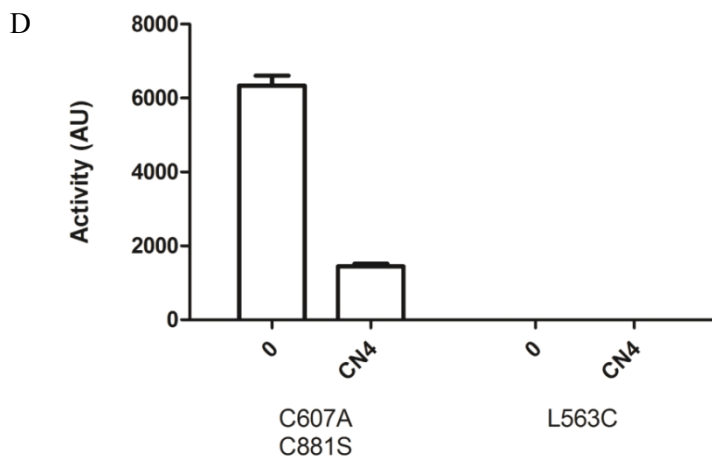
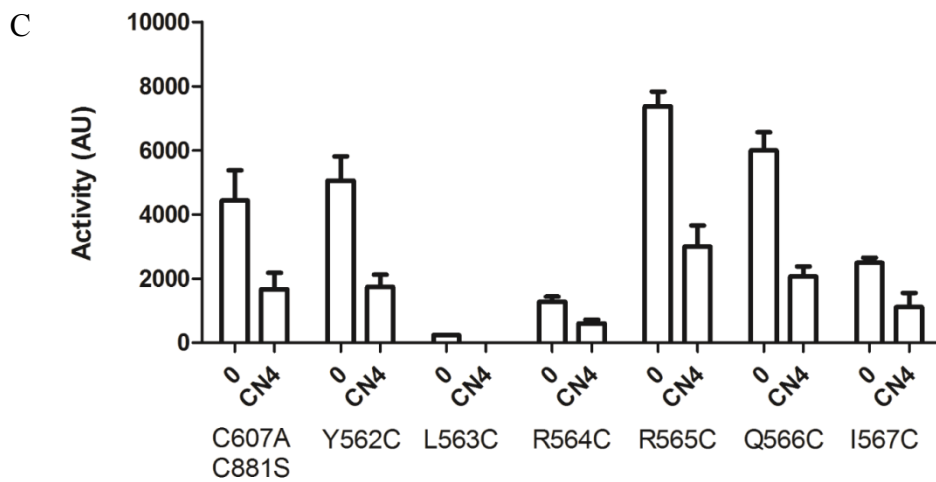
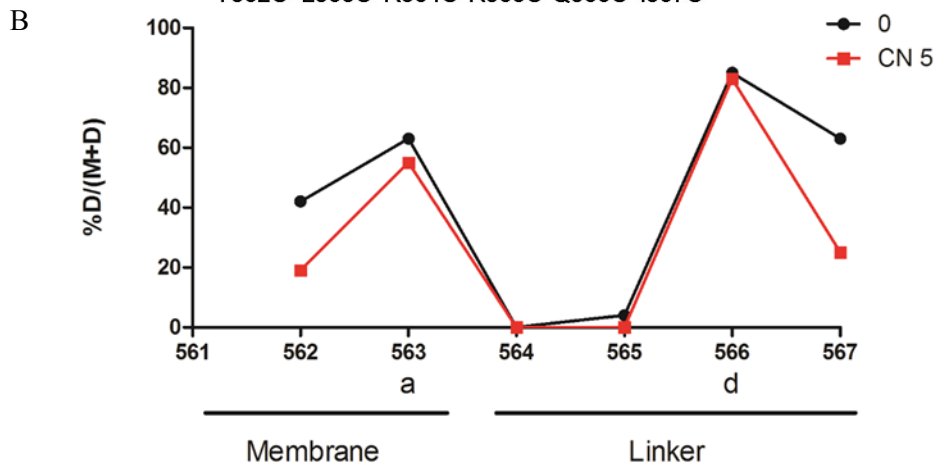
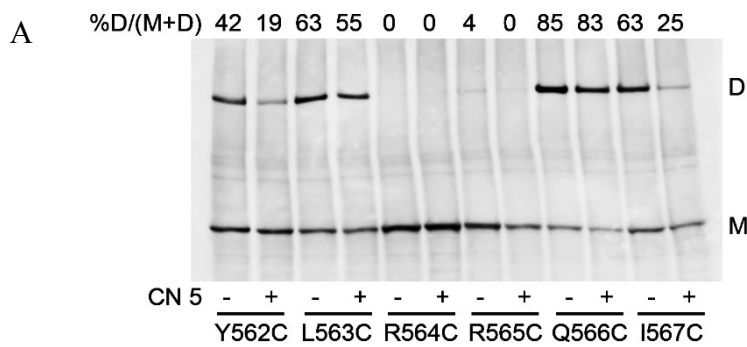
Figure 86 : Activités  $\beta$ -galactosidase de lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* en conditions basales (0) ou après l'ajout de concentrations croissantes de chloronicotinate (en millimolaires) au milieu de culture. Les valeurs présentées proviennent d'au moins trois expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. Nd, non déterminé.

### b. Etude de la topologie et dynamique du linker trans- et sous-membranaire

Des analyses par cysteine scanning de la jonction membrane-cytoplasme ont été réalisées pour déterminer l'agencement des premiers résidus chargés sous la membrane (Fig. 87).

Figure 87 : Etude de la topologie et dynamique de la jonction membrane-cytoplasme de BvgS. A. Des analyses de cysteine scanning pour différents variants de BvgS<sup>1</sup> ont été réalisées en conditions basales (-) ou après l'ajout (+) de 5 mM de chloronicotinate (CN 5). Les formes monomérique et dimérique sont annotées M et D respectivement. Les proportions de dimères sont indiquées en haut de chaque ligne. B. Les résultats provenant d'une expérience représentative ont été repris sous forme de graphique pour faciliter la lecture. Les proportions de dimères sont montrées en conditions basales (0, courbe noire) ou après la perception de chloronicotinate (CN 5, courbe rouge). Les résidus appartenant au segment membranaire ou au linker cytoplasmique ont été indiqués. C et D. Activités  $\beta$ -galactosidase de lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* (C) ou *phaB* (D) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 4 mM (CN 4) au milieu de culture. Notons que tous les variants cystéine présentent également les substitutions C<sub>607</sub>A et C<sub>881</sub>S. Les valeurs présentées proviennent de trois expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. E. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le ratio de formation de dimère est indiqué en haut de chaque ligne. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque.





A l'état basal, la formation d'un pont disulfure est observable pour quatre positions sur les six testées (Fig. 87A et B), selon une périodicité cohérente avec la prédiction d'un coiled coil après le segment transmembranaire. Cependant, il y aurait une arginine en position 'a' et deux glutamines en 'd' dans ce coiled coil (Fig. 75) suggérant que ce dernier soit relativement peu stable. L'ajout de modulateur induit une diminution de la quantité de dimère pour les substitutions Y<sub>562</sub>C (en 'g') et I<sub>567</sub>C (en 'e'), suggérant une baisse de la dynamique rotationnelle du coiled coil en mode phosphatase. Aucune modification du ratio de dimère n'est observable pour les autres mutations cystéines (Fig. 87A et B). Notons que seule la substitution L<sub>563</sub>C a un effet drastique sur l'activité de BvgS *in vivo* (Fig. 87C et D). La production de BvgS chez *B. pertussis* a alors été vérifiée (Fig. 87E). Uniquement la souche BvgS<sup>fl</sup><sub>I567C</sub> semble présenter un défaut important de production ou de stabilité, qui pourrait ainsi expliquer la diminution d'activité de BvgS observable pour ce mutant (Fig. 87C). Les cystéines en position 562, 563, 566 et 567, permettent la formation de pont disulfure de manière spontanée chez *B. pertussis* (respectivement 18, 9, 29 et 15%), suggérant des contacts proches entre ces résidus et confirmant les tendances obtenues chez *E. coli* après ajout d'oxydant.

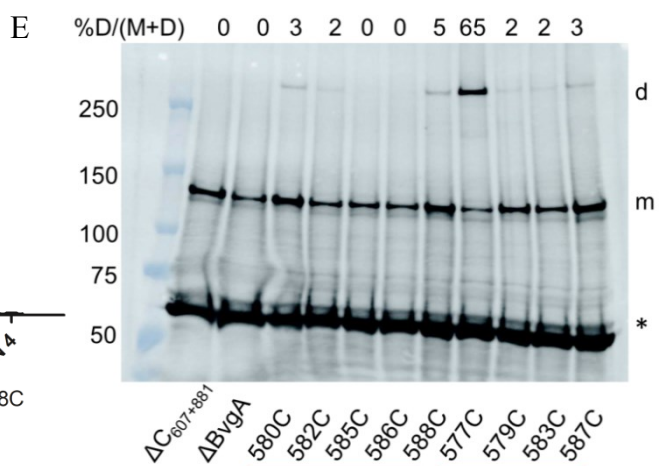
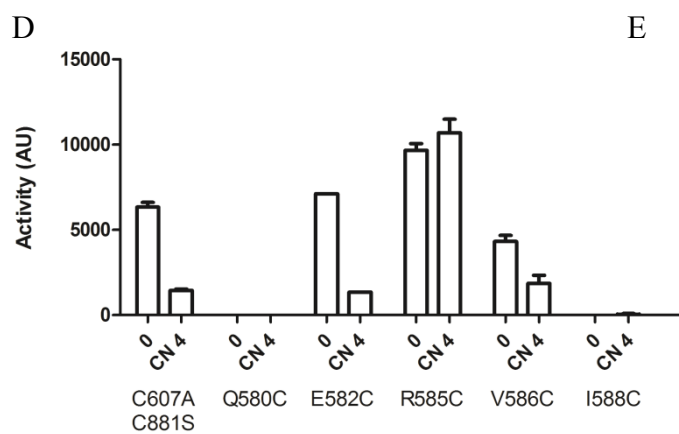
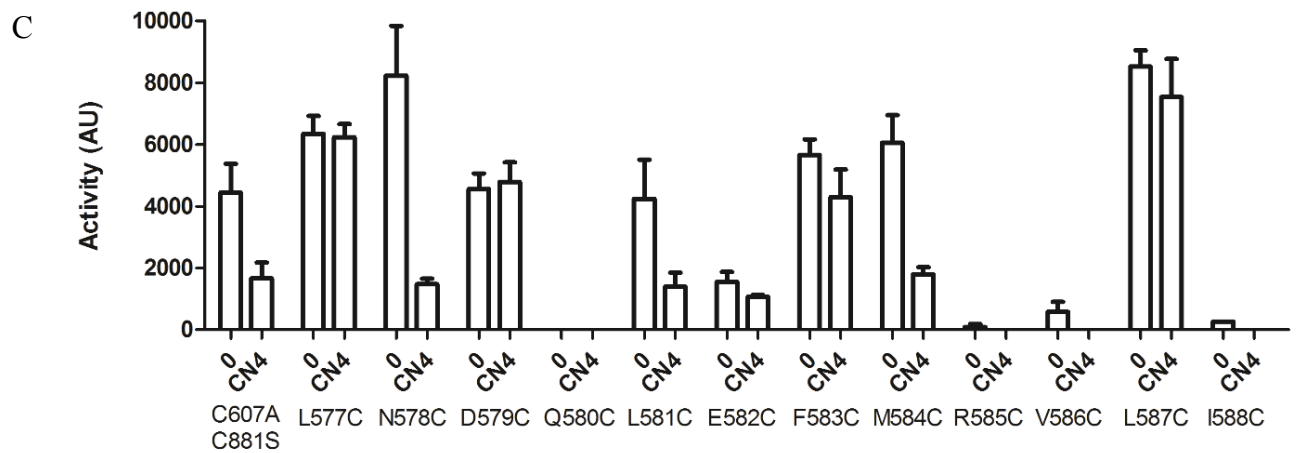
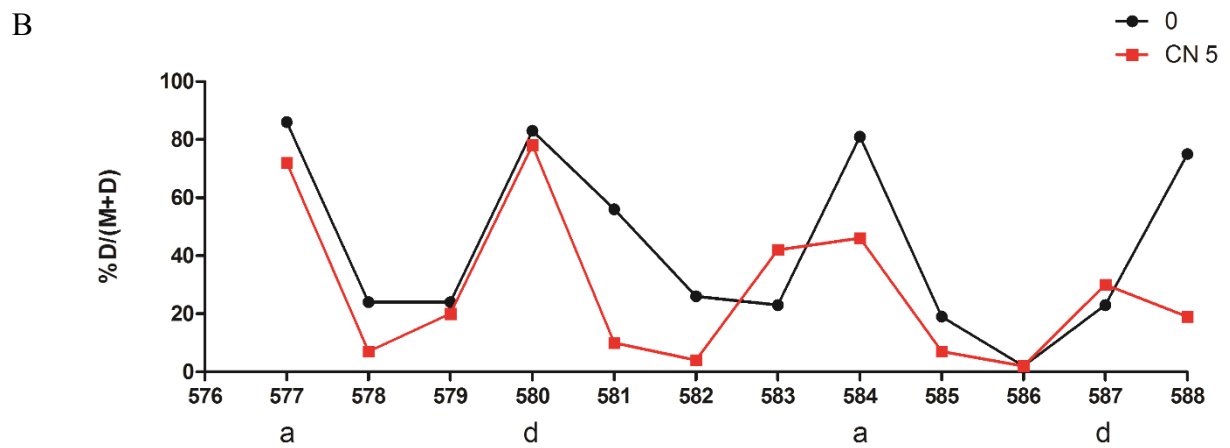
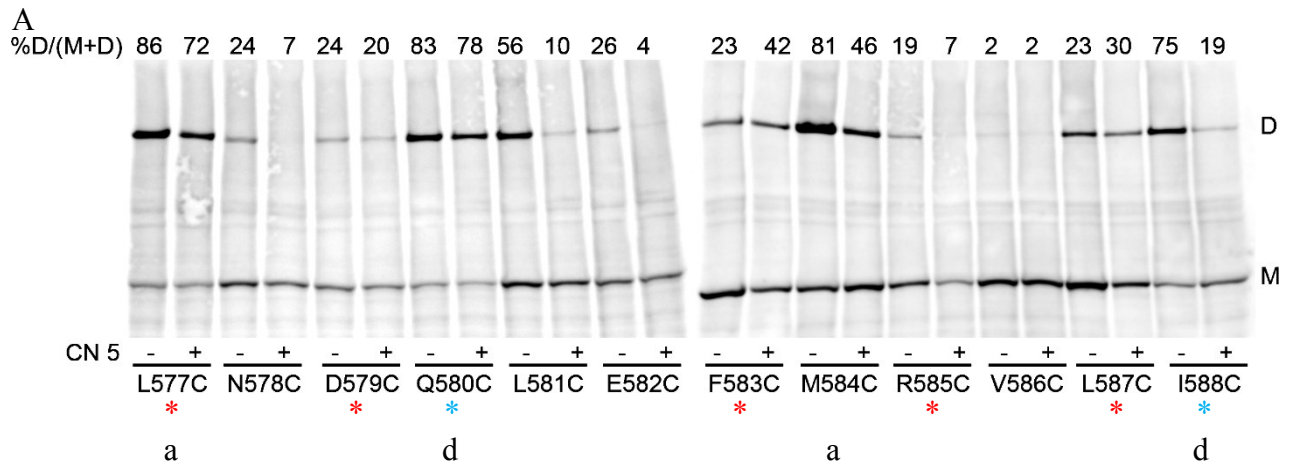
Le fait que la mutation L<sub>563</sub>C à l'interface membrane-cytoplasme inactive BvgS, alors que C<sub>563</sub> forme seulement 9% de pont disulfure spontané chez *B. pertussis* montre l'importance de cette leucine pour l'activité du système. Celle-ci est prédite pour adopter une position 'a' dans le coiled coil. La cystéine présente une hydrophobicité plus faible que la leucine, il est alors possible que la substitution L<sub>563</sub>C déforce le coiled coil à ce niveau, ce qui semble problématique pour la transduction de l'information au sein de BvgS.

En résumé, dans cette région, des contacts proches entre les hélices sont détectés. Après perception de modulateur, il semble y avoir un léger recentrage du coiled coil sur son interface prédite. Les trois premières charges sous-membranaires peuvent être substituées en alanine sans modification de l'activité du système. Les résidus L<sub>563</sub> et R<sub>570</sub> sont requis respectivement pour l'activité kinase et pour la conversion vers l'état phosphatase. Notons que ce dernier résidu est extrêmement conservé dans la famille de BvgS.

#### 4. Caractérisation du coiled coil cytoplasmique précédant le domaine PAS

L'étude de la transduction d'information entre les domaines VFT jusqu'au domaine PAS a été poursuivie en s'intéressant plus en détail à la partie cytoplasmique du linker.

**Figure 88 : Etude de la topologie et dynamique du segment précédant le domaine PAS.** A. Des analyses de cysteine scanning pour différents variants de BvgS<sup>I</sup> ont été réalisées en conditions basales (-) ou après l'ajout (+) de 5 mM de chloronicotinate (CN 5). Les formes monomérique et dimérique sont respectivement annotées M et D. Les proportions de dimères sont indiquées en haut de chaque ligne. Les variants présentant une activité kinase faible ou nulle sont marqués d'un astérisque bleu et ceux présentant une insensibilité aux modulateurs d'un astérisque rouge. B. Les résultats provenant d'une expérience représentative ont été repris sous forme de graphique pour faciliter la lecture. Les proportions de dimères sont montrées en conditions basales (0, courbe noire) ou après la perception de chloronicotinate (CN 5, courbe rouge). C et D. Activités β-galactosidase réalisées sur des lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* (C) ou *fhaB* (D) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 4 mM (CN 4) au milieu de culture. Notons que tous les variants cystéine présentent également les substitutions C<sub>607</sub>A et C<sub>881</sub>S. Les valeurs présentées proviennent de trois expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. E. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le ratio de formation de dimère est indiqué en haut de chaque ligne. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque.



Des analyses de cysteine scanning du segment L577-I588 montrent une formation de pont disulfure selon une périodicité compatible avec le coiled coil prédit (Fig. 88A et B). Les substitutions qui permettent la formation de la plus grande quantité de dimère sont L<sub>577</sub>C, Q<sub>580</sub>C, M<sub>584</sub>C et I<sub>588</sub>C, correspondant à des positions 'a' et 'd' de ce coiled coil, exceptée pour la dernière substitution qui serait un 'e'. Ce dernier résultat implique que si le segment entre la membrane et le domaine PAS forme un coiled coil avec une certaine dynamique, ce dernier s'interrompt quelques résidus avant le noyau du PAS.

L'effet sur l'activité de BvgS de ces substitutions a été déterminé chez *B. pertussis* (Fig. 88C et D). La substitution des résidus Q<sub>580</sub> et I<sub>588</sub> en cystéine inactive BvgS, sans que beaucoup de pont disulfure ne soit formé spontanément chez *B. pertussis* (respectivement 3 et 5 %) (Fig. 88E). Ceci suggère que la nature des résidus en ces positions est importante. Il faut noter que le résidu Gln580 est très conservé dans la famille (Fig. 77). Aucun des différents variants testés ne présente de défaut majeur de production ou de stabilité.

De façon intéressante, la substitution de la glutamine 580 en cystéine inactive BvgS (Fig. 88C et D), alors qu'en arginine, BvgS est non modulable (cf Fig. 75C). Selon nos données de cysteine scanning, le tour d'hélice 577-580 pourrait servir de point de pivot entre les hélices pour la transition kinase-phosphatase, puisque c'est à partir de ce niveau qu'on voit l'effet du nicotinate (cf ci-dessous). L'arginine déstabiliserait le coiled coil trop fortement ; le point de pivot serait alors perdu pour le passage en mode phosphatase. En revanche elle permettrait de garder l'activité kinase, qui nécessite une certaine dynamique. Cette dernière pourrait être altérée par la substitution en cystéine, qui permettrait des contacts plus proches entre les hélices que ne le fait la glutamine, ce renforcement du coiled coil pourrait expliquer le phénotype inactif du mutant BvgS<sup>fl</sup><sub>Q580C</sub>.

La perte d'activité liée à la mutation I<sub>588</sub>C pourrait s'expliquer par le fait que ce résidu est vraisemblablement en interaction avec le domaine PAS (d'après le modèle présenté en partie IV.F. Fig. 50). Enfin, les deux mutants BvgS<sup>fl</sup><sub>E582C</sub> et <sub>V586C</sub>, adoptant respectivement des positions 'f' et 'c' du coiled coil, présentent une activité basale affectée comparée à la souche contrôle (Fig. 88C et D). Ces mutants ne permettent pas la formation spontanée de forte quantité de pont disulfure, excluant ainsi un rôle du pont disulfure pour expliquer la diminution de l'activité kinase à l'état basal (Fig. 88E).

Les analyses de cysteine scanning suite à l'ajout de chloronicotinate avant l'étape d'oxydation montrent une diminution parfois drastique de la formation de dimère à partir de la position 581, pour la plupart des positions testées (de 81 à 46% pour le variant BvgS<sup>fl</sup><sub>M584C</sub> et de 56 à 10% pour BvgS<sup>fl</sup><sub>L581C</sub>, Fig. 88A et B). De nombreuses mutations introduites induisent une insensibilité aux modulateurs (Fig. 88C et D). La formation de pont disulfure de manière spontanée chez *B. pertussis* a alors été déterminée (Fig. 88E). Seul le mutant BvgS<sup>fl</sup><sub>L577C</sub> (position 'a' du coiled coil) présente une forte portion de dimère à l'état basal (65%) qui pourrait expliquer son insensibilité au modulateur. La présence d'une leucine à la position 577 permet des contacts inter-hélices proches mais n'empêche pas leur écartement à la différence d'un pont disulfure. Le résidu L<sub>577</sub> est invariant dans la famille de BvgS (Fig. 77). Ce résidu, avec le résidu Q<sub>580</sub>, pourrait jouer le rôle de pivot pour permettre l'écartement des hélices en

aval lors de la transition vers le mode phosphatase. Pour les autres mutants insensibles, en revanche, des valeurs de 2 à 3% de formation de dimère spontanée sont observables, excluant ainsi le rôle de la formation du pont disulfure dans l'insensibilité. De plus, suite à la perception de modulateur, il semblerait qu'une diminution de la formation de dimère soit observable pour la majorité des mutants insensibles, comme si le modulateur exerçait quand même un effet. Il est probable que chacune de ces substitutions bloque d'une certaine manière la transduction du signal, et que le changement de conformation observé soit insuffisant ou inefficace.

Dans ce segment, la substitution de trois résidus chargés abolit la réponse à la modulation (D<sub>579</sub>C et R<sub>585</sub>C) ou l'activité kinase (E<sub>582</sub>C). Ainsi, au niveau du linker mécanique cytoplasmique, des interactions ioniques intra- ou inter-hélices pourraient se former au sein des hélices ou entre ces dernières et les domaines PAS qui les suivent. Ainsi, le remplacement de ces résidus, en empêchant la formation d'un pont salin, pourrait rendre ces hélices trop flexibles ou mal connectées aux domaines PAS et donc perturber ou empêcher le passage en mode phosphatase. Les différentes interactions ioniques pouvant s'effectuer au sein de ce coiled coil ont été référencées dans la figure suivante (Fig. 89).

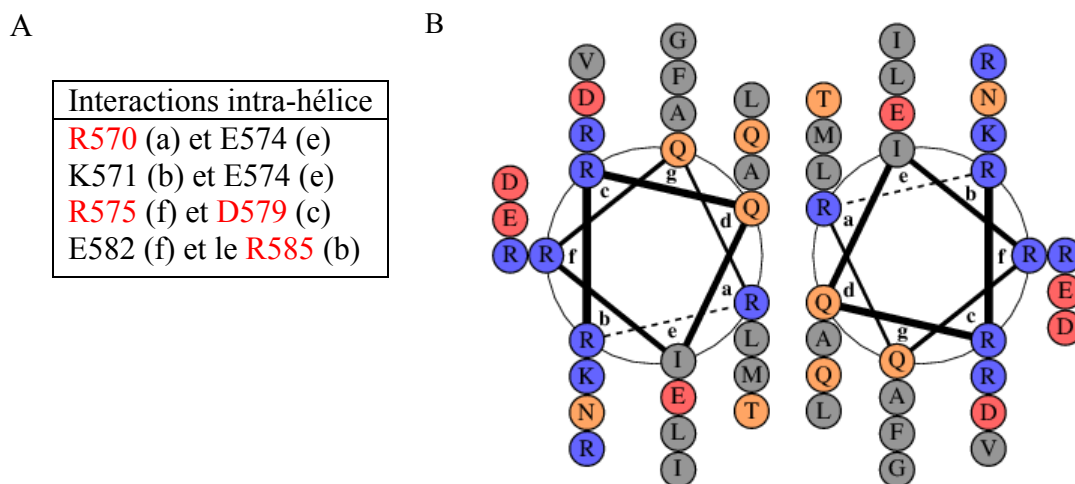


Figure 89 : A. Interactions ioniques pouvant s'effectuer au sein du coiled coil. La position des résidus dans le coiled coil est indiquée grâce à des lettres entre parenthèse. Les résidus colorés en rouge sont ceux qui lorsqu'ils sont substitués permettent l'obtention de mutants insensibles à la modulation. B. Projection hélicoïdale du coiled coil en utilisant DrawCoil 1.0 (<http://www.grigoryanlab.org/drawcoil/>). Les résidus hydrophobes sont colorés en gris, les résidus polaires non chargés en orange, les résidus chargés négativement en rouge et en bleu les résidus positifs.

En résumé, nos résultats sont en accord avec une organisation en coiled coil du segment cytoplasmique, qui s'interromptrait quelques résidus avant le domaine PAS. Ce coiled coil serait sujet à des mouvements de rotation et présenterait une certaine dynamique. Il semblerait que la perception de modulateur entraîne un écartement des deux hélices l'une par rapport à l'autre selon un mouvement de cisaille qui s'articule au niveau des résidus 577-580, permettant la transduction d'un signal aux domaines PAS sous-jacents. Ce type de mouvement pourrait provoquer un changement d'interface des domaines PAS.

En parallèle de ces analyses de cysteine scanning, des modifications du coiled coil (renforcement et déforçement) ont été réalisées par Mlle Maryem Ben Aisa, en stage de

dernière année d'ingénieur, sous ma direction. Pour le renforcer, les résidus prédits pour adopter une position centrale du coiled coil ont été remplacés par des leucines. A l'inverse, les leucines présentes en position 'a' et 'd' du coiled coil ont été substituées en alanine, pour déforçer le coiled coil. Ces différentes mutations ont été introduites sous forme plasmidique chez *B. pertussis* comme dans (Lesne et al., 2016).

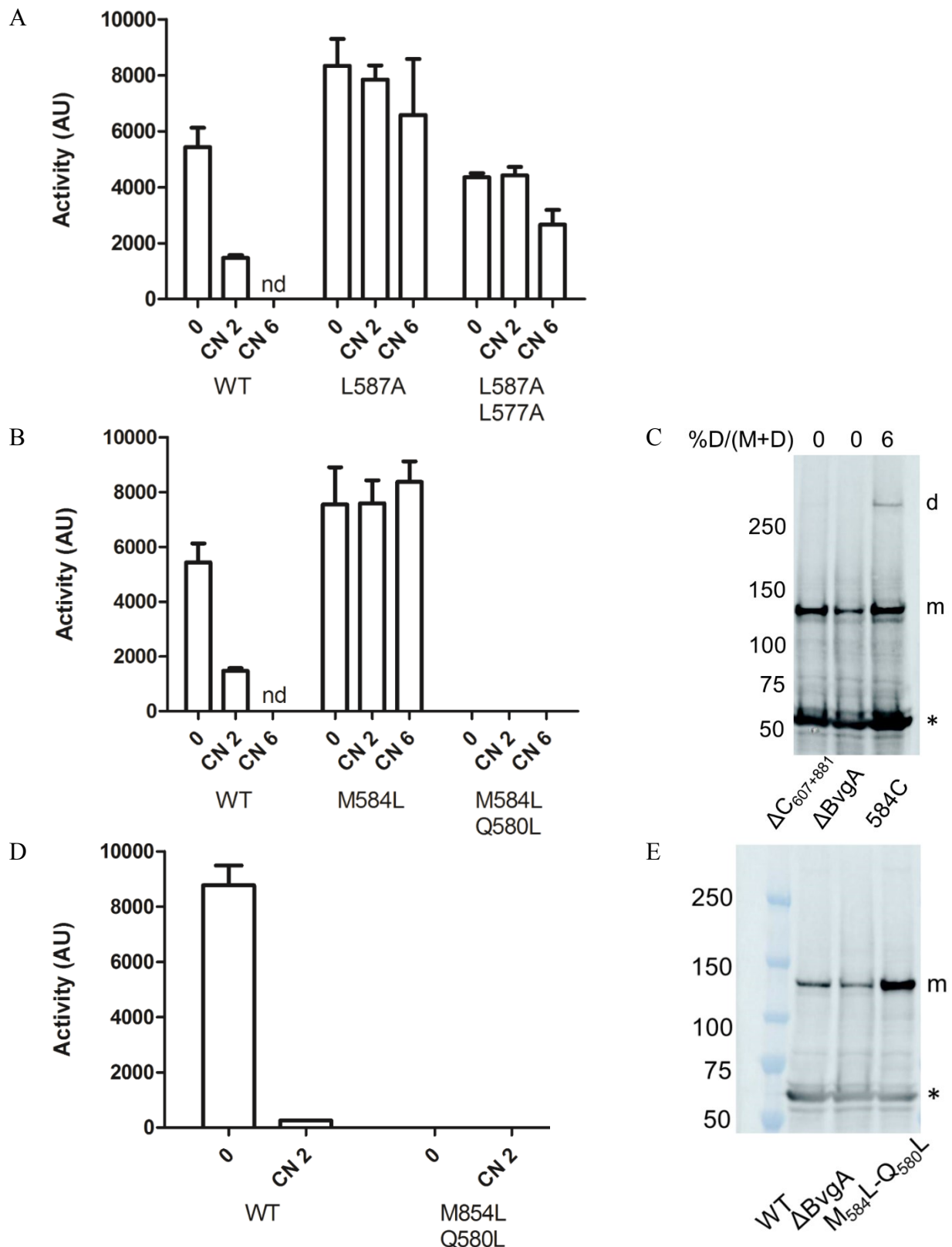
Les leucines 587 et 577 ont été substituées en alanine, seule (L<sub>587A</sub>) ou en combinaison (L<sub>587A</sub>+L<sub>577A</sub>). Les deux mutants obtenus présentent une activité kinase à l'état basal (légèrement affectée pour le double mutant) tandis que leur sensibilité à la modulation semble altérée même aux fortes concentrations de modulateur (Fig. 90A). Ces résultats confirment l'importance, pour le passage à l'état phosphatase, de ces deux leucines relativement bien conservées dans la famille (Fig. 77). Comme énoncé plus haut, la leucine 577 pourrait servir de point de pivot pour favoriser l'écartement des hélices en aval et ainsi le passage en mode phosphatase. La leucine 587 pourrait quant à elle interagir avec le noyau du domaine PAS.

Il est intéressant de noter que la leucine 577 ainsi que la glutamine 580 sont retrouvées au niveau des chimères de BvgS dépourvues de domaine PAS et présentant une sensibilité à la modulation (BvgS<sub>ΔPAS-R3</sub> et <sub>ΔPAS-R4</sub>) mais également chez d'autres homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS et avec un linker de taille semblable (non montré). Ces deux résidus sont absents des deux chimères insensibles aux modulateurs (Lesne et al., 2016) et également des coiled coils de petite taille d'homologues de BvgS (non montré). Ainsi, nous pouvons imaginer que la transduction de signal suite à la perception de modulateur au niveau de ces chimères ferait également intervenir un pivotement des hélices, qui serait possible grâce à ces résidus. Ce mouvement d'écartement permettrait un rapprochement des hélices au niveau du motif LLAAA, pour induire l'activité phosphatase. Ceci pourrait être une des raisons expliquant pourquoi les chimères présentant un coiled coil de petite taille sont insensibles à la modulation. Des analyses de cysteine scanning pourront être réalisées pour tester ces suppositions.

Le remplacement du résidu M<sub>584</sub>, correspondant à la position 'a' de la dernière heptade, par une leucine permet l'obtention d'un mutant actif et insensible à la modulation (Fig. 90B), alors qu'une cystéine à cette position donnait un phénotype sauvage. Chez *B. pertussis*, 6% de dimère sont détectables sur des extraits membranaires (Fig. 90C). Ainsi, l'insensibilité aux modulateurs pour le mutant BvgS<sub>M584L</sub> pourrait être due à une stabilisation dans le bas du coiled coil, ce qui ne permettrait plus l'écartement des hélices  $\alpha$  suite à la perception de modulateur.

La combinaison des mutations M<sub>584L</sub> et Q<sub>580L</sub> permet l'obtention d'un mutant inactif (Fig. 90B et D). La production de BvgS pour ce dernier a été vérifiée, excluant un défaut dans la production/stabilité de la protéine induit par les mutations (Fig. 90 E). La double mutation en leucine permettrait une rigidification trop importante du coiled coil, entravant ainsi la dynamique requise pour l'activité de BvgS.





**Figure 90 : Modification du coiled coil entre la membrane et le domaine PAS en remplaçant les résidus prédits pour adopter une position 'a' ou 'd' du coiled coil par des leucines (renforcement) ou des alanines (déforçement). A, B et D. Activités  $\beta$ -galactosidase réalisées sur des lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* (A et B) ou *fhaB* (D) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 2 et 6 mM au milieu de culture. Les valeurs présentées proviennent de trois expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. C et E. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque.**

En résumé, le coiled coil entre la membrane et le domaine PAS constitue une région critique pour la réponse aux modulateurs étant donné qu'un très grand nombre de mutations ponctuelles permet l'obtention de mutants insensibles. La dynamique de ce coiled coil est nécessaire pour l'activité du senseur-kinase. Un point de pivot est important pour permettre l'écartement des parties C-terminales des hélices. Le mouvement putatif de cisaillement ou de translation latérale des hélices précédant le domaine PAS devrait induire un changement de conformation et/ou de dynamique de ce dernier, permettant au coiled coil en aval du domaine PAS d'adopter sa conformation de repos caractéristique du mode phosphatase (Lesne et al., 2016).

Des analyses de cysteine scanning ont été entreprises afin d'étudier la topologie du domaine PAS à l'état basal et suite à la perception de modulateur par les domaines VFT.

### 5. Etude de la topologie du domaine PAS

Lors de la mise au point du protocole de cysteine scanning, il a été mis en évidence que la cystéine native du PAS, Cys607, permettait la formation de 11% de dimère à l'état basal chez *E. coli*, et que suite à la perception de modulateur, une diminution drastique de formation de pont disulfure était observée. En se basant sur le modèle structural du domaine PAS de BvgS construit *in silico* (Dupré et al., 2013), nous avons ciblé certains résidus des brins  $\beta$  pour des analyses par cysteine scanning (Fig. 91). En effet, il est proposé dans la littérature que la transduction d'information au sein des domaines PAS se fait grâce à un réarrangement du feuillet  $\beta$ .

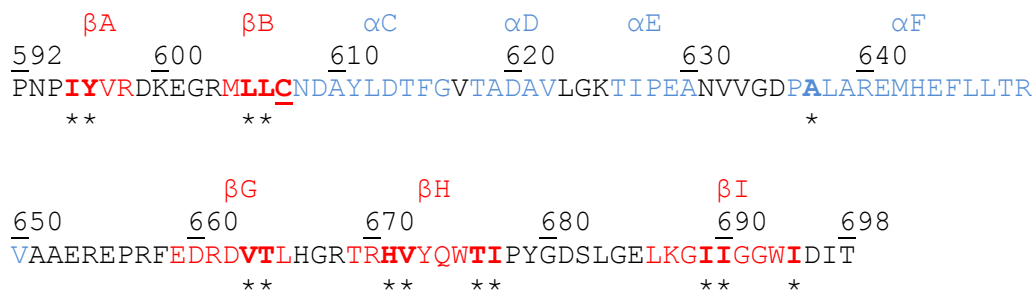


Figure 91 : Séquence protéique du domaine PAS de BvgS. Les brins  $\beta$  sont colorés en rouge et les hélices  $\alpha$  en bleu. La cystéine native 607 est soulignée et a été remplacée, dans nos analyses de cysteine scanning, par une alanine. Les résidus substitués indépendamment en cystéine sont indiqués par les croix et mis en gras.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans la figure 92. De manière étonnante, tous les résidus ciblés permettent l'obtention de pont disulfure dans de relativement faibles proportions de l'ordre de 10% (Fig. 92A). Une cystéine dans le brin  $\beta$ H, correspondant au variant BvgS<sup>fl</sup><sub>H671C</sub>, permet l'obtention d'une proportion de dimère nettement plus élevée (32%), suggérant que cette région participe à l'interface entre les domaines PAS. Le fait que de nombreux résidus permettent la formation de pont disulfure à un faible niveau, suggère une forte dynamique des domaines PAS qui pourraient être sujets à des mouvements de 'respiration'. L'ajout de modulateur diminue la formation de pont disulfure pour tous les mutants construits (Fig. 92A). Ainsi, ces données suggèrent l'idée d'un réarrangement du domaine PAS suite à la perception de modulateur par les domaines VFT. On aurait pu penser

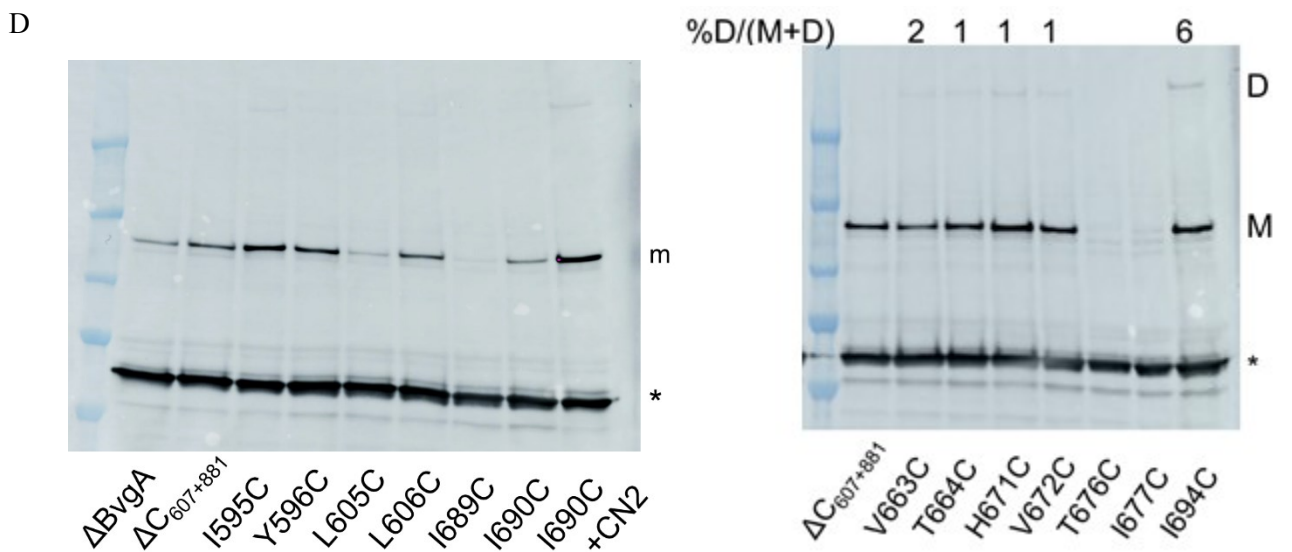
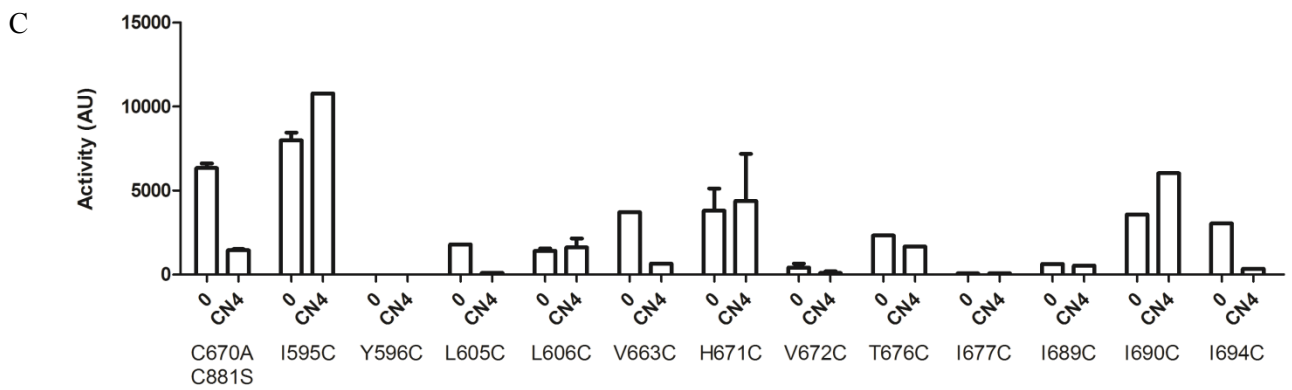
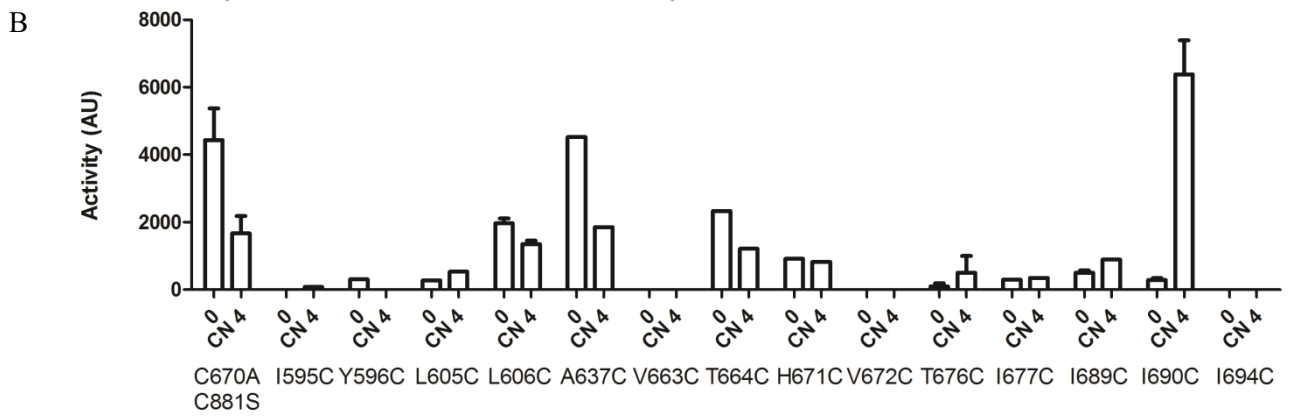
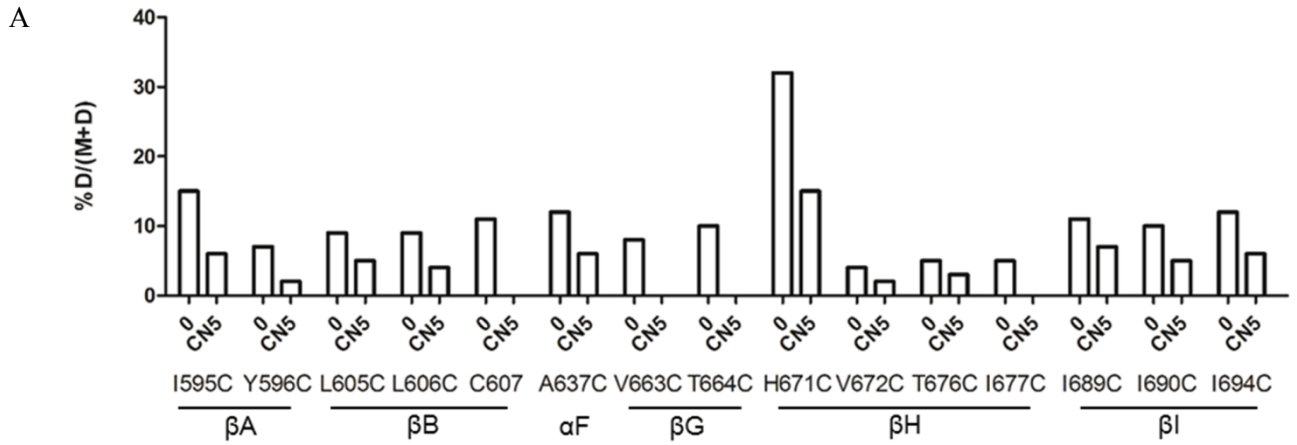
que la formation de pont disulfure pour toutes les positions testées était un artéfact expérimental, mais la diminution systématique de pont disulfure en réponse au modulateur va à l'encontre de cette idée. Notons tout de même que les résultats présentés dans la figure 92A correspondent à une expérience préliminaire qu'il faudra dupliquer, pour confirmer les valeurs obtenues et ainsi s'assurer de sa reproductibilité.

Une grande partie des mutants réalisés lors de cette étude présente une activité affectée chez *B. pertussis* (Fig. 92B et C). En effet, BvgS est inactif dans quatre cas (BvgS<sup>fl</sup><sub>Y596C, V672C, I677C</sub> et <sub>I689C</sub>) et pour la majorité des autres mutants son activité kinase est nettement diminuée. Certains mutants présentent un défaut de production et/ou de stabilité (BvgS<sup>fl</sup><sub>L605C, T676C, I677C</sub> et <sub>I689C</sub>), ce qui expliquerait la perte d'activité (Fig. 92D). Le domaine PAS s'avère donc très sensible à ces substitutions. Quatre mutants sont insensibles aux modulateurs, BvgS<sup>fl</sup><sub>L606C, T676C, I595C</sub> et <sub>H671C</sub>, dont le dernier qui donnait une certaine proportion de ponts disulfure. On remarque de nouveau ici que l'ajout de chloronicotinate chez *E. coli* réduit la formation de pont disulfure, indiquant un réarrangement relatif des domaines PAS alors que l'activité kinase se maintient chez *B. pertussis*, suggérant que les réarrangements observés sont inefficaces. Chez *B. pertussis*, très peu de pont disulfure se forme spontanément, quelle que soit la position de la cystéine. Ceci indique que la perte d'activité ou de réponse à la modulation de la plupart des mutants n'est pas imputable à la formation de pont disulfure (Fig. 92D).

Ainsi, la substitution de ces différents résidus du noyau du domaine PAS a un effet assez drastique sur l'activité de BvgS, ce qui souligne l'importance des feuillettes  $\beta$  du domaine PAS pour le fonctionnement de BvgS. Il se pourrait également que certains des résidus ciblés soient impliqués dans la fixation d'un co-facteur ou ligand agoniste (voir chapitre IX), et que leur substitution déstabilise le domaine PAS. Il a été montré précédemment que ce domaine doit être bien conformé pour l'activité de BvgS et pour le passage en mode phosphatase (Dupré et al., 2013). Tout ceci rend l'analyse de cette région extrêmement délicate.

A ce stade, les résultats obtenus ne nous permettent pas d'établir de modèles fiables des changements de cette région de BvgS entre les états kinase et phosphatase. De nouvelles positions seront ciblées afin de déterminer si des points de contact forts existent entre les feuillettes  $\beta$ .

**Figure 92 : Etude de la topologie et dynamique du domaine PAS de BvgS. A. Représentation sous forme d'histogramme des ratios de formation de dimère obtenus lors des analyses de cystéine scanning pour les différents variants de BvgS<sup>fl</sup>. Ces analyses ont été réalisées en conditions basales (0) ou après l'ajout de 5 mM de chloronicotinate (CN 5). B et C. Activités  $\beta$ -galactosidase réalisées sur des lysats bactériens, représentant l'activité du promoteur *ptx* (B) ou *fhaB* (C) en conditions basales (0) ou après l'ajout de chloronicotinate à 4 mM (CN 4) au milieu de culture. Notons que tous les variants cystéine présentent également les substitutions C<sub>607</sub>A (sauf celui noté C607, où la Cys607 a été conservée) et C<sub>881</sub>S. Lorsque les valeurs présentées proviennent de plusieurs expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés, sinon il s'agit d'une expérience représentative. D. Détermination chez *B. pertussis* de la quantité de BvgS sous forme monomérique (m) ou dimérique (d) dans des conditions basales, sans ajout d'oxydant. Le ratio de formation de dimère est indiqué en haut de chaque ligne. Notons que tous les variants cystéine présentent les mutations C<sub>607</sub>A et C<sub>881</sub>S. Le contrôle de charge est indiqué par un astérisque. 2 mM de chloronicotinate ont été ajoutés à la culture du variants BvgS<sup>fl</sup><sub>I690C</sub> (+ CN 2).**



J'ai cependant obtenu un résultat inattendu et très intéressant. Le mutant BvgS<sup>I690C</sup> présente une très faible activité kinase à l'état basal (Fig. 92C), et l'ajout de modulateur au milieu de culture, accroît cette activité de façon marquée (Fig. 92B). Ainsi, ce variant semble présenter une régulation inversée, puisqu'il nécessite la perception de modulateur pour sa pleine activité kinase. L'utilisation d'une gamme de concentrations croissantes de modulateur a montré que de faibles concentrations sont suffisantes pour la réactivation du mutant (Fig. 93). En revanche, le sulfate de magnésium ne permet pas d'augmenter l'activité de BvgS, même à de fortes concentrations, laissant à penser que pour ce mutant la transmission de l'information est découplée suivant les modulateurs utilisés.

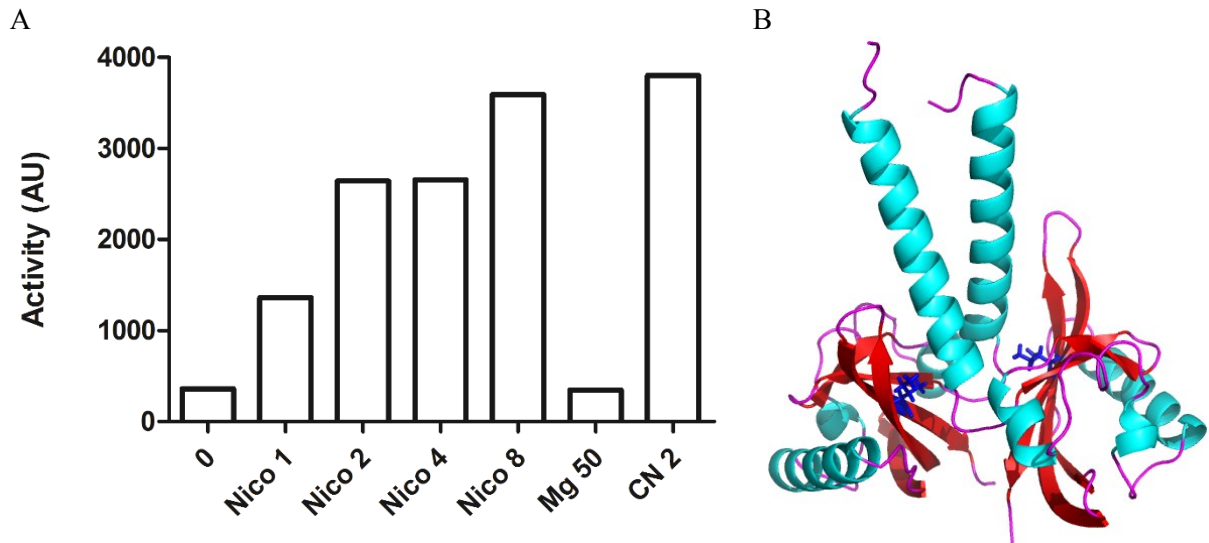


Figure 93 : A. Activités  $\beta$ -galactosidase réalisées sur des lysats bactériens de la souche BvgS<sup>I690C</sup> présentant une régulation inversée, représentant l'activité du promoteur *ptx* en conditions basales (0) ou après l'ajout de concentrations croissantes de nicotinate, MgSO<sub>4</sub> ou de chloronicotinate (respectivement Nico, Mg, et CN) au milieu de culture. Il s'agit de résultats provenant d'une expérience représentative. B. Représentation de la position putative du résidu I<sub>690</sub> sur le modèle *in silico* du domaine PAS de BvgS (Dupré et al., 2013). Le résidu est coloré en bleu foncé, les hélices  $\alpha$  en cyan, les brins  $\beta$  en rouge et les boucles en mauve.

A l'heure actuelle, il est difficile d'expliquer le fonctionnement de ce mutant particulier, mais des hypothèses peuvent être proposées. La mutation I<sub>690C</sub> n'est pas impliquée dans la formation d'un pont disulfure de manière spontanée chez *B. pertussis*, avec ou sans modulateur (Fig. 92D). Ceci exclut donc un rôle du pont disulfure pour la régulation inversée. Sur base du modèle *in silico* du domaine PAS précédemment construit, nous pouvons observer que le résidu ciblé pourrait être en contact avec le coiled coil en amont du domaine PAS (Fig. 93B). Il semblerait qu'à l'état basal, le remplacement de l'isoleucine par une cystéine pose un problème pour la transmission de la dynamique imposée par les VFT vers la kinase. Si cette isoleucine est impliquée dans des contacts avec l'hélice en amont ou avec le noyau du PAS son remplacement par une cystéine perturberait ces interactions, permettant indirectement au linker en aval d'adopter son interface stable. Suite à l'ajout de modulateur, un réarrangement des domaines PAS aurait lieu en réponse à l'écartement des hélices en amont. La mutation I<sub>690C</sub> permettrait alors l'induction d'une dynamique du coiled coil en aval du domaine PAS, favorisant le passage de BvgS en mode kinase.





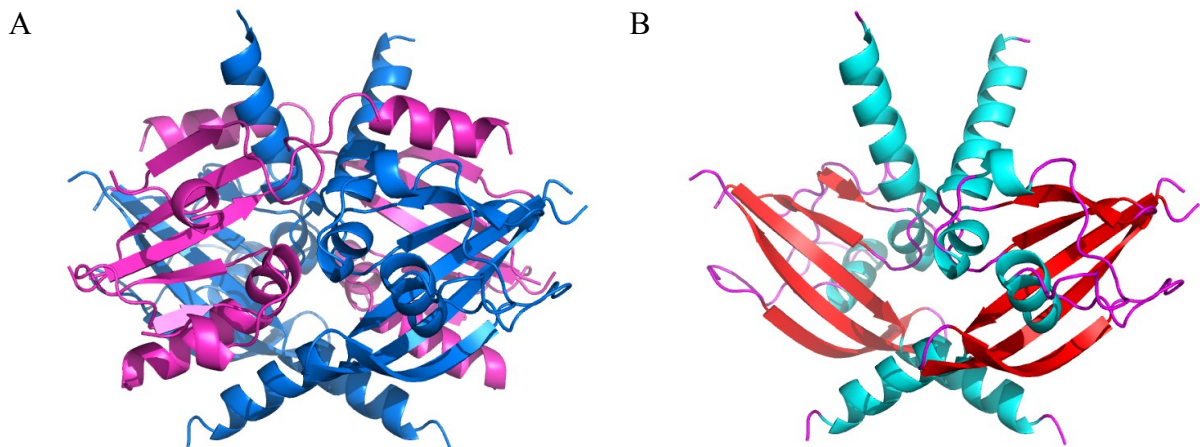


Figure 95 : Structure cristallographique du domaine PAS de BvgS. A. Le dimère central de domaine PAS est coloré en bleu et est en interaction avec des monomères de domaines PAS colorés en mauve. B. Représentation du dimère de domaine PAS central. Les feuilletts  $\beta$  sont colorés en rouge, les hélices en cyan et les boucles en mauve. Les boucles de la structure ne sont pas encore toutes définies.

### C. Bilan sur la transduction de signal au sein de BvgS via les linkers mécaniques.

Les différentes expériences réalisées lors de cette étude ont permis d'étudier en détail la transmission d'information entre les domaines VFT et le domaine enzymatique, la kinase.

Au niveau périplasmique, les hélices H19 présentent des contacts proches et doivent être dotées de la dynamique nécessaire pour la transmission de la contrainte imposée par les domaines VFT. Pour favoriser la transduction de signal, il est possible que certains de ces résidus soient fixés par des interactions avec les têtes polaires des lipides. Dans la première partie du segment transmembranaire, les hélices sont proches et sujettes à une dynamique rotationnelle. Dans la seconde partie du segment, ces hélices ont tendance à s'écarter. Le résidu glycine 549 délimite les deux segments et pourrait constituer un point de pivot. Etant donné qu'aucune différence dans les contacts entre les hélices transmembranaires n'apparaît en conditions de modulation, nous suggérons un mécanisme de piston vertical et symétrique lors de la transition vers le mode phosphatase. La fermeture des VFT1 ou la rigidification des VFT2 après fixation de nicotinate pourrait 'tirer' sur les segments transmembranaires vers le périplasme pour déclencher la transition vers le mode phosphatase.

Vers la fin du segment transmembranaire, on retrouve une organisation en coiled coil, long d'environ 3 tours d'hélice et sujet à une dynamique rotationnelle à l'état basal (kinase). A l'état phosphatase, la dynamique rotationnelle du coiled coil est réduite et le coiled coil n'est plus que de 2 tours d'hélice. Il se termine par une région pivot (L<sub>577</sub>-Q<sub>580</sub>) après laquelle les hélices s'écartent. Les deux résidus Leu577 et Gln580 respectivement en positions 'a' et 'd' du coiled coil sont quasi invariants dans la famille, ce qui souligne leur importance fonctionnelle.

Dans la famille de BvgS, ce linker est caractérisé par la présence de nombreux résidus chargés. L'Arg570, extrêmement conservée adopte une position 'a' du coiled coil et est

nécessaire pour la transition vers le mode phosphatase. Plusieurs autres résidus chargés plus bas dans le coiled coil ont également révélé leur importance pour cette transition. Ils pourraient soit renforcer les hélices par des interactions ioniques intra-chaine, soit interagir avec le domaine PAS, et ces interactions rendraient possible la transition.

Le domaine PAS pourrait adopter deux interfaces. A l'état basal (kinase), il présente une certaine dynamique. La perception de modulateur au niveau des domaines VFT permettrait une réorganisation du domaine PAS. Les analyses de topologie et de dynamique ne nous permettent pas pour l'instant de proposer un modèle de signalisation pour ce domaine, d'autant plus que beaucoup de mutations dans le domaine PAS affectent drastiquement la fonction de BvgS. Le mutant présentant une régulation inversée nous guidera peut être à comprendre le mécanisme de ce domaine.

Le coiled coil situé entre les domaines PAS et kinase présente une forte dynamique à l'état basal favorisant un état dynamique/asymétrique de la kinase. La perception de modulateur permet une rigidification du connecteur et induit alors le mode phosphatase.

Ces différentes informations sont synthétisées grâce au schéma-bilan ci-dessous (Fig. 96).

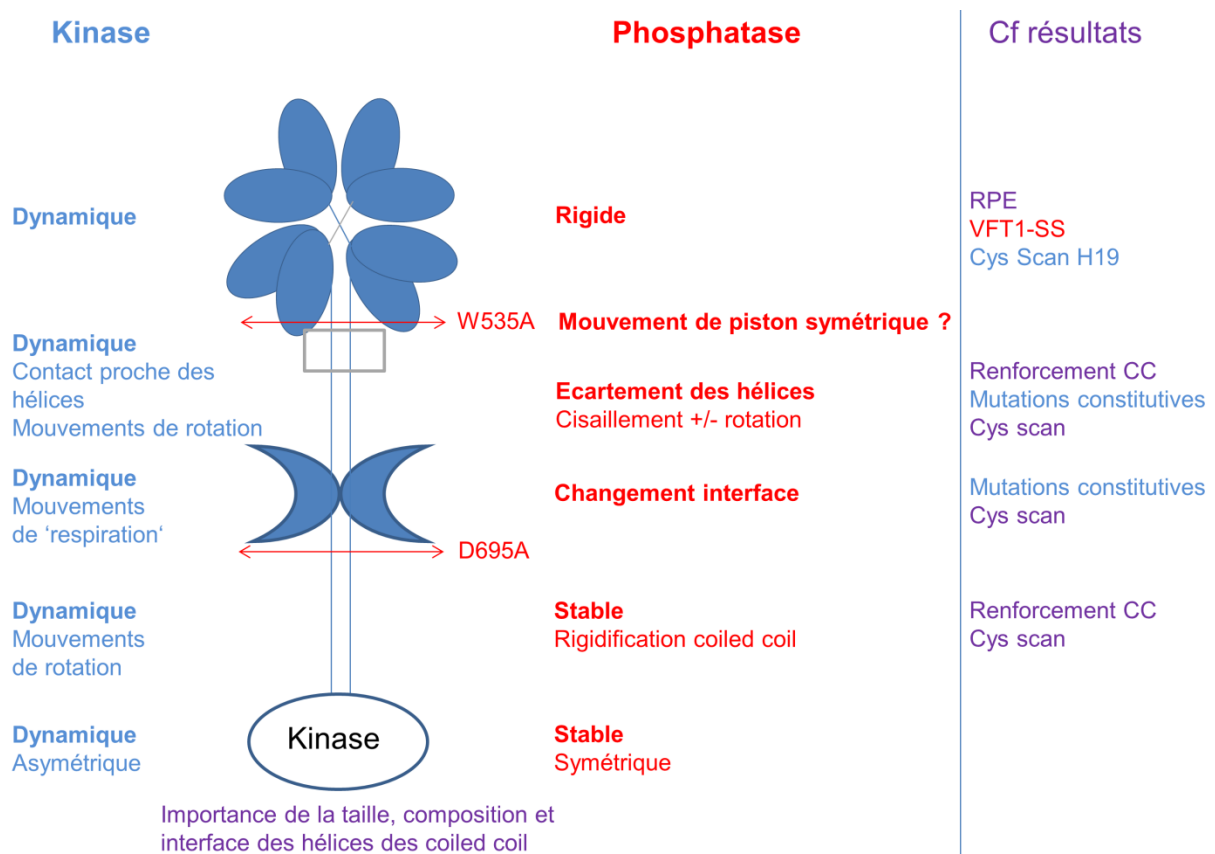


Figure 96 : Schéma bilan de la transduction d'information entre les domaines périplasmiques et la kinase. A l'état basal (kinase, gauche), la dynamique des domaines périplasmiques impose une certaine contrainte/dynamique sur les hélices H19 périplasmiques qui s'étendent dans le cytoplasme. Au niveau membranaire et sous-membranaire des contacts proches des hélices sont observables. Ces dernières sont sujettes à des mouvements de rotation et présentent une certaine dynamique. Le domaine PAS pourrait être doté de mouvement de respiration permettant l'induction d'une dynamique pour le coiled coil en aval qui rend possible l'autophosphorylation de la kinase. Il semblerait alors qu'à l'état kinase, BvgS soit globalement dynamique. A noter qu'il doit y avoir différents degrés de dynamique au sein de la protéine, qui pour le moment n'ont pas pu être quantifiés. Après la perception de modulateur (phosphatase), un

mouvement de piston symétrique tirerait sur les hélices transmembranaires. Ceci causerait sans doute la pénétration limitée du coiled coil sous-membranaire dans la bicouche, ainsi qu'un mouvement de cisaillement induisant un écartement des hélices avant le domaine PAS. Ceci induirait une réorganisation non caractérisée du domaine PAS avec certainement un changement d'interface. Ces modifications permettraient au coiled coil en aval d'adopter son interface stable de repos induisant l'état symétrique et stable du domaine kinase pour l'activité phosphatase. Les mutations W535A (Dupré et al., 2015a) et D695A (Dupré et al., 2013) colorées en rouge permettent l'obtention de mutants inactifs suggérant que ces mutations interrompent le couplage mécanique entre domaines de façon irréversible. Quant aux mutations constitutives elles n'interrompent pas le couplage mais l'affaiblissent modérément, empêchant ainsi la transition vers l'état phosphatase. Dans la troisième colonne du schéma, sont référencés en bleu, rouge et violet, respectivement les résultats supportant le modèle de transmission d'information à l'état basal, suite à la perception de modulateur ou ces deux états d'activité. Pour l'activité du système, la taille, la composition ainsi que l'interface des hélices des deux coiled coils précédant la kinase sont importantes. Les abréviations CC et cys scan correspondent respectivement au coiled coil et aux analyses de cysteines scanning.

Le senseur-kinase BvgS peut fonctionner sous une forme simplifiée avec le remplacement du domaine PAS par un linker provenant d'homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS. Grâce à la construction de ces chimères, la transmission de signal au sein de senseurs-kinases 'simples' peut être étudiée. La composition ainsi que la taille du linker entre les domaines VFT et la kinase jouent un rôle important pour le passage en mode phosphatase. Le schéma bilan ci-dessous (Fig. 97) retrace les informations obtenues lors de l'étude des chimères de BvgS.

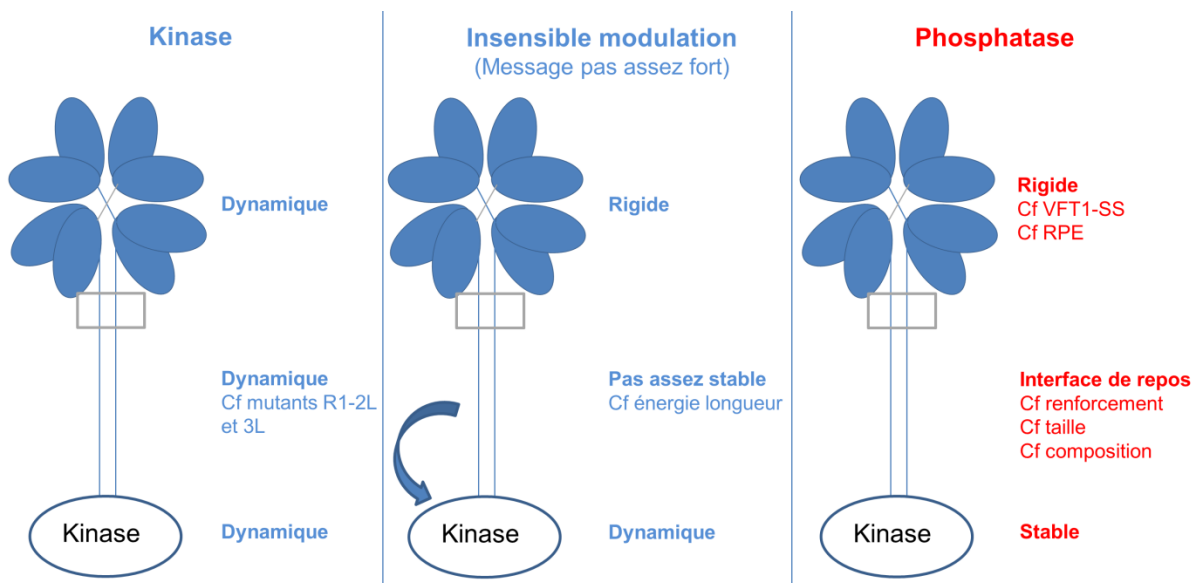


Figure 97 : Schéma bilan de la transduction d'information au sein des chimères de BvgS dépourvues de domaine PAS. A l'état basal (kinase), les domaines VFT vont imposer une contrainte/dynamique sur les hélices H19 périplasmiques qui s'étendent dans le cytoplasme jusqu'au domaine kinase pour permettre son autophosphorylation. BvgS semble caractérisé par une dynamique dont l'intensité doit varier suivant la région du senseur-kinase. Les mutants insensibles à la modulation sont caractérisés par un coiled coil entre les VFT et la kinase de composition particulière ou trop court pour permettre le passage en mode phosphatase. Pour les chimères présentant un linker de plus grande taille, ou un linker plus court mais avec un renforcement du coiled coil, la fermeture du VFT1, ou la perception de modulateur rigidifie le coiled coil aboutissant au mode phosphatase.

## IX. Etude du rôle potentiel du domaine PAS dans la fixation de ligand

Les domaines PAS sont connus pour jouer un rôle dans la perception et la transduction de divers signaux. Nous avons ainsi voulu déterminer si le domaine PAS de BvgS était le site de fixation d'un ligand spécifique. Des études préalables ont montré l'importance de l'intégrité de la cavité du domaine PAS pour l'activité de BvgS (Dupré et al., 2013). Une diminution modérée de la stabilité du domaine conduit à l'obtention de mutants présentant une activité kinase et une insensibilité à la modulation ; lorsque le domaine PAS est davantage déstabilisé les mutants obtenus sont inactifs (Dupré et al., 2013). Sur base des résultats que j'ai obtenus lors de l'étude de la transduction de signaux (partie VIII), nous pouvons proposer qu'une déstabilisation modérée du domaine PAS augmente sa dynamique et entrave ainsi la transition vers l'état phosphatase. Lorsque le domaine PAS est fortement déstabilisé, celui-ci serait alors trop lâche pour contrer la tendance du coiled coil en aval à adopter son interface de repos, ce qui met le domaine enzymatique en mode phosphatase. Pour contrôler la stabilité du domaine PAS et ainsi réguler l'activité de BvgS, la cavité pourrait fixer un ligand particulier. Il peut s'agir d'un ligand agoniste dans l'état basal du système, qui reflèterait par exemple l'activité métabolique de *B. pertussis*. Cette fixation stabiliserait le domaine PAS et lui permettrait de transmettre à la kinase la dynamique des VFT (Fig. 98). Il se pourrait également que le domaine PAS fixe un ligand antagoniste qui induirait une réorganisation du domaine ou un changement de sa dynamique, causant le passage en mode phosphatase. Pour le moment, la piste d'un ligand stabilisateur du domaine PAS a été étudiée puisque nous disposons d'outils pour sa mise en évidence.

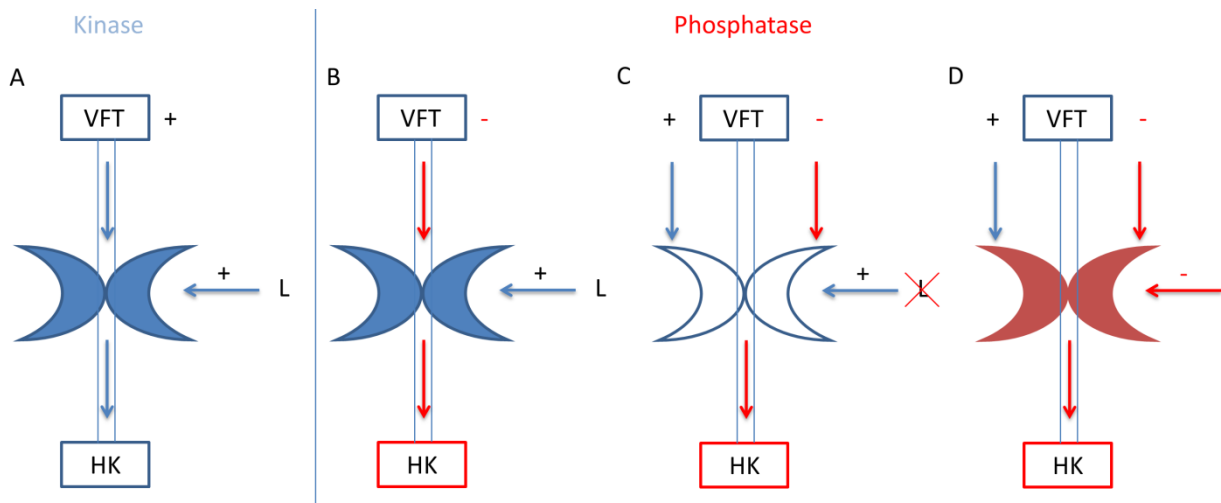


Figure 98: Représentation schématique de l'effet sur l'activité de BvgS, de la fixation hypothétique d'un ligand par le domaine PAS. La fixation d'un ligand agoniste (représenté par la lettre noire 'L', A et B) permettrait de stabiliser le domaine PAS (représenté par la coloration bleue). Ce dernier adopterait alors une structuration/conformation lui permettant de transmettre les signaux provenant des domaines VFT jusqu'à la kinase (annotée HK : entourée de bleu pour caractériser le mode kinase ; entourée de rouge pour le mode phosphatase). Le domaine PAS agirait alors comme un relais de l'information. L'absence de ce ligand agoniste (L barré, en C) déstabiliserait le domaine PAS (représenté par la coloration blanche). Ce dernier serait alors trop lâche pour transmettre les informations provenant des VFT. Le linker en aval adopterait alors sa conformation stable de repos causant le passage vers l'état phosphatase. La fixation d'un ligand antagoniste ('L' coloré en rouge, en D) par le domaine PAS permettrait une déstabilisation ou un réarrangement structural du domaine (représenté par la coloration marron) et conduirait au passage vers l'état phosphatase.

## A. Matériel et méthodes

Pour tester l'existence d'un ligand stabilisateur et l'identifier, la technique de dénaturation thermique appelée TSA a été utilisée sur une protéine PAS recombinante N2C3 purifiée comme dans Dupré et al., 2013. Cette dernière contient le domaine PAS flanqué de ses extensions en hélices N- et C-terminales. Si la fixation d'un ligand stabilise la protéine, sa température de fusion sera alors plus élevée que celle de la protéine seule (Pantoliano et al., 2001). Un kit de cristallisation (silver bullets, Hampton Research) a été utilisé. Ce dernier comprend un grand nombre de petites molécules biologiquement actives, peptides, acides aminés, sels organiques, petits acides organiques, co-facteurs, ainsi que des macromolécules digérées, des intermédiaires de voies biochimiques ou encore des carbohydrates, nucléotides et pharmacophores. Le test de TSA a été réalisé dans un volume réactionnel de 15  $\mu$ l en mélangeant 100  $\mu$ M de protéine (dans du Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), 5x de NanoOrange® (Invitrogen) dilué à partir d'une solution à 500x et 10  $\mu$ l de composés à tester préalablement dissous dans le tampon HEPES 20 mM pH 6,8. Les plaques de 96 puits ont été chauffées de 25° à 85°C avec un gradient de température à raison de 0,07°C/s. Les acquisitions ont été réalisées grâce à un thermocycler (LightCycler 480 II, Roche) en utilisant respectivement les longueurs d'ondes de 465 nm et 510 nm pour l'excitation et l'émission du fluorophore. Les valeurs de  $T_m$  ont été déterminées grâce au logiciel LightCycler480.

## B. Résultats

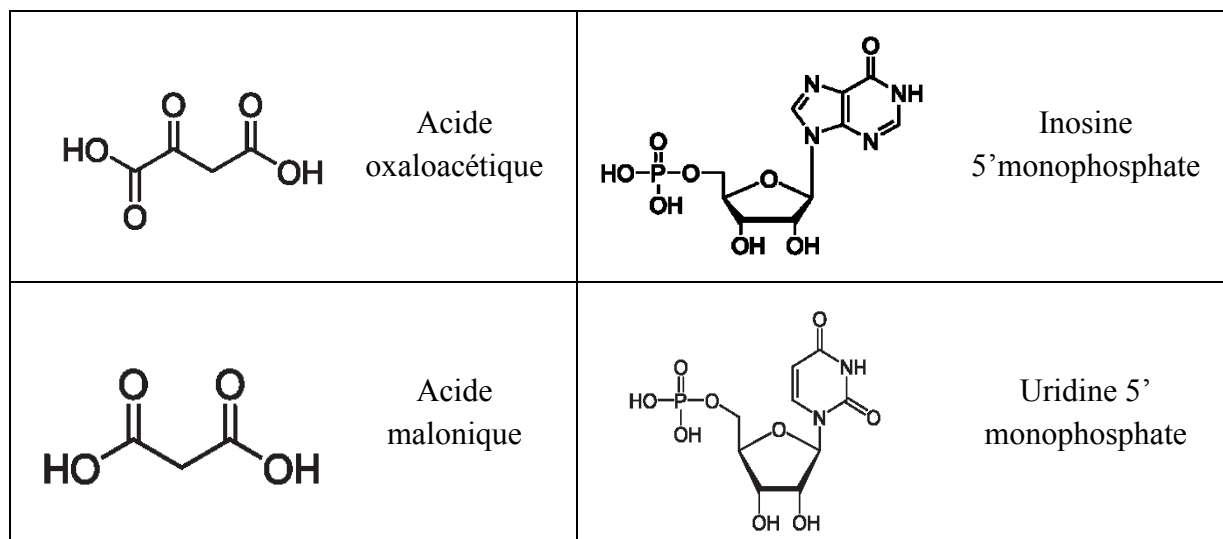
Nous avons décidé de tester l'effet de différents métabolites, puisque l'état nutritionnel de *B. pertussis* affecte l'activité de BvgAS (Nakamura et al., 2006). Ainsi, nous pouvons imaginer que la fixation d'un ligand abondant dans le cytoplasme, lorsque la bactérie est dans un bon état nutritionnel, lui permet la production, coûteuse en énergie, des facteurs de virulence. Dans un environnement carencé, ce métabolite serait moins abondant, et sa faible concentration défavoriserait la fixation sur le domaine PAS, rendant BvgS moins actif ou totalement inactif et permettant ainsi à la bactérie d'utiliser ses ressources pour s'adapter à ce stress.

Un grand nombre de molécules a été testé, et les résultats les plus probants sont présentés ci-dessous (Fig. 99 et 100). Plusieurs composés stabilisent la protéine recombinante. Les molécules induisant une déstabilisation de la protéine ne sont pas représentées.



Figure 99 : Stabilisation thermique du domaine PAS par des ligands potentiels. Les carrés bleus et violets correspondent respectivement au  $T_m$  obtenu avec la concentration maximale de composés (33 mM) ou avec la concentration minimale nécessaire pour une stabilisation supérieure à 2°C. Cette concentration est notée entre parenthèses pour chaque composé.

Ainsi, deux familles de composés ‘stabilisants’ ont été déterminées et sont présentées dans la figure 100.



**Figure 100: Classification en deux familles des molécules permettant une stabilisation de la protéine PAS recombinante.**

L'acide oxaloacétique et l'acide malonique sont liés au cycle de Krebs : le premier est un intermédiaire et le second un inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase. Ces deux molécules sont très semblables, ainsi il est possible que seul l'acide oxaloacétique soit un ligand potentiel pour le domaine PAS. Une diminution de la concentration de cette molécule dans le cytoplasme de *B. pertussis* reflèterait un moins bon état métabolique et le domaine PAS non ligandé serait alors moins stable et pourrait conduire à la perte d'activité de la kinase. L'inosine est impliquée dans la biosynthèse des purines, et l'uridine dans celle des pyrimidines. Les concentrations des composés utilisés sont relativement élevées, mais de l'ordre de celles retrouvées dans le cytoplasme d'*E. coli* (Bennett et al., 2009).

Nous nous sommes ensuite demandé s'il n'y avait pas deux sites de fixation au niveau du domaine PAS, étant donné que les molécules trouvées peuvent être classées en deux groupes. Des mutations avaient été introduites dans la cavité putative du domaine PAS en se basant sur un modèle obtenu *in silico* (Dupré et al., 2013). Ces protéines N2C3 mutantes ont été testées en TSA avec l'ajout des molécules d'intérêt (acide oxaloacétique, inosine, inosine 5' monophosphate, uridine, uridine 5' monophosphate, acide malonique et ammonium citrate tribasique). Ces mutants ont les phénotypes suivants : BvgS<sub>C607A</sub> et BvgS<sub>H643A</sub> sont insensibles au nicotinate ; BvgS<sub>R670A</sub>, moins sensible ; BvgS<sub>Y596A+N631A</sub> ne présente pas d'activité kinase. Pour la protéine N2C3<sub>C607A</sub>, l'ajout d'inosine 5' monophosphate ou d'acide malonique a un effet stabilisant seulement à de forte concentration (33 mM); les autres molécules sont sans effet. L'ajout des différentes molécules à la protéine N2C3<sub>R670A</sub> permet la stabilisation du domaine. Pour les protéines N2C3<sub>H643A</sub> et N2C3<sub>Y596A+N631A</sub> aucune augmentation de T<sub>m</sub> n'est observable après l'ajout des molécules à différentes concentrations. Ces résultats laissent à penser que les ligands potentiels pourraient se fixer dans la cavité en interagissant avec certains de ces résidus. La combinaison de composés des deux familles différentes a un effet additif sur les T<sub>m</sub>, ce qui pourrait impliquer des sites de fixation



différents. Ne disposant pas de la structure du domaine PAS à cette époque, des analyses de docking n'ont pas été entreprises. Ces dernières pourraient apporter des informations sur le site de fixation potentiel de ces molécules, dans ou en dehors de la cavité, et sur les résidus qui pourraient être impliqués.

Deux types de métabolites stabilisent le domaine PAS de BvgS et pourraient se fixer dans sa cavité, supportant un lien entre métabolisme et virulence. Il s'agit de précurseurs d'acides nucléiques, ou d'acides carboxyliques impliqués dans le métabolisme énergétique. Des essais de cristallisation avec ces molécules stabilisatrices ont été infructueux. Ces recherches n'ont pour le moment pas été poursuivies étant donné la difficulté de tester l'effet d'une carence ou déplétion de ces molécules sur l'activité de BvgS. Toutefois, il serait intéressant d'utiliser des techniques plus sensibles comme l'ITC ou la thermophorèse pour confirmer la fixation et déterminer l'affinité des interactions.

Des molécules impliquées dans les mécanismes de transport d'électrons et d'oxydoréduction sont également capables de stabiliser la protéine N2C3. Il s'agit du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui augmentent respectivement le  $T_m$  de 2,5 et 5°C lorsqu'ils sont ajoutés à 33 mM. Il serait intéressant de continuer les analyses de TSA en testant leur effet à plus faible concentration et avec les mutants de cavité du domaine PAS.

Les nombreuses autres molécules testées n'ont pas montré de stabilisation de la protéine recombinante. C'est le cas par exemple de différents sucres. Ces résultats sont en accord avec le fait que *B. pertussis* n'utilise pas de sucre comme source de carbone (Thalen et al., 1999). Au cours de la croissance bactérienne, la bactérie produit du  $\beta$ -hydroxy-butyrate qui peut s'accumuler sous forme de granules de stockage (Thalen et al., 1999). Ce composé ne semble pas constituer un ligand pour le domaine PAS.

D'autres tests de TSA pourraient également être réalisés en utilisant par exemple des lysats de bactéries à différents stades de croissance.

### C. Bilan : Rôle du domaine PAS de BvgS

Les différentes analyses réalisées lors de ce travail ont permis d'avancer dans la compréhension de la fonction du domaine PAS, même si des expériences complémentaires devront être réalisées pour permettre une caractérisation plus complète de ce domaine.

Le domaine PAS semble être dispensable pour l'activité de BvgS étant donné qu'il peut être remplacé par des coiled coils provenant d'homologues sans affecter l'activité kinase. Toutefois, sa présence semble faciliter la transition vers le mode phosphatase, puisque pour les chimères dépourvues de domaine PAS, la réponse à la modulation nécessite un coiled coil suffisamment long ou stabilisé par l'introduction de mutations dans le motif LLAAA.

De nombreuses substitutions spontanées dans le domaine PAS et son hélice flanquante N-terminale permettent l'obtention de mutants insensibles à la modulation, donc bloqués en mode kinase. Ceci suggère un rôle d'interrupteur du domaine PAS pour faciliter le changement d'état réversiblement.

Les analyses de cysteine scanning ont fourni des données préliminaires sur la topologie et dynamique du domaine. A l'état basal, le domaine PAS semble être doté de mouvements de 'respiration' et présenter une certaine dynamique. La perception de modulateur au niveau de la portion périplasmique transmise par le coiled coil précédant le domaine PAS, déclencherait un changement d'interface du domaine PAS. Les analyses de cysteine scanning seront poursuivies dans le but d'identifier les deux interfaces adoptées par le domaine PAS et possiblement les changements de structure quaternaire qui doivent s'effectuer pour permettre la transduction de signal.

## X. Le mutant $\Delta$ PAS 65 : un bon modèle d'étude

### A. Construction du mutant

Pour étudier le rôle du domaine PAS dans la signalisation de BvgS, ce dernier avait été remplacé par des hélices  $\alpha$  de différentes tailles provenant d'homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS (Lesne et al., 2016). Lors de cette étude, nous avons construit plusieurs chimères, dont une à partir du senseur-kinase de *Pseudomonas sp. M1* (GI 575529121) (Fig. 101). Ce mutant a été appelé  $\Delta$ PAS 65 et s'est avéré présenter une régulation inversée.

```
TM BvgS                               Coiled coil Pseudomonas sp. M1                               HK BvgS
 $\Delta$ PAS 65 IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLRGRIIRKRRDLEQRQLLLEDELRRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIRTPMNAI
          a d a d a d a d a d
```

Figure 101 : Séquence du mutant  $\Delta$ PAS 65 comprenant le segment transmembranaire (en rose) et le domaine DHP (en rouge) de BvgS. Le linker séparant ces deux domaines provient de l'homologue de BvgS *Pseudomonas sp. M1* (GI 575529121) et est prédit pour former un coiled coil dimérique. La prédiction de coiled coil est indiquée en dessous de l'alignement par les lettres 'a' et 'd'.

### 1. Matériel et méthodes

Un gène synthétique portant le segment transmembranaire de BvgS, le linker provenant de l'homologue de *Pseudomonas sp. M1* et la première partie du domaine DHP de BvgS a été introduit dans le pUC19mpla en remplacement du fragment sauvage BglIII-XbaI. La cassette EcoRI-HindIII du plasmide recombinant a été insérée dans le pBBR-MCS4, puis transféré dans la souche BPSM<sub>new $\Delta$ PAS</sub> portant les fusions transcriptionnelles *ptx-lacZ* ou *fhaB-lacZ* (Dupré et al., 2015a). Rappelons que la toxine pertussique nécessite une concentration plus importante de BvgA phosphorylé pour son expression comparée à celle requise pour la production de la FHA.

### 2. Résultats

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci-dessous (Fig. 102).

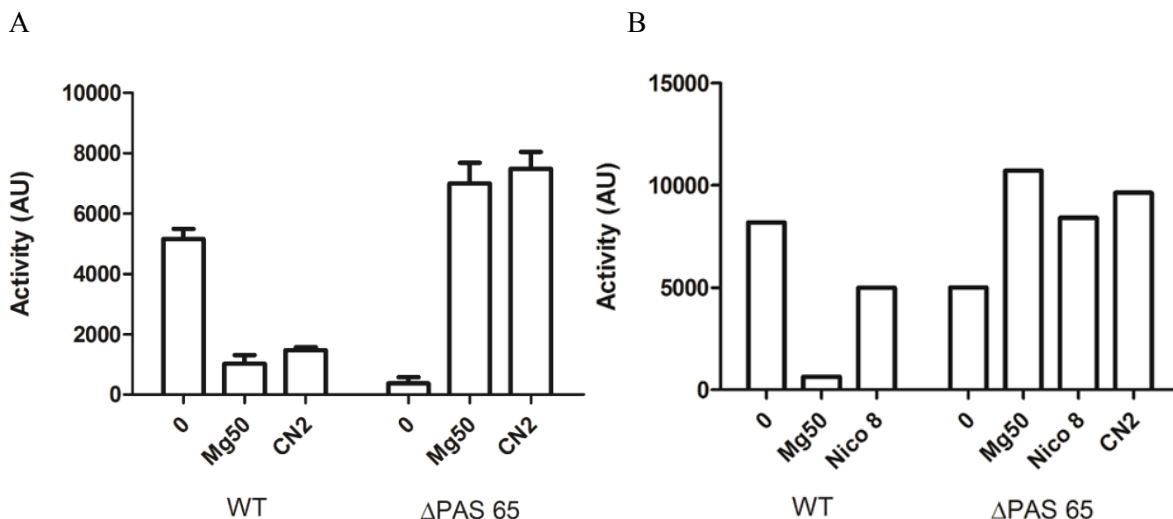


Figure 102 : Activités  $\beta$ -galactosidase du mutant  $\Delta$ PAS 65 représentant l'activité du promoteur *ptx* (A) ou du promoteur *fhaB* (B). Les activités ont été déterminées en conditions basales (0) ou après la perception de modulateurs ( $\text{MgSO}_4$  à 50 mM, nicotinate à 8 mM et chloronicotinate à 2 mM). Les valeurs présentées proviennent de 3 expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés pour A. En B sont présentés les résultats obtenus à partir d'une expérience représentative.

À l'état basal, le mutant  $\Delta$ PAS 65 présente une activité kinase très faible (Fig. 102A). L'ajout de modulateurs chimiques, qui chez BvgS sauvage permet le passage en mode phosphatase, induit chez le mutant  $\Delta$ PAS 65 une forte activité  $\beta$ -galactosidase, caractéristique d'un mode kinase. Avec le rapporteur *fhaB-lacZ*, le mutant présente une activité kinase non négligeable à l'état basal (environ 5 000 unités arbitraires) qui augmente après la perception de modulateur (Fig. 102B).

Nous avons ainsi construit une chimère dotée d'une régulation inversée, puisqu'elle nécessite la présence de modulateur pour son activité kinase optimale. Sa très faible activité kinase à l'état basal pourrait s'expliquer par un positionnement suboptimal de l'histidine par rapport au site catalytique, ou par une dynamique restreinte du coiled coil. La perception de modulateur induirait le bon positionnement de l'histidine par rapport au site catalytique ainsi qu'une dynamique suffisante du coiled coil pour permettre la conformation dynamique, asymétrique de la kinase nécessaire à son autophosphorylation. Différents mutants ont été construits pour comprendre le fonctionnement de cette chimère.

## B. Importance d'une périodicité de 7 acides aminés

Les différentes chimères précédemment construites sont en mode kinase à l'état basal et présentent un coiled coil entre le segment membranaire et le domaine DHp de la kinase dont la taille varie d'un multiple de 7 acides aminés (Fig. 103, (Lesne et al., 2016)). Le mutant  $\Delta$ PAS 65, quant à lui, possède un résidu supplémentaire par rapport à cette périodicité (7x +1) (Fig. 103). Vu l'importance d'une périodicité en heptade pour l'hélice de signalisation précédant la kinase (Möglich et al., 2009b), un résidu a été enlevé au mutant  $\Delta$ PAS 65, ce qui a généré le mutant  $\Delta$ PAS 64.

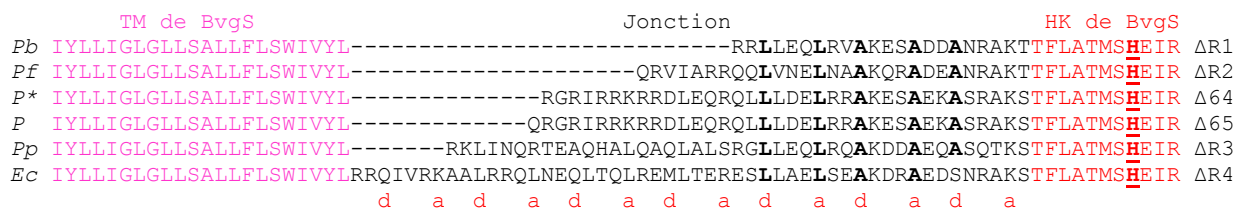


Figure 103 : Alignement de séquence des différentes chimères de BvgS dépourvues de domaine PAS et présentant entre le segment transmembranaire de BvgS (en rose) et le domaine DHp de BvgS (en rouge) un coiled coil de séquence naturelle issue d'homologues de BvgS. Les espèces d'où proviennent les linkers sont indiquées à gauche de l'alignement : *Pb*, *Pseudomonas brassicacearum* (GI 742884217); *Pf*, *Pseudomonas fragi* (GI 515153750); *P* et *P\**, *Pseudomonas sp. MI* (GI 575529121) où une délétion de la première glutamine a été effectuée pour le *P\**, *Pp*, *Pseudomonas putida* (GI 24985059); et *Ec*, *Enterobacter cloacae* (GI 915610361). Le nom des variants correspondants est indiqué à droite de l'alignement (Lesne et al., 2016). La prédiction de coiled coil est illustrée par les lettres 'a' et 'd' en-dessous de l'alignement. Le motif LLAAA est mis en gras.

### 1. Matériel et méthodes

Pour réaliser le mutant  $\Delta$ PAS 64, un gène synthétique portant la séquence du mutant  $\Delta$ PAS 65 avec une délétion de sa première glutamine après le segment membranaire a été introduit dans le vecteur pUC19mpla grâce à un échange de cassette (BglII-XbaI) (Fig. 103). La suite de la démarche expérimentale est la même que ci-dessus.

### 2. Résultats

Le mutant  $\Delta$ PAS 64 présente une activité kinase à l'état basal et est capable de passer en mode phosphatase suite à la perception de modulateur (Fig. 104). Il est même plus sensible à

la modulation que la souche exprimant BvgS sauvage, puisque 1 mM de nicotinate suffit à diminuer drastiquement l'activité  $\beta$ -galactosidase. En revanche, le mutant à régulation inversée,  $\Delta$ PAS 65, ne présente pas de sensibilité accrue à la modulation.

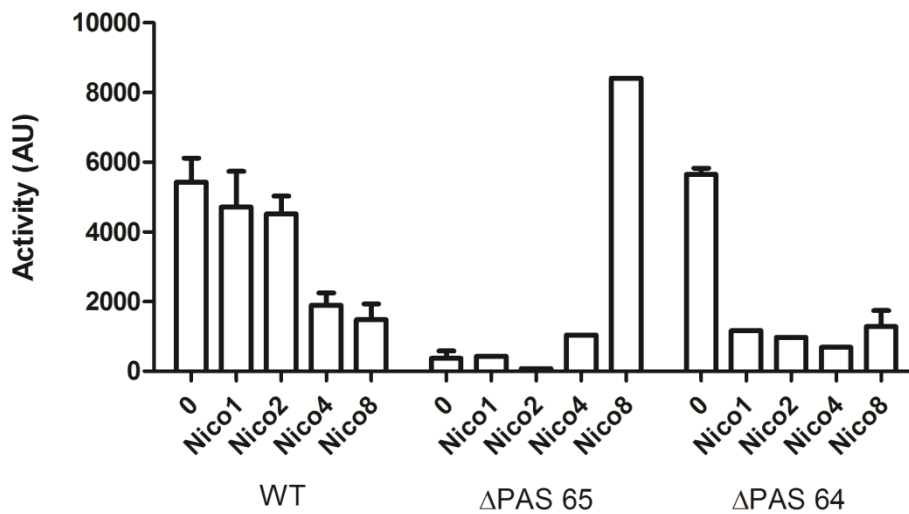


Figure 104 : Activités  $\beta$ -galactosidase reflétant l'activité du promoteur *ptx* pour les mutants  $\Delta$ PAS 64 et  $\Delta$ PAS 65 en comparaison avec la souche WT, à l'état basal (0) ou après la perception de nicotine (concentrations exprimées en millimolaires). Les résultats proviennent d'une à trois expériences représentatives. La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

Ainsi, la restauration de l'activité kinase à l'état basal pour le mutant  $\Delta$ PAS 64 pourrait s'expliquer par un réalignement entre l'histidine du DHP et le domaine catalytique, favorable à l'autophosphorylation. L'hypersensibilité du mutant  $\Delta$ PAS 64, suggère que le coiled coil adopte une conformation 'pré-modulée', c'est-à-dire qui peut basculer facilement dans l'état phosphatase suite à la perception de modulateur. La délétion d'un résidu a permis le changement d'interface du coiled coil. Cette modification pourrait donner un coiled coil plus stable, qui nécessiterait la perception de moins de modulateur pour passer de l'état kinase à l'état phosphatase.

### C. Détermination des conditions d'activation du $\Delta$ PAS 65 autre que la perception de modulateurs chimiques

#### 1. La fermeture du VFT1 a-t-elle un effet sur l'activité du mutant $\Delta$ PAS 65 ?

Le VFT1 pourrait être le site de fixation d'un ligand particulier perçu par la bactérie à un certain moment de son cycle infectieux, pour permettre le passage en phase Bvg<sup>-</sup>. Nous nous sommes alors demandé si la fermeture du VFT1 rendrait au mutant  $\Delta$ PAS 65 sa pleine activité kinase à l'état basal, puisque la fermeture de ce domaine dans BvgS sauvage affecte fortement son activité kinase (Dupré et al., 2015a).

##### a. Matériel et méthodes

Pour mimer la fermeture du VFT1, un pont disulfure a été introduit entre les lobes de ce domaine en substituant les résidus E<sub>113</sub> (lobe 1) et N<sub>177</sub> (lobe 2) par des cystéines. Le mutant a été obtenu grâce à un échange de cassette (SpeI-BamHI) entre les vecteurs pUC19mos<sub>E113C+N177C</sub> et pUC19mpla <sub>$\Delta$ PAS65</sub> pour obtenir le vecteur intermédiaire pU19mpla <sub>$\Delta$ PAS65+E113C+N177C</sub>. La suite de la démarche expérimentale est la même que ci-dessus.

### b. Résultats

La fermeture du VFT1 restaure la pleine activité kinase du mutant à régulation inversée à l'état basal (Fig. 105). Cette activité est sensible à l'ajout de TCEP, qui permet la réouverture du VFT1 après réduction du pont disulfure.

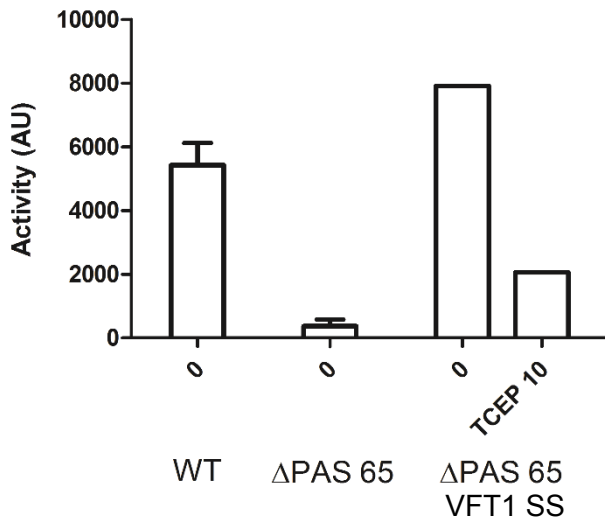


Figure 105 : Activités  $\beta$ -galactosidase reflétant l'activité du promoteur *ptx* pour la souche sauvage (WT), le mutant  $\Delta$ PAS 65 et le mutant portant un pont disulfure qui induit la fermeture du domaine VFT1 ( $\Delta$ PAS 65 VFT1 SS). Les activités ont été déterminées sur des lysats de cultures bactériennes réalisées en milieu SS seul (annoté 0) ou supplémenté de TCEP à 10 mM pour réduire le pont disulfure. Il s'agit de résultats obtenus à partir d'une ou plusieurs expériences représentatives. La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

Ces résultats semblent contredire notre modèle qui propose que la dynamique des domaines VFT mette BvgS en état kinase (Dupré et al., 2015a). En absence de domaine PAS, si la dynamique du coiled coil qui précède le domaine DHp est nécessaire pour l'état kinase (Lesne et al., 2016), il faut faire l'hypothèse que cette dynamique peut exister indépendamment des mouvements des VFT1 et serait dans ce cas-ci liée aux caractéristiques intrinsèques du coiled coil. La fermeture des VFT1, tout comme l'ajout de nicotinate ou de  $MgSO_4$ , pourrait forcer ce coiled coil à quitter son interface de repos et ainsi à redevenir dynamique.

## 2. Effet de la température sur l'activité de BvgS

L'activité de BvgS est également régulée par la perception d'un stimulus physique, la température. En effet, de faibles températures (inférieures à 25°C) permettent le passage en mode phosphatase. Pour tester l'effet de la température sur l'activité du mutant à régulation inversée, la technique de Phos-tag a été utilisée.

### a. Matériel et méthodes

Des cultures de 12 mLensemencées à une  $DO_{600nm}$  de 0,2 à partir de précultures liquides ont été incubées 20 heures à 37°C sous agitation (200 rpm). Des aliquots de 1 mL ont été prélevés (T0). Après centrifugation du reste des cultures, les bactéries ont été resuspendues dans du milieu frais à 20°C, et des prélèvements ont été réalisés au cours du temps. Les culots bactériens sont repris dans 1 mL de 100 mM de sodium phosphate (pH 7), 10 mM KCl et 1 mM  $MgSO_4$  supplémenté de DNase (10  $\mu$ g/mL) avant d'effectuer une ribolyse (force 6, 50 secondes) suivie d'une centrifugation de 10 000 g, 10 min à 4°C. Le reste de la procédure a été réalisée comme dans (Dupré et al., 2015b).



### *b. Résultats*

La cinétique de déphosphorylation de BvgA pour BvgS WT et pour le mutant  $\Delta$ PAS 65 suite à un changement de température est présentée dans la figure 106.

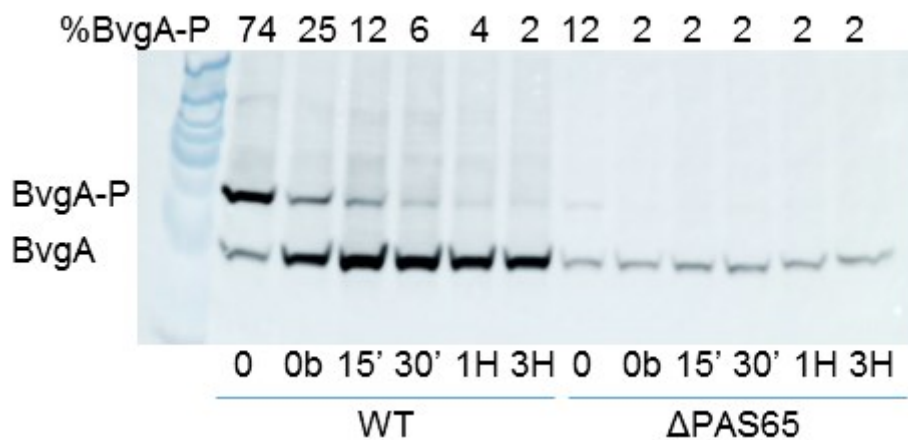


Figure 106 : Détermination par la technique de Phos-tag de l'effet d'un changement de température sur la quantité de BvgA phosphorylé. Le T0 correspond au prélèvement réalisé sur la culture à 37°C avant la centrifugation (10 min à température ambiante, env. 22°C), et le temps T0b au prélèvement après resuspension dans le milieu à 20°C. Une cinétique de phosphorylation a été réalisée sur 3 heures. Le pourcentage de BvgA phosphorylé est indiqué en haut de chaque ligne.

Nous pouvons observer une chute rapide suivie d'une diminution plus lente de la quantité de BvgA phosphorylé pour les deux souches suite au changement de température. La diminution de température pour le mutant  $\Delta$ PAS 65 ne semble pas permettre sa réactivation. La température affecte vraisemblablement la dynamique de BvgS dans sa globalité, y compris celle du linker précédant la kinase.

### **3. Effet de la phase de croissance sur l'activité de BvgS**

Il a été rapporté que BvgS serait sensible à la phase de croissance (Nakamura et al., 2006), puisqu'une diminution de la transcription des gènes de virulence est observée après l'entrée en phase stationnaire. Dans le tractus respiratoire humain, la disponibilité en nutriments semble être limitée (Armstrong, 2015). Ainsi, induire une carence nutritive permettrait de se rapprocher des conditions rencontrées par la bactérie dans son hôte. Dans le milieu SS, le glutamate est la source majeure de carbone (Thalen et al., 1999; Nakamura et al., 2006). Nous avons proposé (cf partie IX) que le domaine PAS pourrait percevoir des signaux cytoplasmiques métaboliques. Ainsi, en conditions de carence nutritive (restriction en glutamate), la comparaison de la croissance de la souche sauvage avec celle des souches  $\Delta$ PAS 64 et  $\Delta$ PAS 65 produisant des chimères sans domaine PAS, pourrait indiquer si ce dernier est impliqué dans la fixation d'un métabolite. Dans ce cas, les souches mutantes pourraient voir leur croissance affectée puisque le métabolite putatif marqueur de 'stress nutritionnel' ne serait pas perçu et ne pourrait pas réguler l'activité de BvgS.

#### *a. Milieu SS carencé en glutamate*

A partir de précultures liquides de nuit, 50 mL de milieu SS contenant du glutamate à 20% de sa concentration habituelle ont étéensemencés à une  $DO_{600nm}$  de 0,4. La mesure de densité optique a été réalisée en continu avec un appareillage Elocheck (Biotronix).

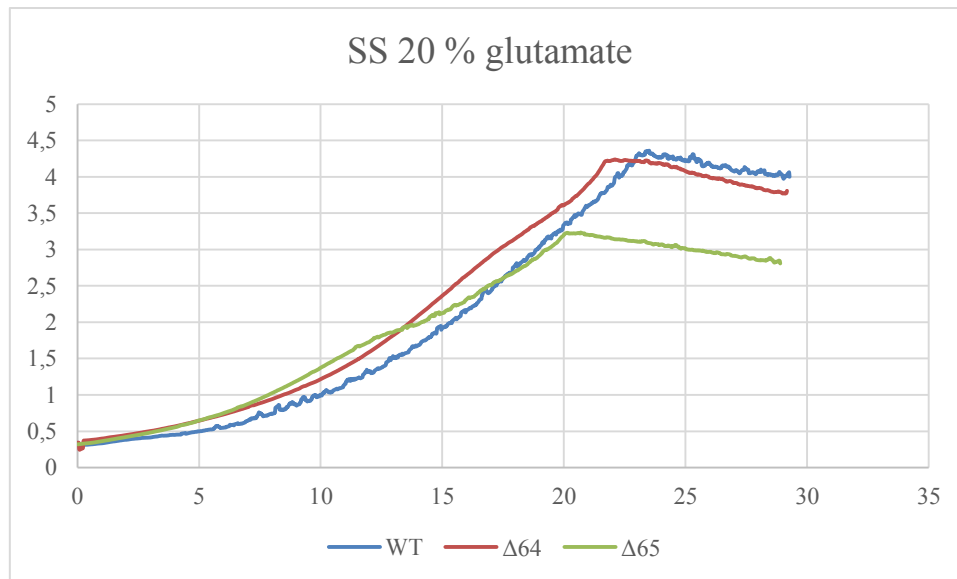


Figure 107 : Courbe de croissance des souches WT,  $\Delta$ PAS 64 et  $\Delta$ PAS 65 en milieu SS carencé en glutamate (20% de la concentration normale). La densité optique à 600nm est indiquée en ordonnée et le temps exprimé en heures est indiqué en abscisse.

Les profils de croissance des souches WT et  $\Delta$ PAS 64 sont semblables, laissant à penser que la présence ou l'absence de domaine PAS n'influence pas la croissance bactérienne (Fig. 107). Cependant la souche  $\Delta$ PAS 65, dont l'activité kinase est très faible à l'état basal, atteint sa phase stationnaire plus rapidement que les deux autres souches. Il a été rapporté qu'une souche bloquée en phase Bvg<sup>+</sup> présentait un défaut de croissance en conditions de carence en glutamate, probablement parce qu'elle continue à produire des facteurs de virulence coûteux en énergie (Nakamura et al., 2006). Ainsi, nous pouvons nous demander si la carence nutritive n'induirait pas la réactivation du mutant  $\Delta$ PAS 65, expliquant son léger défaut de croissance.

La quantité de BvgA phosphorylé au milieu et en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire a été déterminée par des analyses de Phos-tag. Des cultures de 20 mL carencées en glutamate ont été initiées à une DO<sub>600nm</sub> de 0,4 avec les différentes souches d'intérêt, et des prélèvements (2 ml) ont été réalisés au cours du temps.

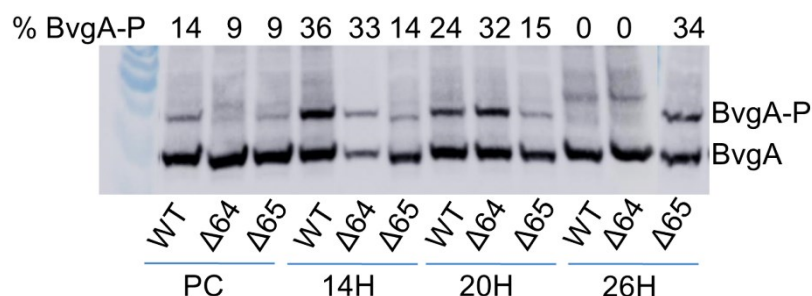


Figure 108 : Détermination de la quantité de BvgA phosphorylé par Phos-tag, sur des lysats bactériens obtenus à partir de cultures en milieu SS avec 20% de la concentration normale de glutamate. Les prélèvements réalisés (PC, 14H, 20H, et 26H) correspondent respectivement à la préculture de nuit, à la phase exponentielle, la fin de phase exponentielle et à la phase stationnaire. La quantité de BvgA phosphorylé est indiquée au-dessus de chaque ligne.

La quantité de BvgA phosphorylé diminue entre le milieu et la fin de la phase exponentielle, puis devient nulle en phase stationnaire pour la souche WT (Fig. 108). Pour la souche  $\Delta$ PAS

64, ce n'est qu'en phase stationnaire qu'on observe une diminution de la quantité de BvgA phosphorylé, indiquant que la chimère est légèrement moins sensible à la carence que la souche WT. Pour la souche  $\Delta$ PAS 65, la quantité de BvgA phosphorylé reste également constante en phase exponentielle mais tend à augmenter en phase stationnaire. Ainsi, la production d'un métabolite ou un effet de quorum sensing pourrait réactiver le mutant tandis qu'il inactiverait la souche sauvage. Cet effet semble indépendant de la présence de domaine PAS.

L'apparition plus rapide de la phase stationnaire pour la souche  $\Delta$ PAS 65 n'est pas facile à expliquer par les résultats de Phos-tag. Nous pouvons alors imaginer que le profil d'expression des gènes est un peu différent pour cette souche étant donné sa faible activité BvgS de départ, et que cette modification du profil d'expression serait responsable du léger défaut de croissance bactérienne.

Suite à ces résultats, nous avons voulu étudier la croissance bactérienne ainsi que la quantité de BvgA phosphorylé pour les trois souches dans un milieu défini, le milieu THJS (Thalen et al., 1999). De manière générale, dans ce milieu de culture, la quantité de BvgA est faible comparée à celle précédemment observée pour la croissance en milieu SS carencé en glutamate (non montré). Toutefois, des résultats similaires à ceux obtenus pour le milieu carencé ont été observés pour les différentes souches testées. Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'augmentation de la phosphorylation de BvgA pour le mutant à régulation inversée était liée au stress induit par la carence nutritive ou à l'entrée en phase stationnaire. Des cultures ont donc été réalisées en milieu SS non carencé.

#### *b. Culture en milieu riche, le milieu SS*

A partir d'une préculture liquide de nuit, 60 mL de milieu SS ont étéensemencés à une  $DO_{600nm}$  de 0,12. La mesure de la densité optique a été réalisée en continue avec un appareillage Elocheck (Biotronix).

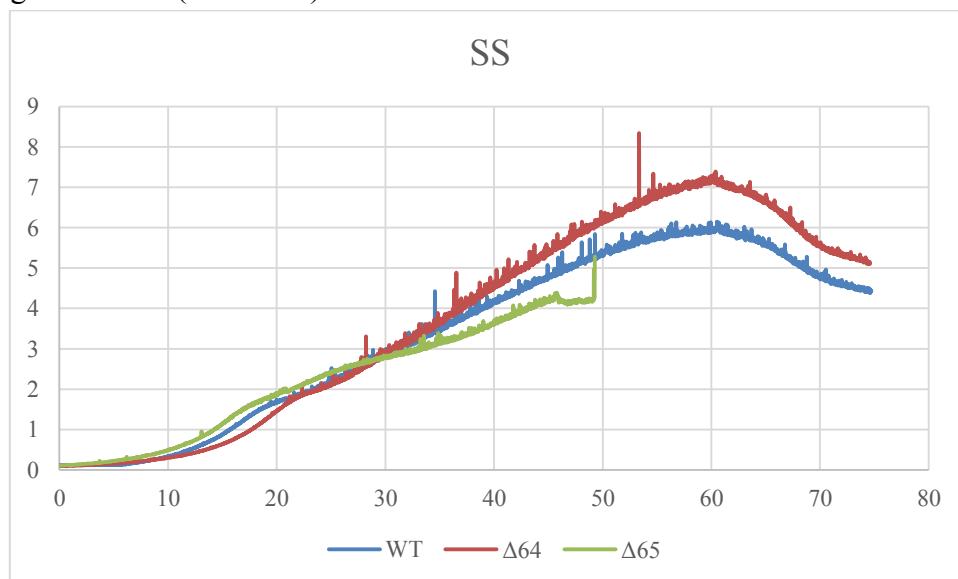


Figure 109 : Courbe de croissance des souches WT,  $\Delta$ PAS 64 et 65 en milieu SS. La densité optique à 600nm est indiquée en ordonnée et le temps exprimé en heure est indiqué en abscisse. Un problème technique lors de la culture du mutant  $\Delta$ PAS 65 explique la courbe incomplète.

Les courbes de croissance en milieu SS entre la souche sauvage et les mutants dépourvus de domaine PAS sont assez similaires (Fig. 109).

Une diminution de la quantité de BvgA phosphorylé est observable au cours du temps pour les souches sauvage et  $\Delta$ PAS 64 (Fig. 110). La souche  $\Delta$ PAS 65 voit sa quantité de BvgA phosphorylé augmentée en phase stationnaire. Les résultats obtenus sont semblables à ceux précédemment obtenus en milieux carencés.

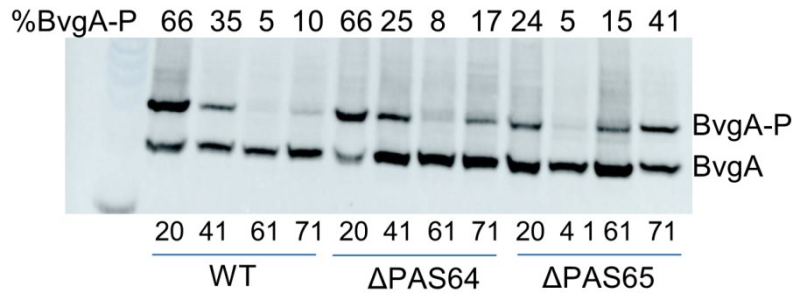


Figure 110 : Détermination de la quantité de BvgA phosphorylé par Phos-tag sur des lysats bactériens obtenus à partir de cultures en milieu SS. Les prélèvements réalisés (20H, 41H, 61H et 71H) correspondent respectivement au début, milieu et fin de phase exponentielle, et à la phase stationnaire. La quantité de BvgA phosphorylé est indiquée au-dessus de chaque ligne.

Il est difficile de déterminer si la réactivation du mutant  $\Delta$ PAS 65 est due à une carence apparue tardivement en cours de culture ou à la perception d'un stimulus particulier produit en fin de croissance. Toutefois, cette régulation de BvgS ne fait pas intervenir le domaine PAS.

Pour tester cette deuxième hypothèse, nous avons essayé d'identifier la molécule qui permettrait la réactivation du mutant  $\Delta$ PAS 65 en testant l'effet d'un milieu usagé sur la quantité de BvgA phosphorylé.

### c. Rôle d'un composant présent dans un milieu usagé sur l'activité de BvgS ?

Des cultures (15 mL) en milieu SS ont étéensemencées à une  $DO_{600nm}$  de 0,12. Après 41 heures, le milieu de culture a été remplacé par un milieu usagé (4 jours de culture) filtré et supplémenté de fraction B contenant des acides aminés essentiels et des antioxydants. Des prélèvements ont ensuite été effectués au cours du temps pour des analyses de Phos-tag.

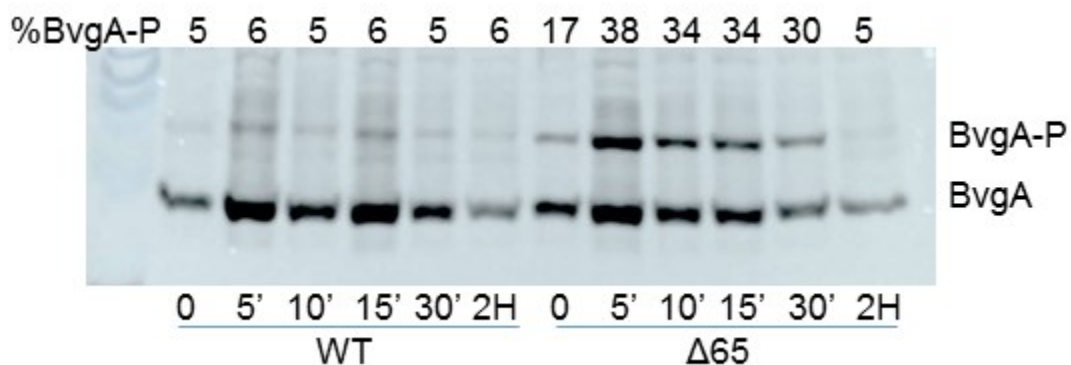


Figure 111 : Détermination de la quantité de BvgA phosphorylé par la technique de Phos-tag sur des lysats bactériens obtenus à partir de cultures en milieu SS repris dans un milieu usagé. Le temps 0 correspond au prélèvement avant le changement de milieu. Une cinétique de prélèvement allant de 5 minutes à 2 heures a été réalisée.

Pour la souche sauvage, aucune modification de la quantité de BvgA phosphorylé n'est observable après le changement de milieu (Fig. 111), mais la quantité de BvgA phosphorylé au départ (prélèvement 0, avant le changement de milieu) est anormalement faible, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Ainsi, dans ces conditions, une diminution de la quantité de BvgA phosphorylé serait difficile à observer. Pour la souche  $\Delta$ PAS 65, une augmentation de la quantité de BvgA phosphorylé se produit mais diminue 2h après le changement de milieu. Ainsi, il semblerait qu'une molécule présente dans un milieu usagé soit responsable de la réactivation du mutant  $\Delta$ PAS 65, puisque le changement de milieu permet en 5 minutes le passage de 17 à 38% de BvgA-P.

Le métabolisme de la cystéine permet l'accumulation de sulfate dans le milieu de culture en fin de croissance de *B. pertussis* en milieu SS. Ainsi, dans des cultures réalisées en fermenteur, une grande quantité de sulfate intracellulaire est observable dans les stades précoces de croissance. Cette quantité de sulfate intracellulaire va diminuer, puisque ce dernier va être relargué et ainsi permettre une accumulation de sulfate dans le milieu extérieur au cours des stades plus tardifs de la croissance (Bogdan et al., 2001). Le sulfate est un modulateur de la virulence, ce qui pourrait expliquer nos résultats. Nous avons testé si les effets observés résultaient de la perception par BvgS du sulfate accumulé dans le milieu de culture.

#### d. Rôle du sulfate dans la modification de la quantité de BvgA phosphorylé ?

Des cultures de 20 mL en milieu SS ont étéensemencées à une  $DO_{600nm}$  de 0,12. Après 72 h de culture correspondant à la phase stationnaire, du  $BaCl_2$  (20 mM) a été ajouté au milieu de culture pour précipiter le sulfate. Des prélèvements de 2 mL ont été réalisés au cours du temps pour déterminer la quantité de BvgA phosphorylé par la technique de Phos-tag.

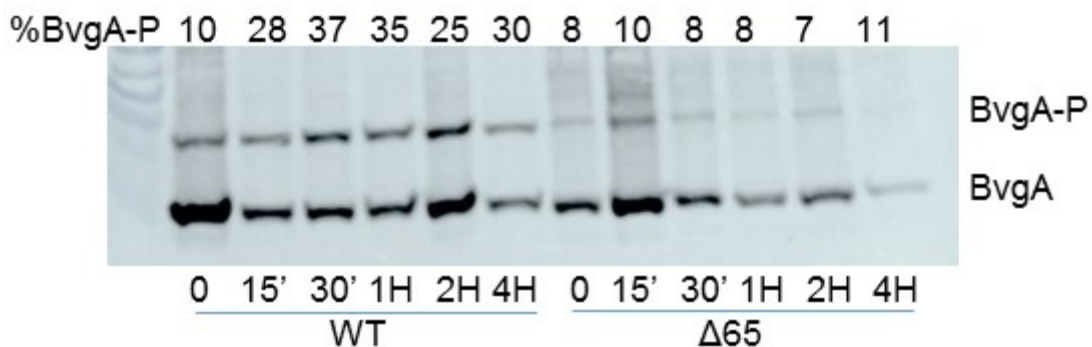


Figure 112 : Détermination de la quantité de BvgA phosphorylé par la technique de Phos-tag sur des lysats bactériens obtenus à partir de culture en milieu SS après ajout de  $BaCl_2$  (20 mM), utilisé comme précipitant du sulfate. Le temps 0 correspond au prélèvement effectué avant l'ajout du chélateur.

L'ajout de chlorure de baryum à des cultures en phase stationnaire augmente la proportion de BvgA phosphorylé dès 15 minutes pour la souche sauvage et prévient son accroissement pour la souche  $\Delta$ PAS 65 (Fig. 112). Ainsi, il se pourrait que le sulfate de magnésium soit responsable de la modification de la quantité de BvgA phosphorylé.

En résumé, la proportion de BvgA phosphorylé dépend de la phase de croissance et tend à diminuer au fil de la culture pour la souche sauvage, en accord avec les données rapportées dans la littérature (Nakamura et al., 2006). Notre hypothèse était que le domaine PAS soit

impliqué dans la perception d'une molécule stabilisatrice dont la concentration diminuerait lors d'une carence nutritive, ce qui inactiverait BvgS. Nos résultats avec le mutant  $\Delta$ PAS 64 laissent à penser que le domaine PAS ne serait pas impliqué dans cette régulation. Nous proposons que la molécule soit perçue par les domaines VFT, les coiled coils précédant la kinase ou la kinase elle-même. Ainsi, la molécule qui inactive BvgS pour la souche sauvage (probablement le sulfate) permet l'autophosphorylation de la chimère à régulation inversée. Nous pouvons aussi remarquer par les expériences de Phos-tag que la quantité initiale de BvgA phosphorylé, prise aux mêmes moments de la culture bactérienne, varie d'une expérience à une autre. Ceci est vraisemblablement dû au fait que les cultures de *B. pertussis* sont difficiles à standardiser. En conséquence, un même temps de culture ne correspond pas nécessairement au même état métabolique des bactéries entre différentes cultures.

Pour vérifier que c'est bien le sulfate qui est responsable des effets observés, le milieu en cours de culture pourrait être analysé par RMN comme dans (Thalen et al., 1999) ou par spectrométrie de masse, pour déterminer les composants présents avec ou sans traitement au  $\text{BaCl}_2$ . S'il s'agit d'un autre composé, ces analyses pourraient aider à sa détermination.

Ainsi, le mutant  $\Delta$ PAS 65 présente une faible activité kinase à l'état basal. La perception de modulateur chimique ou la fermeture du VFT1 permet son activation. A l'inverse, la perception de la diminution de température, qui inactive BvgS sauvage, ne semble pas induire la réactivation du mutant. Celle-ci tendrait à rigidifier le système, alors que l'activité kinase nécessite une certaine dynamique. Il semble également que ce mutant soit réactivable en fin de phase de croissance, vraisemblablement par la perception de sulfate

#### **D. Etude du fonctionnement du mutant à régulation inversée**

Dans le but de comprendre les règles qui gouvernent la régulation inversée, nous avons tenté d'obtenir d'autres mutants dont la perception de modulateur permettrait l'augmentation de l'activité kinase.

##### **1. Perturbation de la périodicité de 7 résidus**

La périodicité en heptades du coiled coil précédant la kinase jouerait un rôle important dans la régulation des chimères de BvgS. Nous avons alors voulu déterminer si l'ajout d'un résidu à la chimère  $\Delta$ PAS R4 (Fig. 113A), qui est régulée comme BvgS sauvage, permettrait l'obtention d'un mutant à régulation inversée.

De la mutagenèse dirigée a été réalisée sur le plasmide pUC19TMHK  $\Delta$ PAS R4 pour ajouter un codon glutamine en sortie de membrane (Fig. 113A). Un échange de la cassette SacI-XbaI a permis l'introduction de la mutation dans le vecteur pUC19mpla. Le reste de la procédure expérimentale est le même que plus haut.

Le mutant  $\Delta$ PAS R4+Q présente une activité kinase comparable à celle du mutant  $\Delta$ PAS R4, mais contrairement à ce dernier, il est insensible à la modulation (Fig. 113B). L'ajout d'un résidu modifierait le registre du coiled coil, avec un déplacement de  $100^\circ$  des résidus. Notons que pour les deux mutants  $\Delta$ PAS R4 et  $\Delta$ PAS R4+Q à l'état basal, l'histidine doit être alignée avec le domaine catalytique pour permettre son autophosphorylation, et le coiled coil précédant la kinase doit être dynamique. Le coiled coil du mutant  $\Delta$ PAS R4+Q pourrait être



incapable d'adopter une conformation stable, correspondant à l'état phosphatase, suite à la perception de modulateur.

A

TM de BvgS
Jonction
HK de BvgS  
 $\Delta R4$  IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL-RRQIVRKAALRRQLNEQLTQLREMLTERESLLAELSEAKDRAEDSNRAKSTFLATMSHEIR  
 $\Delta R4+Q$  IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLQRRQIVRKAALRRQLNEQLTQLREMLTERESLLAELSEAKDRAEDSNRAKSTFLATMSHEIR  
d a d a d a d a d a d a d a

B

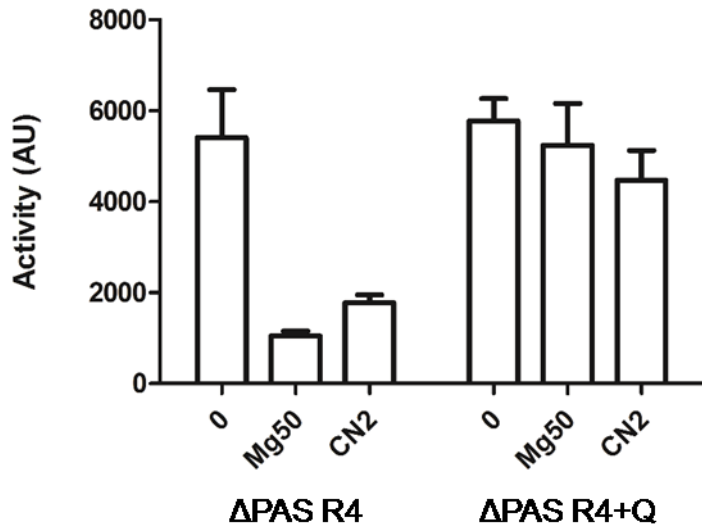


Figure 113 : Caractérisation du mutant  $\Delta PAS R4+Q$ . A. Alignement de séquences des mutants  $\Delta PAS R4$  et  $\Delta PAS R4+Q$ . Le segment transmembranaire (TM BvgS) est coloré en rose, le coiled coil d'*E. cloacae* est coloré en noir et le début du domaine DHp de BvgS en rouge avec l'histidine phosphorylable soulignée. La prédiction de coiled coil est indiquée en dessous de l'alignement. B. Activités  $\beta$ -galactosidases reflétant l'activité du promoteur *ptx* exprimées en unités arbitraires. Ces activités sont déterminées en conditions basales (0) et après la perception de modulateurs à des concentrations millimolaires ( $MgSO_4$  à 50 mM et chloronicotinate à 2 mM). Les valeurs présentées proviennent de 3 expériences indépendantes, la moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

Modifier la taille du linker séparant les domaines transmembranaire et kinase ne semble donc pas suffisant pour inverser la régulation. Une régulation inversée pourrait aussi impliquer certaines particularités dans la composition de ce linker, qu'il faudra identifier pour comprendre le fonctionnement de ces mutants particuliers.

## 2. Caractérisation approfondie du mutant $\Delta PAS 65$

La séquence du mutant  $\Delta PAS 65$  est présentée dans la figure ci-dessous (fig. 114) pour illustrer la forte proportion de résidus chargés.

TM de BvgS
Jonction
HK de BvgS  
 $\Delta PAS 65$  IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLQRGRIRRKRRDLEQRQLLLDELLRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIR  
+ + +++++- - +
-- ++ +- -+ ++  
a d a d a d a d a d a

Figure 114 : Séquence du mutant  $\Delta PAS 65$  présentant une régulation inversée. Les résidus chargés positivement et négativement sont annotés par les signes '+' et '-', respectivement. La prédiction de coiled coil est indiquée par les lettres 'a' et 'd'.

### a. Modification du registre du coiled coil

Le mutant  $\Delta PAS 65$  présente une régulation inversée, alors que le mutant  $\Delta PAS 64$  comportant un résidu de moins dans le coiled coil précédant la kinase, est actif et hypersensible à la modulation. Ainsi, on peut se demander quels seraient les effets d'autres modifications du registre du coiled coil par insertion ou délétion de résidus, sur l'activité de BvgS.

### 1) Matériel et méthodes

Deux mutants ont été construits grâce à l'utilisation de gènes synthétiques,  $\Delta$ PAS 63 où deux résidus ont été soustraits à la souche parentale ( $\Delta$ PAS 65), et  $\Delta$ PAS 66 qui présente un résidu supplémentaire (Fig. 115).

	TM de BvgS	Jonction	HK de BvgS
$\Delta$ PAS 65	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL	QR-GRI	RRKRRDLEQRQLLDELRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIR
$\Delta$ PAS 63 ( $\Delta$ 65-GR)	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL	QR---	IRKRRDLEQRQLLDELRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIR
$\Delta$ PAS 66 ( $\Delta$ 65+R)	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL	QRRGR	IRKRRDLEQRQLLDELRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIR

Figure 115 : Alignement de séquence des différents mutants construits. En rose est représenté le segment transmembranaire de BvgS, en rouge la kinase de BvgS (l'histidine phosphorylable est soulignée), et en noir le coiled coil de l'homologue *Pseudomonas sp. M1* modifié ou non.

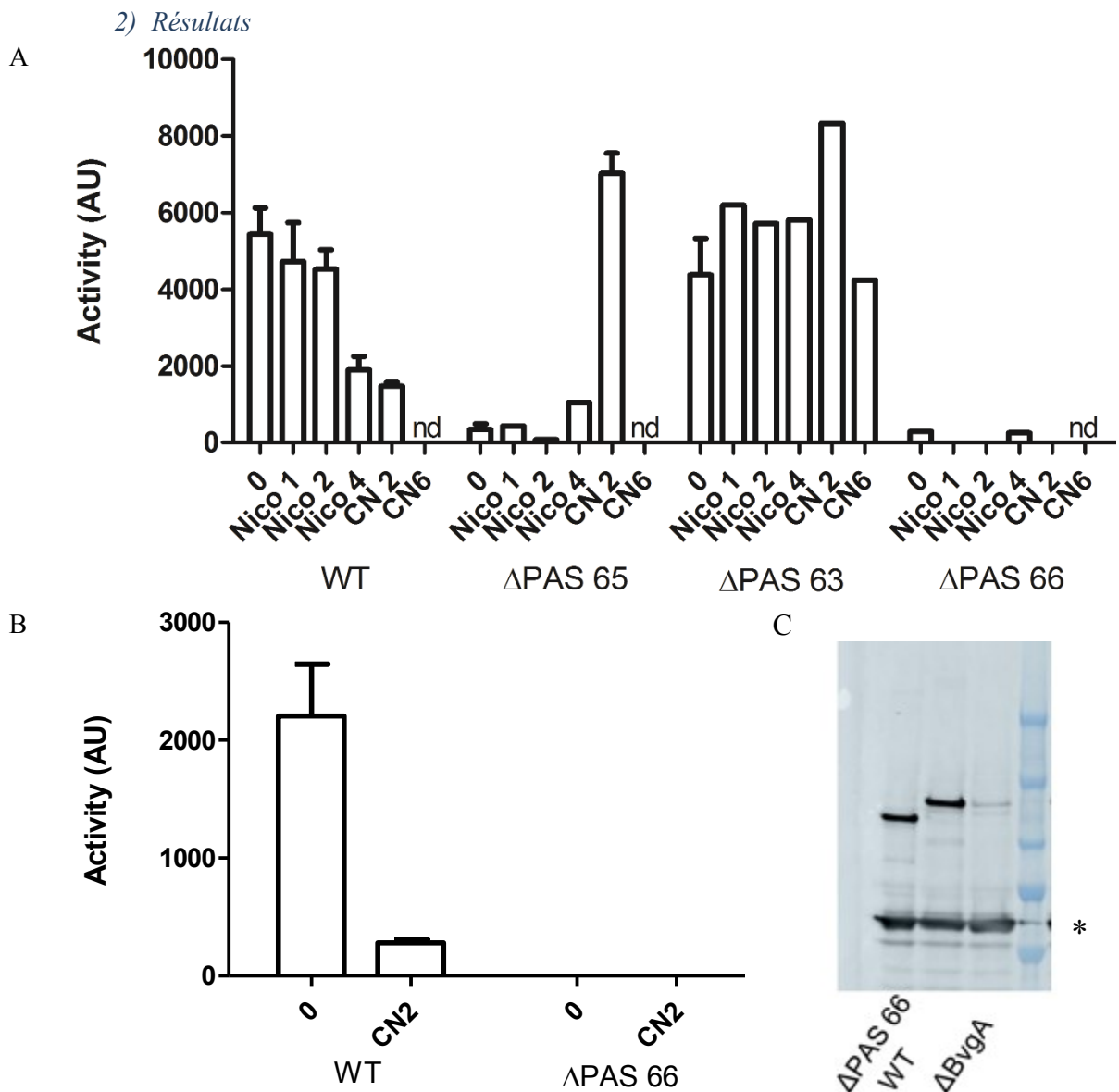


Figure 116 : Activités  $\beta$ -galactosidase des mutants  $\Delta$ PAS 63 et  $\Delta$ PAS 66 représentant l'activité du promoteur *ptx* (A) ou de *fhaB* (B). Les activités ont été déterminées en conditions basales (0) et après la perception de nicotinate (Nico) et de chloronicotinate (CN) à des concentrations millimolaires. Les résultats présentés proviennent d'une ou de plusieurs expériences représentatives. La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. Nd correspond aux valeurs non déterminées. C. Détermination de la quantité de BvgS produit pour le mutant  $\Delta$ PAS 66 comparé à la souche sauvage (WT) et à la souche  $\Delta$ bvgA prit en contrôle négatif pour montrer la quantité de BvgS produit pour un mutant inactif. Le témoin de charge est représenté par un astérisque.

Le mutant  $\Delta$ PAS 63 présente une activité kinase à l'état basal et est insensible aux modulateurs, même à de fortes concentrations (Fig. 116A). Le mutant  $\Delta$ PAS 66 ne présente pas d'activité BvgS et l'ajout de modulateur ne restaure pas son activité kinase (Fig. 116A et B). La mutation n'induit pas de problème de stabilité ou de repliement de la protéine, puisque cette chimère est produite en quantité comparable à la protéine sauvage (Fig. 116C). Ainsi, en modifiant la taille du mutant à régulation inversée, des phénotypes variés ont été obtenus (Fig. 117) :

Mutants	Phénotypes
$\Delta$ PAS 63	actif et insensible à la modulation
$\Delta$ PAS 64	actif et hyper-sensible
$\Delta$ PAS 65	régulation inversée
$\Delta$ PAS 66	inactif

Figure 117 : Récapitulatif des phénotypes des chimères obtenues par modification du registre de coiled coil

L'ajout ou la suppression de résidus au niveau du coiled coil modifie le registre des deux hélices et donc l'interface du coiled coil, ce qui pourrait affecter la stabilité de l'enroulement d'hélices.

Nous pouvons alors imaginer que l'activité kinase est possible lorsque l'alignement de l'histidine phosphorylable avec le domaine catalytique est dans un angle adéquat, mais nous ne connaissons pas la tolérance du système à un changement éventuel de cet angle. Si l'ajout ou la suppression d'un résidu dans le coiled coil précédant le DHp est capable de déplacer l'histidine vers une position trop éloignée du site catalytique, ceci mènera à l'obtention d'un mutant inactif. Cependant, le repliement du domaine DHp et la position de l'histidine phosphorylable changent peu entre les états kinase et phosphatase pour les kinases dont la structure cristallographique est connue (Dupré E., communication personnelle, Mechaly et al., 2014). D'autre part pour BvgS, c'est surtout la dynamique du coiled coil qui régule l'activité du module enzymatique. On peut donc plutôt imaginer que le coiled coil puisse adopter deux registres proches, avec des stabilités différentes.

Les prédictions de coiled coil dans les linkers indiquent souvent deux registres : l'un correspondant au motif LLAAA (1ère alanine en position 'd') et l'autre où cette alanine adopterait une position 'g' ( $\Delta$ PAS 64 pris comme exemple en Fig. 118). Il est probable que les coiled coils oscillent entre deux registres, et que ce soit le mécanisme de leur régulation. En effet, de manière générale, en observant les séquences d'homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS, la prédiction de coiled coil où la première alanine du motif LLAAA est en 'd', est caractérisée par une déstabilisation du coiled coil du côté N-terminal (avec une mauvaise prédiction de coiled coil) tandis qu'au niveau C-terminal, le coiled coil serait plus stable. Cette conformation pourrait caractériser l'état phosphatase du senseur-kinase. Pour la prédiction 'g' du coiled coil où la 1<sup>ère</sup> alanine du motif est en cette position, c'est l'inverse. Cette organisation du coiled coil caractériserait alors l'état kinase (Fig. 118F). Notons que pour Nek2, la kinase régulant le cycle cellulaire, un mécanisme similaire a été proposé, avec une inter-conversion entre deux états du coiled coil déclenchée par des signaux extérieurs (Croasdale et al., 2011).

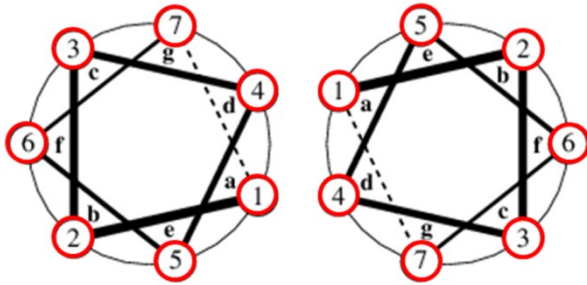
A

$\Delta$ PAS 64      TM de BvgS      Jonction      HK de BvgS  
 IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLRGRIRRKRRDLEQRQLLDELRRAKESAEKASRAKSTFLATMSHEIR

d a d a d a d a d  
 a d a d a d a d a

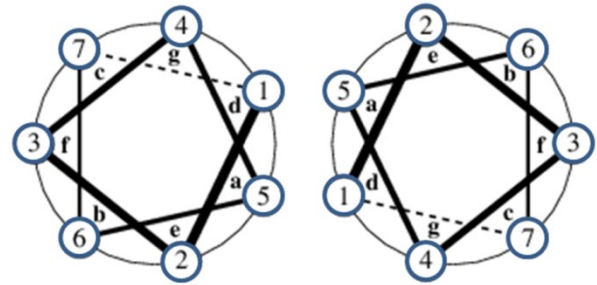
B

Prédiction 'd'

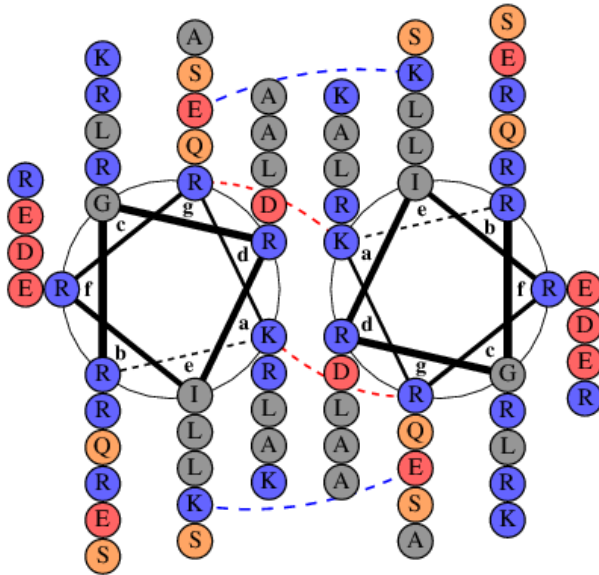


C

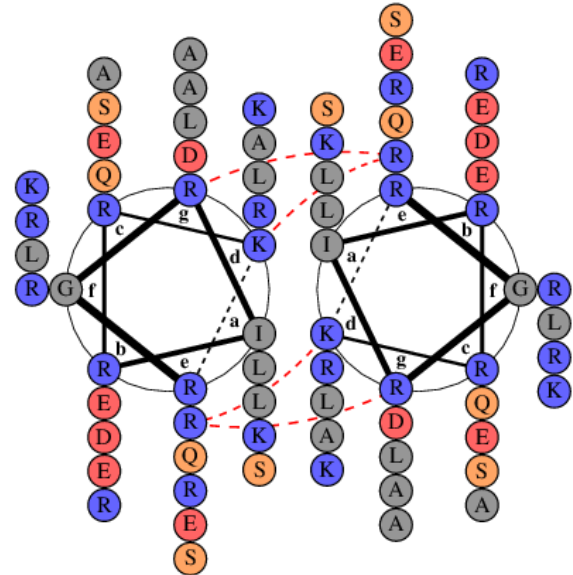
Prédiction 'g'



D



E



F

Prédiction 'd'      TM Dynamique Stable      HK  $\longrightarrow$  Phosphatase  
 Prédiction 'g'      TM Stable Dynamique      HK  $\longrightarrow$  Kinase

Figure 118 : Hypothèse d'inter-conversion entre deux états du coiled coil. A. Deux prédictions de coiled coil pour le mutant  $\Delta$ PAS 64, avec en rouge la prédiction de coiled coil où la première alanine du motif LLAAA est en position 'd', et en bleu celle où elle est en 'g'. Les résidus communs à ces deux prédictions sont colorés en vert. B à E. Projections hélicoïdales des deux coiled coils avec la prédiction de la 1<sup>ère</sup> alanine du motif en 'd' (B et D) ou en 'g' (C et E). B et C. Les acides aminés du coiled coil sont numérotés de 1 à 7. Les lettres ('a' à 'g') définissent la prédiction de coiled coil. D et E. Les résidus hydrophobes sont colorés en gris, les résidus polaires non chargés en orange, les résidus chargés négativement en rouge et en bleu les résidus positifs. Les interactions ioniques favorables sont indiquées par des lignes hachurées en bleu, et les interactions défavorables sont en rouge. F. Modèle de régulation des chimères sans domaine PAS par un changement de registre du coiled coil. La prédiction 'd' est caractérisée par un coiled coil dynamique du côté N-terminal et stable du côté C-terminal, ce qui favoriserait un état phosphatase. La prédiction 'g' du coiled coil est caractérisée par un coiled coil stable en partie N-terminale et dynamique au niveau C-terminal ce qui favoriserait l'état kinase.

Pour expliquer la perte d'activité kinase du mutant  $\Delta$ PAS 66, on peut proposer que l'insertion d'un résidu, s'apparentant à un skip, ait généré une 'irrégularité' à un endroit donné dans l'hélice (voir partie V.A.3.c.). Ceci favoriserait le registre stable dans la partie C-terminale du coiled coil avant le domaine DHp, favorable à l'état phosphatase de BvgS. Pour le mutant  $\Delta$ PAS 63 insensible à la modulation, il est possible que l'interface la moins stable du coiled coil soit préférée même en présence de modulateur, pour des raisons de contraintes mécaniques. Par conséquent le coiled coil obtenu reste dynamique, expliquant l'incapacité de BvgS à passer en mode phosphatase. La délétion introduite pourrait avoir entraîné une perturbation des hélices qui s'apparenterait à un stutter, prédit pour déstabiliser les segments de petite taille (voir partie V.A.3.a.). La déstabilisation du coiled coil favoriserait alors sa dynamique et entraverait le passage vers l'état phosphatase. Une autre explication, moins probable, du phénotype du mutant  $\Delta$ PAS 63, est que sa taille ne soit pas suffisante pour permettre la rigidification du coiled coil puisque la taille des chimères dépourvues de domaine PAS influence leur réponse à la modulation (Lesne et al., 2016).

Globalement, ces résultats montrent que la composition et la taille du coiled coil précédant la kinase sont toute deux cruciales pour la régulation de l'activité. Les stabilités respectives des coiled coils prédits et la présence d'irrégularités dans les hélices sont vraisemblablement à prendre en compte pour ces mutants.

### *b. Modification des charges*

Le linker entre le segment membranaire et la kinase du mutant  $\Delta$ PAS 65 contient 13 résidus chargés positivement et 6 négativement, dont 5 résidus positifs constitutifs. Ces cinq résidus chargés ont été substitués en alanine pour tester leur rôle dans la régulation.

#### *1) Matériel et méthodes*

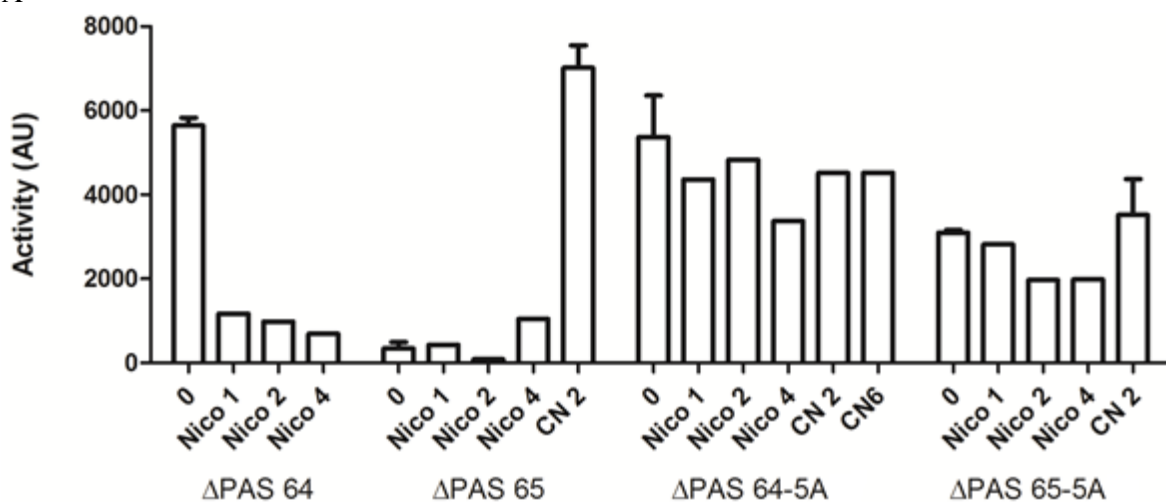
Deux gènes synthétiques portant les séquences du  $\Delta$ PAS 65 ou du  $\Delta$ PAS 64 présentant des substitutions en alanine pour les résidus 'RRKRR' ont été utilisés (Fig. 119). La démarche expérimentale est la même que ci-dessus.

	TM de BvgS	Jonction	HK de BvgS
$\Delta$ PAS 65	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYI	QRGRI <b>RRKRR</b> DLEQRQLLLDELRRAKESA EKASRAKSTFLATMS <u>HEIR</u>	
$\Delta$ PAS 64-5A	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYL	-RGRI <b>AAAAA</b> DLEQRQLLLDELRRAKESA EKASRAKSTFLATMS <u>HEIR</u>	
$\Delta$ PAS 65-5A	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYI	QRGRI <b>AAAAA</b> DLEQRQLLLDELRRAKESA EKASRAKSTFLATMS <u>HEIR</u>	
		a d a d a d a d a d	

**Figure 119 : Alignement de séquence des différents mutants de remplacement des charges. En rose est représenté le segment transmembranaire de BvgS, en rouge la kinase de BvgS avec l'histidine phosphorylable soulignée, et en noir le coiled coil de l'homologue *Pseudomonas sp. MI* modifié ou non. Les acides aminés substitués en alanine sont colorés en vert. Le prédiction de coiled coil est indiquée avec les lettres 'a' et 'd' en-dessous de l'alignement.**

## 2) Résultats

A



B

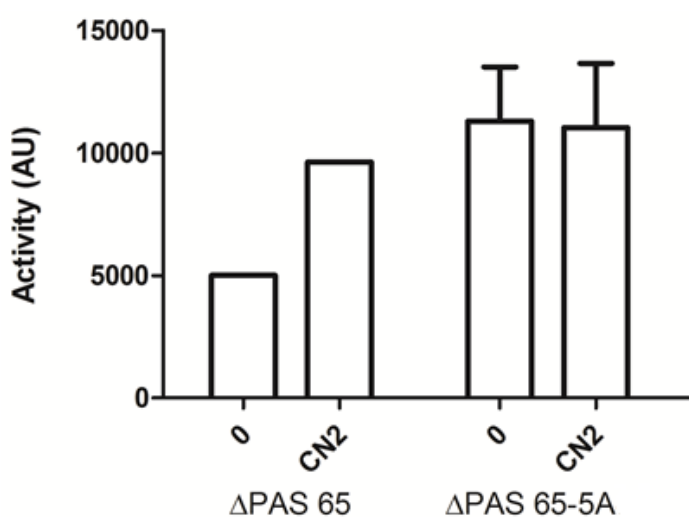


Figure 120 : Activités  $\beta$ -galactosidase des mutants de substitution des 5 charges contiguës représentant l'activité du promoteur *ptx* (A) ou de *fhaB* (B). Les activités ont été déterminées en conditions basales (0) ou après la perception de nicotinate (Nico) et de chloronicotinate (CN) à des concentrations millimolaires. Les résultats présentés proviennent d'une ou de plusieurs expériences représentatives. La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

Le remplacement des 5 résidus chargés génère un coiled coil présentant 8 charges positives et 6 négatives. A la différence de son parent hypersensible, le mutant  $\Delta$ PAS 64-5A est insensible à la modulation (Fig. 120A). Il a été décrit que des résidus chargés consécutifs peuvent générer des irrégularités dans les hélices, s'apparentant à des coudes ('kink') (Cohen and Parry, 1986). La séquence RRKRR pourrait donc, grâce à un coude de ce type, permettre l'adoption de l'interface stable dans le bas du coiled coil en réponse au modulateur. En revanche les 5 alanines favorisent des hélices  $\alpha$  régulières ce qui pourrait maintenir la forte dynamique du coiled coil imposée par l'interface 'alternative' du haut du coil, avec ou sans modulateur.

Pour le mutant  $\Delta$ PAS 65-5A, le remplacement des 5 résidus chargés contigus par des alanines donne à l'état basal une activité kinase intermédiaire et une insensibilité aux modulateurs (Fig. 120A et B). Cette activité intermédiaire à l'état basal pourrait s'expliquer par un positionnement suboptimal de l'histidine phosphorylable par rapport au site catalytique. Alternativement, une activité intermédiaire peut signifier une transition plus facile entre les états kinase et phosphatase avec un équilibre déplacé vers l'état kinase par rapport au parent. Son insensibilité au modulateur serait due à l'impossibilité d'adopter de façon durable



l'interface stable dans le bas du coiled coil. Il se pourrait également que ce soit au niveau de ces cinq résidus chargés qu'un changement de mouvement/conformation ait lieu pour permettre le passage en mode phosphatase, expliquant ainsi le phénotype des deux mutants construits.

Pour le mutant 'parent'  $\Delta$ PAS 65, le coude putatif dans les hélices dû à ces 5 résidus chargés pourrait mettre le coiled coil dans son registre stable à l'état basal, d'où la très faible activité kinase. La perception de modulateur permettrait, grâce aux 5 résidus chargés, de sortir le coiled coil de cette interface et de lui faire adopter son autre registre, dans lequel il est plus dynamique, pour permettre l'activité kinase.

Les 5 résidus contigus chargés semblent donc jouer un rôle important dans la régulation des chimères de BvgS. Il faut noter que dans BvgS sauvage, le remplacement du quatrième résidu chargé sous la membrane, R<sub>570</sub> (soulignée dans le motif 'RRQIRQRKRAE'), en position 'a' dans le coiled coil prédit, donne un mutant actif et insensible à la modulation (voir partie VIII.B.3.a.). Pour les chimères décrites ci-dessus, la lysine au milieu de la séquence RRKRR est en position 'a' ou 'd' selon le registre du coiled coil et correspondrait à cette R<sub>570</sub>. Ainsi, le mécanisme de régulation de BvgS et des chimères dépourvues de domaine PAS pourrait dépendre de la présence de résidus chargés en positions 'a' et 'd' dans la partie N-terminale du coiled coil, qui pourrait induire une irrégularité dans les hélices. Des alignements de séquence d'homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS ont permis de mettre en évidence la conservation d'un résidu chargé proche du segment transmembranaire, en position centrale ('a' ou 'd') du coiled coil avec fréquemment d'autres résidus chargés contigus. Il serait alors intéressant de déterminer quel(s) résidu(s) du motif de 5 charges serai(en)t requis pour la régulation de l'activité des chimères  $\Delta$ PAS 64 et 65. Les résidus adjacents à l'Arg570 chez BvgS sauvage pourront être ciblés pour déterminer si des règles de régulation communes peuvent être proposées.

### *c. $\Delta$ PAS 65, un linker entre membrane et kinase particulier ?*

De nouvelles chimères de BvgS ont été construites en utilisant les coiled coils de même longueur que ceux des mutants  $\Delta$ PAS 64 et 65 et provenant d'autres homologues. Ainsi, un coiled coil dépourvu de charge négative a donné la chimère  $\Delta$ PAS 64-Ec (Fig. 121A).

Le mutant  $\Delta$ PAS 64-Ec présente une activité kinase à l'état basal et est insensible à la modulation (Fig. 121B). L'absence de charges négatives pourrait générer une tension/instabilité du coiled coil, puisque les charges positives ne seraient pas contrebalancées. Notons également que le motif LLAAA qui représenterait l'interface de repos du coiled coil est dégénéré (IQSAA) chez ce mutant, ce qui défavoriserait le passage en état phosphatase. Enfin chez le mutant  $\Delta$ PAS 64-Ec, le résidu lysine du motif RRKRR est remplacé par une histidine (non complètement chargée à pH neutre), ceci pourrait être une raison supplémentaire à l'insensibilité, si ce résidu chargé conservé s'avère nécessaire pour le passage vers l'état phosphatase. Il est donc difficile de déterminer lequel(s) de ces éléments s'oppose(nt) au passage vers l'état phosphatase putatif.

A

	TM de BvgS		Jonction		HK de BvgS
$\Delta$ PAS 64	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLL	RGRIRRKRRDLEQRQLL	LDEL	LRRAKESA	EKASRAKSTFLATMSHEIR
$\Delta$ PAS 64 <i>Ec</i>	IYLLIGLGLLSALLFLSWIVYLL	AWGYRRHRRRAQQRMLK	LISA	QRQSRNRA	HHRASRAKSTFLATMSHEIR
		d a d a d a d a d			

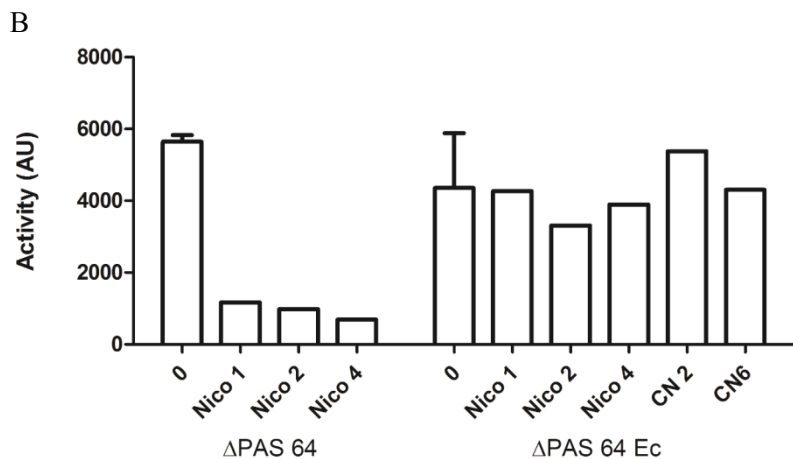


Figure 121 : A. Séquence de la chimère  $\Delta$ PAS 64-*Ec*. Le coiled coil entre le segment transmembranaire (en rose) et le DHp de BvgS (en rouge) provient de l'homologue de BvgS chez *Enterobacter cancerogenus* (GI 969849888). Le motif LLAAA est surligné en bleu. La prédiction de coiled coil est indiquée par les lettres 'a' et 'd' en-dessous de l'alignement. B. Activités  $\beta$ -galactosidase des chimères de BvgS représentant l'activité du promoteur *ptx*. Les activités ont été déterminées en conditions basales (0) et après la perception de nicotinate (Nico) et de chloronicotinate (CN) à des concentrations millimolaires. Les résultats présentés proviennent d'une ou de plusieurs expériences représentatives. La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés.

De nouvelles chimères ont été construites pour obtenir d'autres mutants présentant une régulation inversée (Fig. 122A).

Les deux mutants obtenus ne présentent pas d'activité kinase à l'état basal lorsque le gène rapporteur est fusionné derrière le promoteur d'un gène tardif de la virulence (*ptx*, Fig. 122B). L'ajout de modulateur ne restaure pas l'activité de ces deux mutants. Un second gène rapporteur fusionné derrière le promoteur de la FHA, gène précoce, a alors été utilisé (Fig. 122C). Le mutant  $\Delta$ PAS 65-*Se* présente peu d'activité kinase à l'état basal, tout comme la souche  $\Delta$ PAS 65, et la perception de modulateur permet également son activation. Une activité  $\beta$ -galactosidase nulle avec la fusion *ptx-lacZ* et très forte avec la fusion *fhaB-lacZ* serait caractéristique de l'état Bvg<sup>i</sup> (Cotter and Miller, 1997) et indique une activité kinase suboptimale et une balance altérée entre les états kinase et phosphatase.

La proportion de charges dans le linker de ce mutant  $\Delta$ PAS 65-*Se* est moindre que celle du mutant  $\Delta$ PAS 65 (8 positives et 5 négatives comparé à 13 positives et 6 négatives). Une relativement faible similarité de séquence est observable entre les mutants  $\Delta$ PAS 65 et  $\Delta$ PAS 65-*Se*. Comme le  $\Delta$ PAS 65, le coiled coil du  $\Delta$ PAS 65-*Se* serait dans son interface de repos à l'état basal, dont le modulateur pourrait le faire sortir. Cependant l'activité kinase reste modérée, possiblement à cause d'un positionnement suboptimal de l'histidine par rapport au site catalytique ou probablement à cause d'un équilibre rapide entre les deux registres, rendu possible par l'ajout de modulateur. Il serait intéressant d'ôter un résidu à ce coiled coil et de déterminer les effets de cette délétion sur l'activité à l'état basal.



des irrégularités dans les hélices. L'inspection de sa séquence montre aussi qu'aucun des deux registres possibles du coil ne donnerait d'interface très stable.

Ainsi, nous avons obtenu un autre cas de régulation inversée, qui nous aidera à déduire des règles de régulation même si de grosses zones d'ombre persistent. La composition du coiled coil entre la membrane et la kinase est critique puisque les deux chimères à régulation inversée ( $\Delta$ PAS 65 et  $\Delta$ PAS 65-Se) ont des phénotypes différents.

Une étude de la topologie/dynamique du linker d'un mutant à régulation inversée par analyse de cysteine scanning nous permettra d'obtenir des informations indispensables pour comprendre ces mutants. L'interface des hélices sera alors déterminée à l'état basal et suite à la perception de modulateur. Ces analyses seront réalisées sur le mutant  $\Delta$ PAS 65, mais aussi en parallèle sur le mutant  $\Delta$ PAS 64 pour quelques positions définies.

En résumé, une grande diversité de taille est retrouvée pour le coiled coil des homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS, avec une certaine conservation de séquence. Deux prédictions de coiled coil sont possibles pour la majorité des homologues de BvgS. L'inter-conversion entre ces deux états pourrait être clé dans la régulation de ces senseurs-kinases. Il est vraisemblable que dans ces chimères des irrégularités/cassures des hélices soient nécessaires pour permettre le passage d'un état à l'autre.

## E. Recherche de ligands pour le VFT1

BvgS présente une activité kinase sans fixation de ligand aux domaines périplasmiques. Des modulateurs chimiques comme le nicotinate déclenchent le passage en mode phosphatase en se fixant aux domaines VFT2. Avec des affinités millimolaires, il est fort probable que ces molécules ne soient pas des ligands naturels. La fermeture du domaine VFT1 par l'introduction d'un pont disulfure diminue drastiquement l'activité kinase (Dupré et al., 2015a). Ainsi, le VFT1 pourrait être le site de fixation d'un ligand naturel perçu par la bactérie dans une niche particulière, non encore définie, de son hôte. Ceci permettrait le passage vers un mode d'avirulence dans le but d'économiser les ressources, de s'adapter et de survivre à un nouvel environnement. Jusqu'à ce jour, aucun ligand se fixant au niveau du VFT1 n'a été décrit. La fermeture du domaine VFT1 pour le mutant  $\Delta$ PAS 65 à régulation inversée permet l'activation de la kinase. Cette souche pourrait donc servir d'outil pour la recherche de ligands du VFT1 grâce à un système rapporteur fluorescent. Nous avons choisi de cribler des molécules naturelles potentiellement présentes chez l'hôte ou produites à son contact.

### 1. Matériel et Méthodes

Le gène codant la mRFP ('red fluorescent protein') a été cloné sous le contrôle du promoteur *ptx* et des signaux de traduction de la sous-unité PTX-S1 dans un plasmide répliquatif chez *B. pertussis*, le pBBR1MCS5. Une PCR a permis d'amplifier la région promotrice/opératrice de la toxine pertussique ainsi que la séquence des quatre premiers acides aminés de la sous-unité S1 de PTX, dans le but de créer une fusion traductionnelle. Le plasmide ainsi construit a été introduit par conjugaison dans la souche portant le gène BvgS $_{\Delta$ PAS 65 dans son chromosome. Cette dernière a été obtenue en introduisant la cassette XbaI-BglIII du gène synthétique (voir partie IX.A) dans le plasmide intermédiaire pUC19mint (Dupré et al., 2015a), dont le

fragment EcoRI-HindIII a ensuite été transféré dans le vecteur de conjugaison, pSORT, pour l'échange allélique dans le chromosome de *B. pertussis*. La fusion traductionnelle va permettre de détecter l'apparition de fluorescence dans le cytoplasme de la bactérie lorsque BvgS sera activé par la fixation d'un ligand.

La technique a été mise au point en utilisant les modulateurs chimiques de référence, et le protocole utilisé est présenté ci-après. Après une pré-culture en fiole, la culture bactérienne est réalisée dans des plaques Greiner à fond noir de 96 puits. Le volume final par puits est de 100 µl. Les bactéries sont ensemencées à une DO<sub>600nm</sub> de 0,6 et 0,8 (90 µl). Nous avons utilisé comme banque de molécules, des plaques fournies par la société Biolog (Fig. 123). Les molécules sont resuspendues dans 50 µl d'eau ppi stérile pour obtenir une concentration des composés comprise entre 10 et 20 mM. 10 µl des différents composés sont ajoutés aux bactéries pour donner une concentration finale entre 1 et 2 mM, puis les plaques de culture sont incubées 24 h à 37°C sous agitation. Une lecture de la densité optique dans chaque puits est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (DO<sub>600nm</sub>) puis la fluorescence est déterminée avec un fluorimètre (Microwin Mithra, longueurs d'onde d'excitation 560 nm et d'émission 620 nm).

Ci-dessous est représenté un bref descriptif de la composition des différentes plaques Biolog testées (Fig. 123).

Nom	Descriptif fourni par Biolog
PM1	Sources de carbone
PM2A	Sources de carbone
PM3B	Sources d'azote
PM4A	Sources de phosphore et de soufre
PM5	Suppléments nutritifs
PM6	Sources d'azote sous forme peptidique
PM7	Sources d'azote sous forme peptidique
PM8	Sources d'azote sous forme peptidique
PM9	Osmolytes
PM17A	Molécules variées
PM19	Molécules pharmaceutiques
PM20B	Molécules pharmaceutiques
PM25D	Tests de sensibilité à des produits chimiques
PM-M5	Ions
PM-M6	Hormones et effecteurs métaboliques
PM-M7	Hormones et effecteurs métaboliques
PM-M8	Hormones et effecteurs métaboliques
PM-M11	Agents anti-cancer
PM-M12	Agents anti-cancer
PM-M13	Agents anti-cancer
PM-M14	Agents anti-cancer

Figure 123 : Descriptif des plaques utilisées pour la recherche de ligand pour le domaine VFT1

## 2. Résultats

Un certain nombre de molécules induisant une fluorescence ont été identifiées. Après soustraction du bruit de fond, quatre catégories de molécules ont pu être déterminées :

- les molécules induisant la plus forte fluorescence, de 2 à 8 fois la valeur du bruit de fond (Fig. 124 et 125)
- les molécules induisant une fluorescence moyenne, de 2 fois le bruit de fond
- les molécules induisant une faible fluorescence, de 1 fois le bruit de fond
- les molécules n'induisant pas de fluorescence

Il faut noter que la fluorescence pour une même molécule, est dépendante de la croissance bactérienne (Fig. 125).

Nous avons tout d'abord porté notre réflexion sur les molécules induisant la plus forte fluorescence et qui pourraient être retrouvées dans l'environnement humain au cours du cycle infectieux de *B. pertussis*. J'ai vérifié que ces dernières ne présentent pas d'auto-fluorescence spontanée lorsqu'elles sont ajoutées à des cultures de bactéries dépourvues du plasmide de fluorescence. Les figures ci-dessous présentent les différentes molécules induisant la plus forte fluorescence, avec les concentrations utilisées (Fig. 124 et 125).

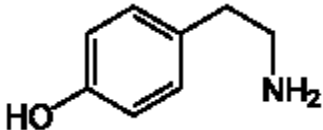
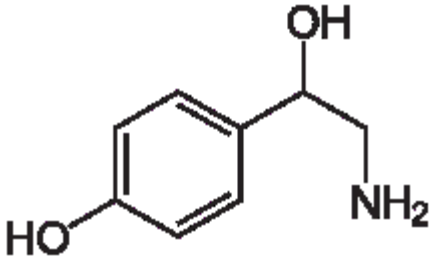
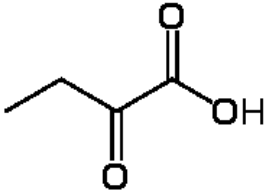
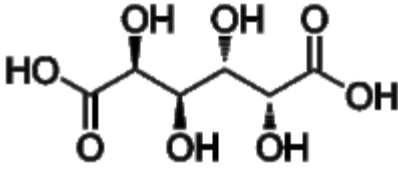
Molécule	Formule	Descriptif	Concentration utilisée
Tyramine		Synthétisée à partir de la tyrosine, par décarboxylation	2,9 mM
D, L octopamine		Formée à partir de tyramine par $\beta$ -hydroxylation	2,1 mM
Acide $\alpha$ -kétobutyrique		- Produit de la dégradation de la thréonine - Voie de biosynthèse et de dégradation d'acides aminés	3,2 mM
Acide mucique		Obtenu par oxydation du lactose et du galactose	1,9 mM

Figure 124 : Récapitulatif des molécules induisant la plus forte fluorescence de la souche à régulation inversée portant une fusion traductionnelle reflétant l'activité de BvgS.



Molécules (concentration utilisée)	Valeur brute de Fluorescence	Valeur du bruit de fond	Valeur de Fluorescence calculée	Densité optique de fin de culture
Tyramine (2,9 mM)	2680	2860	-180	1,02
	27450	7470	19980	2,4
	50350	10760	39590	2,7
	32420	16350	16070	2,1
D, L octopamine (2,1 mM)	5700	3570	2130	1,4
	10580	2320	8260	2,2
Acide $\alpha$ -kétobutyrique (3,2 mM)	2680	2860	-180	0,88
	58690	7470	51220	2,7
Acide mucique (1,9 mM)	2770	2860	-90	0,89
	39960	7470	32490	2,6

Figure 125 : Niveaux de fluorescence émise par les bactéries après l'ajout de diverses molécules au milieu de culture. Les valeurs de fluorescence calculées correspondent aux valeurs brutes auxquelles le bruit de fond a été soustrait.

Différentes concentrations ont été testées pour déterminer à partir de laquelle une fluorescence correspondant à deux fois celle obtenue pour le bruit de fond était observable. Ainsi, voici les différentes concentrations déterminées :

- Tyramine : 1,45 mM
- D, L octopamine : 1,05 mM
- Acide  $\alpha$ -kétobutyrique : 1,6 mM
- Acide mucique : 0,95 mM

Ces différents composés ont ensuite été achetés pour pouvoir continuer les expérimentations. Des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase ont été réalisées d'abord en ajoutant le composé au début de la culture, mais aucune diminution de l'activité de BvgS n'a été observée pour la souche sauvage, ni aucune augmentation pour la souche inversée. Ainsi, il est possible que les différentes molécules testées soient dégradées rapidement au cours des 24 h de culture en fiole en conditions standard d'agitation et d'aérobiose, et non plus en plaques de 96 puits. Les molécules ont ensuite été ajoutées durant les six dernières heures de culture à la souche présentant la régulation inversée, puis les activités  $\beta$ -galactosidase ont été déterminées (Fig. 126).

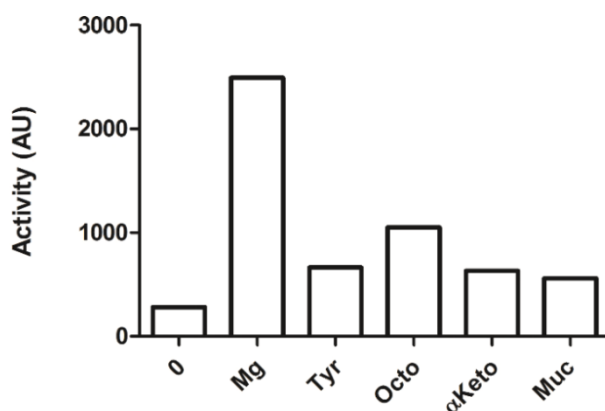
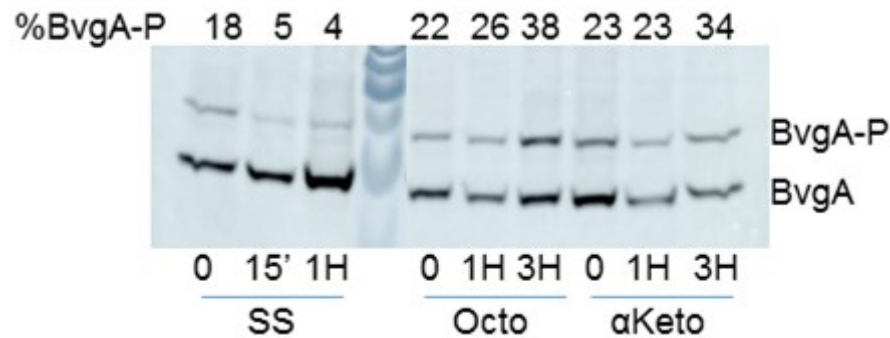


Figure 126 : Activités  $\beta$ -galactosidase reflétant l'activité du promoteur *ptx* pour la souche à régulation inversée après l'ajout de différentes molécules à concentration de 4 mM (tyramine, octopamine, acide  $\alpha$ -kétobutyrique et acide mucique) ou 50 mM ( $MgSO_4$ ) 6h avant la fin de culture. Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative.

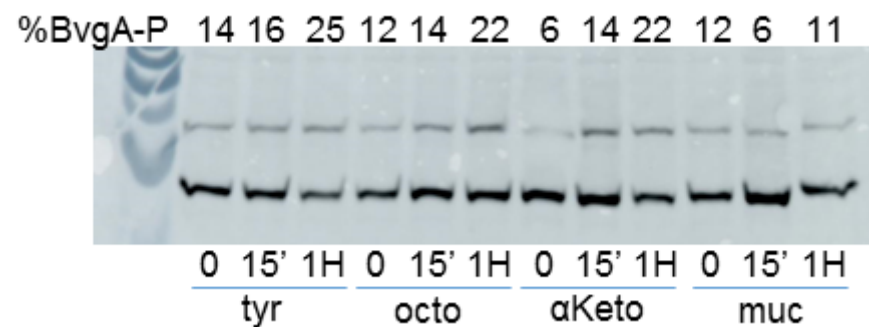
Les valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase sont relativement faibles et difficilement corrélables avec les valeurs de fluorescence obtenues en plaques (Fig. 125 et 126). Nous avons alors

décidé de tester en fluorescence les composés, mais des problèmes de croissance ont été rencontrés, et aucune fluorescence n'a été observée avec les composés autres que ceux provenant des plaques Biolog. Nous avons alors réalisé des analyses de Phos-tag après l'ajout des différentes molécules, afin de s'affranchir d'une éventuelle dégradation des composés (Fig. 127).

A



B



C

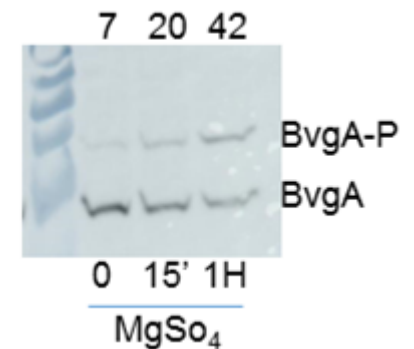


Figure 127 : Détermination de la quantité de BvgA phosphorylé par Phos-tag sur des lysats de cultures bactériennes de la souche à régulation inversée ( $\Delta$ PAS 65). Le temps 0 correspond au prélèvement effectué avant la centrifugation permettant de changer le milieu de culture par celui contenant les molécules d'intérêt. A. Un contrôle négatif avec du milieu seul (dénote SS) a été effectué en parallèle de l'utilisation d'octopamine et acide  $\alpha$ -kétobutyrique à 4 mM. B. Les différentes molécules (tyramine, octopamine, acide  $\alpha$ -kétobutyrique et acide mucique) ont été utilisées à 4 mM. C. Le sulfate de magnésium a été utilisé à 50 mM.

La quantité de BvgA phosphorylé tend à diminuer lorsque la souche est cultivée en milieu SS seul (Fig. 127A) et augmente fortement et rapidement après l'ajout de MgSO<sub>4</sub> (Fig. 127C). En revanche, l'ajout d'octopamine ou d'acide  $\alpha$ -kétobutyrique augmente légèrement la quantité de BvgA phosphorylé mais seulement après plusieurs heures. La tyramine semble avoir un léger effet sur la quantité de BvgA phosphorylé à une heure ; il aurait fallu sans doute poursuivre les prélèvements plus longtemps. L'acide mucique, quant à lui, ne semble pas modifier la quantité de BvgA phosphorylé (Fig. 127A et B). Ainsi, certaines molécules testées ont un léger effet sur l'activité de BvgS et cet effet sur la phosphorylation de BvgA est lent. Ceci suggère que ces molécules ne seraient pas directement perçues par BvgS mais possiblement par un système partenaire ou après modification par exemple suite à l'intégration dans une voie métabolique. En effet, la quantité de BvgA phosphorylé change très rapidement (de l'ordre de quelques minutes) suite à la perception directe de modulateur, suggérant un mécanisme rapide de transduction de signal au sein de BvgS et de phosphorylation de BvgA (Boulangier et al., 2013; Dupré et al., 2015b).

Curieusement, les valeurs de fluorescence obtenues en plaques avec ces différentes molécules étaient relativement élevées. Il est intéressant de noter que le temps de génération des bactéries semble beaucoup plus long en plaques qu'en cultures liquides (12 h comparé à 4 h), probablement parce que l'oxygénation et l'agitation sont moins bonnes. Il se pourrait que la forte fluorescence obtenue dans ces conditions soit due à un effet synergique entre la fixation des molécules et la croissance altérée dans un environnement limitant en oxygène. Des analyses de Phos-tag sur les bactéries cultivées en plaques de 96 puits, avec ces molécules n'ont pas permis d'observer de BvgA phosphorylé. L'ajout de  $MgSO_4$  aux bactéries donne une bonne fluorescence, de fortes valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase et l'apparition rapide d'une forte proportion de BvgA phosphorylé. Ainsi, il est intrigant que les molécules qui causent une fluorescence importante en cultures en plaques, aient peu d'effet lorsqu'elles sont achetées chez un autre fournisseur. Il se pourrait alors que dans les plaques Biolog, des 'additifs' favorisent la solubilité ou stabilisent le pH et que ces molécules aient un effet synergique dans notre test.

En résumé, les différentes molécules identifiées par fluorescence, n'ont pas d'effet drastique sur l'activité de BvgS en conditions de culture standard, et donc si ces molécules se lient à BvgS, il s'agit de 'mauvais' ligands. Cependant, rien ne permet d'affirmer à ce stade que c'est bien à VFT1 que se fixent ces molécules. Des analyses de biacore ou de thermophorèse pourraient aider à déterminer le site de fixation et mesurer des constantes d'affinité.

Le modèle de recherche de ligand par fluorescence est un système simple qui permet de déterminer directement l'effet d'une molécule sur l'activité de BvgS et de tester de nombreux composés. Nous aurions pu directement réaliser des analyses de TSA et chercher un ligand de VFT1. Il aurait fallu ensuite s'assurer que ce ligand présente des propriétés de modulation. La technique que nous avons utilisée nous permet de déterminer des molécules jouant un rôle dans la régulation de la virulence qu'elles se fixent ou non au niveau du domaine VFT1. De nouvelles banques de composés pourront être utilisées pour essayer de déterminer le ligand de VFT1 ou au moins trouver des molécules plus affines que les modulateurs déjà connus, pour étudier la signalisation au sein de BvgS. Des broyats de cellules eucaryotes, des lavages broncho-alvéolaires comme des banques de composés chimiques ou naturels seront nos premières cibles pour continuer cette recherche de ligand.

## **F. Recherche du microenvironnement humain induisant la modulation de la virulence**

Dans l'optique de déterminer le ligand naturel de BvgS, permettant à la bactérie de passer en phase  $Bvg^-$  ou  $Bvg^i$ , des modèles d'infections cellulaires ont été mis au point. En effet, il a été montré que des souches virulentes de *B. pertussis* pouvaient être internalisées dans des cellules phagocytaires telles que les macrophages et monocytes, mais également dans des cellules non phagocytaires. Ainsi, il semblerait que la bactérie ait développé des mécanismes d'invasion cellulaire dans le but d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Martín et al., 2015).

Différentes souches ont été construites et portent la fusion traductionnelle de la mRFP1 avec la sous-unité S1 de la toxine pertussique (*ptx*, Fig. 128), en vue de détecter la protéine de fusion au microscope.

Ci-dessous sont référencées les différentes souches utilisées et leur rôle dans ces expériences :

Souches	But
$\Delta$ PAS 65 et BPSM	Contrôles d'infection sans fluorescence
BPSM (pBBRptx-mRFP1)	Si fixation ligand antagoniste : diminution/perde de fluorescence
$\Delta$ PAS 65 (pBBRptx-mRFP1)	Si fixation ligand antagoniste : apparition de fluorescence
$\Delta$ PAS 65 (pBBRptx-mRFP1) pré-activé par MgSO <sub>4</sub> dans le milieu BG	Activation pour que la bactérie ait tous les facteurs de virulence nécessaires pour favoriser son entrée dans les cellules eucaryotes
$\Delta$ PAS 65 VFT1-SS (pBBRptx-mRFP1)	Contrôle positif où la fluorescence doit rester constante

**Figure 128 : Descriptif des différentes souches utilisées pour les infections cellulaires pour déterminer le ligand physiologique de BvgS.**

Dans l'hôte, l'infection par *B. pertussis* stimule le recrutement de granulocytes polynucléaires, de macrophages alvéolaires ainsi que de lymphocytes (Vandebriel et al., 2003). Comme *B. pertussis* ne peut pas survivre dans les granulocytes polynucléaires, ce type cellulaire ne constitue pas une niche intracellulaire pour ce pathogène (Vandebriel et al., 2003). En revanche, après internalisation par les macrophages une majorité des bactéries est tuée mais une petite proportion empêcherait la fusion du lysosome et pourrait se répliquer dans un compartiment non acide (Lamberti et al., 2010). Il faut cependant noter que *B. pertussis* ne peut survivre à un pH inférieur à 4,5 (Schneider et al., 2000). Un autre type de cellules, les cellules dendritiques, jouent un rôle important dans l'immunité innée et permettent l'élaboration d'une réponse de défense antimicrobienne grâce à la production de cytokines inflammatoires et d'autres médiateurs de l'immunité (Stefanelli et al., 2009).

Nous avons donc utilisé des cellules immunitaires phagocytaires de type macrophages et des cellules dendritiques

## **1. Infection de THP-1, monocytes humains différenciés chimiquement en macrophage**

### **a. Matériel et méthodes**

Des infections cellulaires ont été réalisées en vue d'observations microscopiques et de dénombrements des bactéries (CFU pour 'colony-forming unit').

Pour le dénombrement bactérien, l'expérimentation a été réalisée en plaque de 6 puits, et 1,8 millions de monocytes humains (lignée THP-1) ont été disposés dans chaque puits. La différenciation en macrophage se fait par ajout de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, 20 ng/mL) 18 h minimum avant l'infection. Ensuite, le tapis cellulaire est lavé deux fois, puis infecté à une multiplicité d'infection (MOI) de 200 pendant une heure. Deux

lavages au PBS sont réalisés et de la polymyxine B (100 µg/mL) est utilisée pour tuer les bactéries extracellulaires. L'ajout de l'antibiotique est considéré comme correspondant au temps 0. Après une heure d'action, le tapis cellulaire est lavé deux fois au PBS puis la concentration de polymyxine B est diminuée à 5 µg/mL. Après 4 h, 24 h et 48 h, le tapis cellulaire est lavé deux fois au PBS, puis de la saponine (0,1% final) est utilisée pour décrocher le tapis cellulaire. Des dilutions en série sont réalisées, et les boîtes sont ensemencées pour le dénombrement des bactéries au bout de 5 jours. Le protocole expérimental diffère légèrement pour les observations microscopiques. Les monocytes sont déposés dans une plaque de 24 puits contenant une lamelle, à raison de 400 000 cellules par puits. Cette fois de la formaline (Sigma) est utilisée à la place de la saponine dans le but de fixer le tapis cellulaire à la lamelle et ainsi pouvoir effectuer l'observation microscopique après préparation de la lame.

### b. Résultats

Les résultats de dénombrement bactérien suite à l'infection de THP-1, préalablement différenciés en macrophage, sont présentés dans la figure 129.

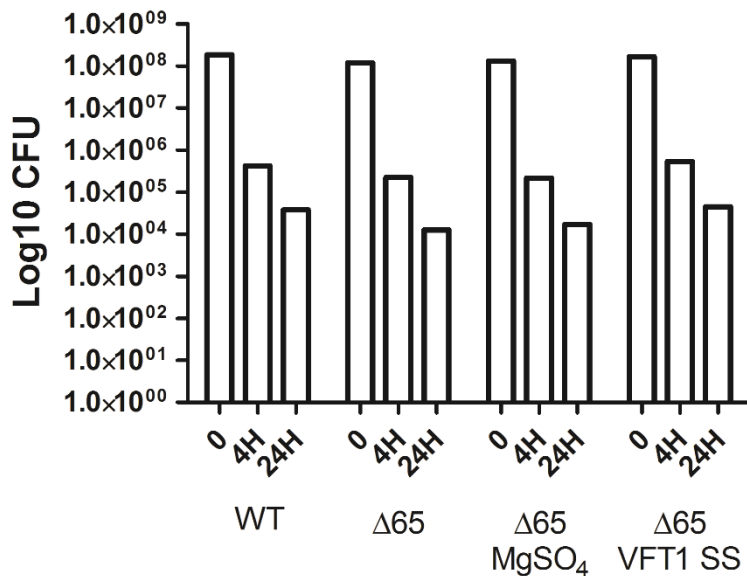


Figure 129 : Dénombrement bactérien issu de l'infection de THP-1 différenciés, par différentes souches bactériennes (voir Fig. 128). Le temps T0 correspond à l'inoculum bactérien utilisé pour l'infection. Les temps 4 et 24 sont comptés après l'ajout de la polymyxine B. Il s'agit d'une expérience préliminaire.

Pour les différentes souches testées, les résultats de dénombrement bactérien sont semblables. La souche ΔPAS 65 à régulation inversée est internalisée indépendamment de l'expression de tous ses facteurs de virulence. Son internalisation et sa survie sont comparables à celles de la souche sauvage ou de la souche exprimant de manière constitutive les facteurs de virulence (ΔPAS 65 VFT1-SS).

Les analyses des souches fluorescentes en microscopie ont été réalisées plusieurs fois mais ne nous ont pas permis d'observer une réactivation de la souche ΔPAS 65 dans nos conditions expérimentales, en comparant les champs avec ceux de cellules non infectées ou infectées avec des bactéries non fluorescentes.

Récemment, une étude du protéome de *B. pertussis* a été réalisée suite à l'infection de THP-1 sur la fraction des bactéries qui survivent et se multiplient à l'intérieur de la cellule. Une

modification du profil d'expression des protéines montre l'adaptation de la bactérie aux conditions intracellulaires. La plupart des facteurs de virulence exprimés en phase Bvg<sup>+</sup> tels que la FHA, PTX et ACT ont été identifiés 3h et 48 h après infection des cellules phagocytaires, suggérant que ces facteurs de virulence sont requis pour l'infection et la survie intracellulaire. Il n'y aurait donc pas de passage en phase d'avirulence des bactéries dans les macrophages (Lamberti et al., 2016). Mes résultats indiquant que la modulation de virulence de *B. pertussis* ne se produit pas dans les cellules THP-1 sont cohérents avec ces résultats de protéomiques.

## 2. Infection de cellules dendritiques DC2-4

### a. Matériel et méthodes

Le protocole expérimental d'infection des cellules dendritiques de souris DC2-4 est le même que pour l'infection des THP-1 excepté que les cellules sont adhérentes et ne nécessitent pas de différenciation au PMA. Toutefois, le temps d'infection est augmenté à 2 h, et la polymyxine B est utilisée à 20 µg/mL pendant 3 heures puis diminuée à 5 µg/mL (Stefanelli et al., 2009).

### b. Résultats

Les résultats de dénombrement obtenus après infection de cellules dendritiques par les différentes souches d'intérêt sont présentés dans la figure 130.

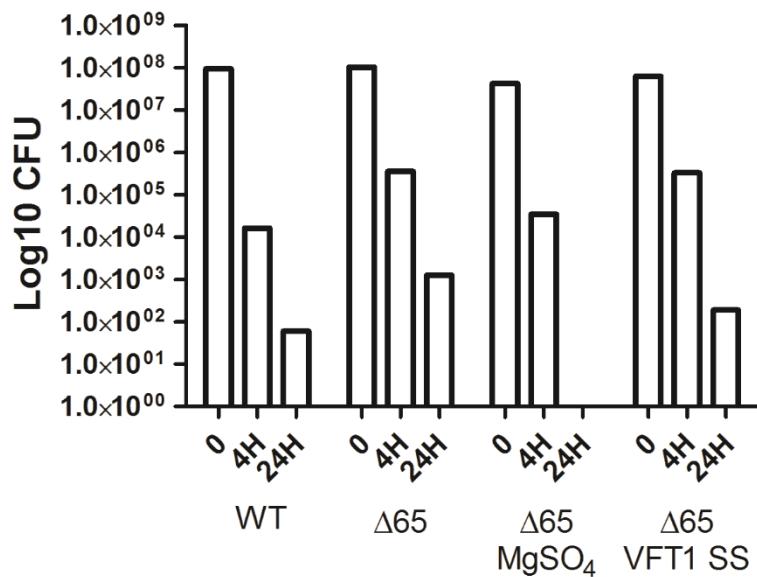


Figure 130 : Dénombrement bactérien issu de l'infection de cellules dendritiques de souris DC2-4, par différentes souches bactériennes. Le temps T0 correspond à l'inoculum bactérien utilisé pour l'infection. Les temps 4 et 24h sont comptés après l'ajout de la polymyxine B. Il s'agit d'une expérience préliminaire.

De légères différences de survie dans ces cellules sont obtenues pour les différentes souches de bactéries, mais il s'agit de résultats préliminaires issus d'une seule expérience. Ces derniers devront être répliqués. A l'heure actuelle, ces résultats restent difficiles à interpréter.

Les observations microscopiques suite à l'infection des cellules dendritique par différentes souches de *B. pertussis* ont été réalisées plusieurs fois mais n'ont pas permis d'observer de réactivation pour le mutant à régulation inversée.



Les expériences d'infection cellulaire constituent des tests préliminaires. Toutefois, il semble que les types cellulaires utilisés ne permettent pas la modulation de la virulence de nos souches bactériennes, et donc vraisemblablement ne produisent pas le stimulus nécessaire au passage en mode phosphatase de BvgS. Différentes études ont montré que *B. pertussis* était capable d'infecter les cellules épithéliales de différentes origines, respiratoires ou non (Hela229, CHO, Caco2). L'invasion des cellules épithéliales est un processus dépendant de l'expression des facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion cellulaire, étant donné que des mutants de BvgS sont significativement moins invasifs (Bassinat et al., 2000). D'autres types cellulaires pourront alors être utilisés dans nos prochaines expérimentations, comme des cellules épithéliales (A549 ou HTE) ou d'autres cellules immunitaires telles que des MHS (macrophages alvéolaires). Les cellules A549 correspondent à des cellules épithéliales issues d'un carcinome de poumon humain, tandis que les cellules HTE sont des cellules humaines épithéliales de trachée qui produisent des cytokératines et possèdent des microvillosités ainsi que des jonctions serrées, caractéristiques des cellules épithéliales (Bassinat et al., 2000). Des cellules épithéliales de larynx telles que les cellules HEP-2 pourront également être utilisées dans notre modèle infectieux. Enfin, il a été proposé que les macrophages alvéolaires consisteraient une niche intracellulaire pour *B. pertussis* étant donné que des bactéries viables sont retrouvées au niveau de ces cellules immunitaires plus de 21 jours après l'infection de souris (Lamberti et al., 2010). Il serait également intéressant d'utiliser un second gène rapporteur, comme la *gfp* ('green fluorescent protein') exprimé de façon constitutive, pour pouvoir distinguer parmi les bactéries présentes celles qui expriment la fluorescence rouge dépendant de l'activité de BvgS. Il sera alors possible de réaliser ces expériences de manière plus automatisée pour l'acquisition des résultats en utilisant un matériel de type opéra/opérette.

## G. Bilan

La souche  $\Delta$ PAS 65 présente comme particularité d'être peu active à l'état basal et de voir son activité kinase fortement augmenter suite à la perception de stimuli modulateurs pour BvgS. Ainsi, la perception de modulateurs chimiques ou la fermeture du VFT1 pour mimer la fixation d'un ligand antagoniste permet la réactivation de la souche, avec l'expression des facteurs de virulence associés, contrairement à la perception d'une baisse de température. Sa réactivation est également observée en phase stationnaire de croissance, lorsque l'activité BvgS diminue pour la souche sauvage, suggérant que ces deux souches seraient sensibles à la présence d'une molécule produite lors de la croissance bactérienne. Il s'agirait probablement de l'ion sulfate.

J'ai pu montrer l'importance de la taille du linker entre le segment transmembranaire et la kinase pour cette régulation inversée. La composition du linker joue également un rôle critique puisque certains autres mutants avec un linker de même taille ou d'un multiple de 7, ne présentent pas une régulation inversée mais sont insensibles à la modulation. La perte de résidus chargés du linker permet l'obtention de mutants insensibles à la modulation. Ainsi, le segment contenant plusieurs charges contiguës pourrait former un coude nécessaire à la régulation. Rappelons que l'un de ces résidus chargés correspondrait à l'Arg570 de BvgS sauvage, qui joue un rôle dans la transduction de signal. Des mutations ponctuelles au niveau

du patch de résidus chargés seront effectuées pour déterminer les résidus requis pour la régulation de l'activité de ces chimères.

Sur base des résultats obtenus, un modèle de fonctionnement pour la souche à régulation inversée a pu être proposé. Ce dernier devra être testé par des expériences complémentaires comme des analyses de cysteine scanning ou de la mutagenèse ciblée de ces chimères. Les domaines VFT transmettraient la même dynamique, la même contrainte et les mêmes mouvements que pour BvgS sauvage. A l'état basal, l'histidine du mutant  $\Delta$ PAS 65 serait positionnée de telle sorte à permettre une faible activité kinase, ou plus vraisemblablement le coiled coil adopterait majoritairement le registre qui donne une interface stable juste avant le DHp de la kinase, expliquant les faibles activités  $\beta$ -galactosidase obtenues. Suite à la perception de modulateur, les changements de conformation et de dynamique supposés pour BvgS sauvage s'effectueraient dans cette chimère (mouvement de piston symétrique au niveau membranaire, et rotation-cisaillement pour permettre l'écartement des hélices au niveau sous-membranaire). A la place du domaine PAS, une irrégularité putative dans les hélices du coiled coil produite par le segment chargé participerait à la régulation de cette chimère. La transmission d'information sortirait le coiled coil de son état de repos, induisant une dynamique accrue et peut être aussi le repositionnement de l'histidine par rapport au site catalytique, pour *in fine* permettre l'autophosphorylation de la kinase.

Le mutant  $\Delta$ PAS 65 constitue un bon modèle pour la recherche de ligands et l'étude de la variation de phase. En effet, plusieurs nouvelles molécules ont été identifiées comme modulant l'activité de cette souche à régulation inversée, même si leur effet semble limité. Un modèle d'infection cellulaire pour observation microscopique a été développé afin de déterminer les conditions *in vivo* dans lesquelles la variation de phase aurait lieu. La poursuite de ces analyses permettra une meilleure caractérisation du cycle infectieux de la bactérie, avec la découverte du microenvironnement induisant la modulation phénotypique. L'identification d'un ligand de VFT1 ou de tout autre ligand physiologique des domaines périplasmiques plus affin que ceux déjà obtenus constituerait une avancée considérable dans l'étude de BvgS.

# Discussion



## XI. Discussion

Les travaux menés lors de ces trois années de thèse ont permis d'avancer dans la compréhension du senseur-kinase BvgS. L'effet du nicotinate, un modulateur de la virulence, sur la portion périplasmique de BvgS a été déterminé. Une recherche de ligand des domaines VFT1 a été entreprise. La transduction de signal des domaines périplasmiques jusqu'à la kinase a été caractérisée. Le rôle du domaine PAS dans la signalisation ainsi que sa topologie ont été étudiés. Les expériences réalisées ont apporté des réponses à différentes questions que nous nous posions au démarrage de ce projet, mais ont également apporté de nouvelles interrogations avec par exemple l'obtention de différentes souches à régulation inversée, dont l'étude a été initiée.

BvgS sert de modèle à une famille de senseurs-kinases encore peu caractérisée, qui comporte un grand nombre d'homologues dont certains chez des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, et *Borrelia burgdorferi*. Nos modèles pourront s'appliquer à la famille de BvgS et aider à la compréhension du fonctionnement de ces divers senseurs-kinases.

BvgS est constitué de trois domaines putatifs de perception que sont les domaines VFT et le domaine PAS. Cette organisation permettrait la perception d'une diversité de stimuli, induisant une régulation fine de l'activité de BvgS pour l'adaptation à un environnement complexe. A l'heure actuelle, aucun ligand physiologique avéré n'a été déterminé pour ces différents domaines. Les domaines VFT seraient impliqués dans la perception de stimuli environnementaux ou de métabolites excrétés. Le domaine PAS permettrait vraisemblablement la fixation d'un métabolite ou d'une molécule importée.

### A. La portion périplasmique de BvgS

Au niveau de sa portion périplasmique, BvgS présente deux domaines VFT. Notons que des domaines VFT sont également retrouvés chez les eucaryotes où ils constituent des récepteurs impliqués dans différents mécanismes de régulation du système nerveux (partie III.B.5.). Les domaines périplasmiques de BvgS semblent requis pour l'activité du système et par conséquent pour la régulation de la virulence de *B. pertussis*.

Différentes études ont mis en évidence l'importance des mouvements de fermeture des domaines VFT des récepteurs eucaryotes pour la signalisation. Chez BvgS, l'activité kinase à l'état basal dépend de la dynamique du VFT distal à la membrane, le VFT1. En effet, sa fermeture par un pont disulfure a un effet drastique sur l'activité de BvgS. Dans la structure cristallographique de la portion périplasmique de BvgS, le VFT1 est en conformation ouverte avec une charnière dépourvue de structure secondaire, et le VFT2 est en conformation fermée avec une charnière rigide constituée de brins  $\beta$ . Les analyses de RPE ont mis en évidence un gradient de dynamique au sein de la portion périplasmique avec un lobe 1 du VFT1 très mobile, le lobe 2 du VFT1 présentant une dynamique intermédiaire et le lobe 1 du VFT2 avec une dynamique ralentie.

L'effet du nicotinate sur la portion périplasmique de BvgS a été analysé. Le site précis ainsi que les résidus impliqués dans la fixation de ce modulateur sont jusqu'à ce jour inconnu, mais de nombreuses indications suggèrent qu'il se fixerait au niveau de la cavité du VFT2. L'ajout de nicotinate à des cristaux du domaine VFT2 pour obtenir la structure du complexe avait induit la cassure des cristaux, suggérant une modification de la conformation de la protéine. Les analyses d'interaction ligand-protéine (ITC et thermophorèse) ont permis de mettre en évidence la présence d'un site de fixation par monomère. La fixation de nicotinate induit une diminution de la dynamique du lobe 2 du VFT1, qui pourrait s'expliquer par la formation d'un bloc compact entre le VFT2 et le lobe 2 du VFT1. Ce dernier va imposer une force sur les hélices H19 pour permettre la transduction de signal et le passage vers le mode phosphatase au niveau de la région cytoplasmique de BvgS. Le domaine VFT1 serait le moteur du système tandis que le VFT2 jouerait le rôle d'un transmetteur et permettrait d'atténuer le signal suite à la perception de nicotinate.

Peu d'information sont disponibles quant aux mouvements induits par les domaines VFT pour permettre la transduction d'information aux modules en aval. Le mécanisme principalement décrit est celui faisant intervenir des mouvements de cisaillement comme nous l'avons vu dans la partie V.B.1.b., avec l'exemple des domaines périplasmiques du senseur-kinase BT4663 de *B. thetaiotaomicron*. Ce type de mouvement a également été référencé pour expliquer l'ouverture du canal ionique des iGluR. Dans ce modèle, la fixation de glutamate induit la fermeture du domaine VFT proche de la membrane ce qui va permettre l'élaboration de mouvements de cisaillement des segments transmembranaires et ainsi l'ouverture du canal ionique (Mayer, 2006). Mes analyses de cysteine scanning du segment précédant la membrane ne nous ont pas permis de mettre en évidence ce type de mouvement des hélices H19 dans leur portion périplasmique. De la dynamique moléculaire et des analyses de modes normaux ont été réalisées sur la structure cristallographique du dimère périplasmique de BvgS. Ces analyses ont permis d'identifier les principaux mouvements des domaines VFT (ouverture/fermeture/torsion) et ont suggéré des mouvements de piston ou de rotation des hélices H19. Toutefois, il faut rappeler que la structure cristallographique obtenue n'est pas soumise aux contraintes imposées par la membrane ni par le reste de la protéine, puisqu'il s'agit uniquement de la forme périplasmique soluble. Dans d'autres systèmes, des mouvements de rotation couplés (PhoQ) ou non (McpB) à des mouvements de cisaillement ainsi que des mouvements de piston (chimiorécepteurs, DcuS, CitA) ont été rapportés pour induire la transduction d'information entre les domaines périplasmiques et cytoplasmiques (voir partie V.B.1). Mes résultats de cysteine scanning suggèrent quant à eux, un mouvement de piston symétrique à travers la membrane. Les analyses d'accessibilité de cystéine devront être poursuivies pour tester cette hypothèse. Le domaine VFT2 présente des boucles riches en résidus polaires et chargés, potentiellement en contact avec la membrane plasmique. Ces boucles pourraient jouer un rôle dans la conformation de la protéine, dans la fixation d'ions, ou dans la transduction de signal. Les domaines VFT2 pourraient s'appuyer sur la membrane pour permettre un mouvement de levier pour la transduction d'information à travers H19 en induisant un mouvement de piston symétrique au niveau du segment transmembranaire.



Le VFT1 pourrait être le site de fixation d'un ligand antagoniste permettant le passage en phase d'avirulence de la bactérie, puisque sa fermeture affecte drastiquement l'activité kinase. Une recherche de ligand a été entreprise grâce à l'utilisation d'une souche à régulation inversée (peu active à l'état basal et qui nécessite la fixation de modulateur ou la fermeture du VFT1 pour son activation) portant un rapporteur fluorescent sous la dépendance de BvgS. Ainsi, l'activation de ce dernier se traduit par une apparition de fluorescence. Les différentes molécules identifiées se sont avérées relativement peu efficaces sur la modulation de l'activité de BvgS, soulignant le fait que s'il s'agit de ligand se fixant au niveau des domaines périplasmiques, leur efficacité est limitée. Il faudra poursuivre nos investigations, pour tenter de déterminer un ligand antagoniste pour le domaine VFT1 dont l'efficacité sera avérée, et qui permettrait le passage en mode phosphatase de *B. pertussis*. Si nous parvenons à déterminer ce ligand, celui-ci sera utilisé en routine au laboratoire pour poursuivre l'étude de la transduction d'information au sein de BvgS. Une recherche de ligands pourrait également être effectuée pour déterminer des ligands antagonistes plus affins que ceux déjà disponibles pour le domaine VFT2, ceci éviterait les problèmes de croissance bactérienne qui sont généralement rencontrés lorsque de fortes concentrations de modulateur sont ajoutées au milieu de culture. Des analyses de docking pourront être réalisées pour faire un tri dans les molécules à tester *in vivo*. Il se pourrait également que le domaine VFT1 ne fixe pas de ligand antagoniste, et qu'il permette uniquement de donner de la dynamique au système. Le VFT2 serait alors le domaine de régulation permettant la fixation des modulateurs, et agirait comme un frein pour diminuer la dynamique du système et induire le passage en mode phosphatase. Toutefois, la cavité du domaine VFT1 est bien conservée chez *Bordetella* ce qui laisse à penser qu'elle reste utile pour la fixation d'un ligand particulier.

## **B. La transduction de signal au sein de BvgS**

BvgS présente une activité kinase à l'état basal et suite à la perception de différentes concentrations de modulateur, une inactivation du senseur-kinase s'effectue grâce au passage en mode phosphatase. Aucune information n'était disponible quant à la transduction de signal par les connecteurs mécaniques en hélices  $\alpha$  de BvgS, avant le démarrage de cette étude. Les analyses de cysteine scanning réalisées pour les derniers résidus périplasmiques de l'hélice H19 ont mis en évidence des contacts proches des hélices. Celles-ci seraient dynamiques, en accord avec l'idée que la dynamique du VFT1 est le moteur pour l'activité du système. Mes données suggèrent également que la dernière portion de l'hélice périplasmique de BvgS serait légèrement déroulée/étendue, ce qui serait en accord avec notre idée de levier et d'un mouvement de piston symétrique. En effet, si les domaines VFT s'appuient sur la membrane et effectuent un mouvement de levier, celui-ci va 'tirer' sur le segment transmembranaire. Le fait que l'hélice périplasmique soit étendue agissant comme un linker souple pourrait en effet faciliter la remontée du segment membranaire tout en évitant une contrainte trop forte. Les résidus polaires du segment avant la membrane pourraient interagir avec les têtes polaires des lipides et réguler ainsi le mouvement de remontée.

Les analyses de cysteine scanning réalisées au niveau du segment transmembranaire de BvgS ont mis en évidence des contacts proches des hélices ainsi qu'une dynamique rotationnelle pour la première portion du segment transmembranaire. Pour le motif GxxxA qui est connu

pour favoriser les contacts proches, relativement peu de formation de pont disulfure sont observables caractérisant ainsi un éloignement des hélices qui pourrait être dû à un point de pivot et un mouvement de cisaillement. Dans la membrane, les profils de dimérisation à l'état basal et suite à la perception de modulateur sont semblables. Des résultats similaires ont été obtenus pour DcuS (partie V.B.1.a.), pour les chimiorécepteurs à l'aspartate et au ribose/galactose, et pour EnvZ (Heininger et al., 2016), et dans ces cas des mouvements de piston avaient été proposés. Des analyses d'accessibilité des cystéines réalisées chez *E. coli* ne nous ont pas permis jusqu'ici de confirmer l'hypothèse d'un mouvement de piston symétrique en réponse au modulateur. La composition et l'épaisseur de la membrane d'*E. coli* pourraient différer de celles de *B. pertussis*. Ceci est suggéré par un profil de formation de pont disulfure variable entre les deux bactéries pour la mutation periplasmique R<sub>539</sub>C, appuyant ainsi une différence d'environnement. Des analyses d'accessibilité de cystéine seront effectuées *in vivo* chez *B. pertussis*. Des analyses *in vitro* après reconstitution de BvgS en vésicules pourraient également être envisagées, mais à l'heure actuelle, nous n'arrivons pas à produire la protéine en quantité suffisante. Si nous y parvenons, nous pourrions tester l'hypothèse de piston grâce à des analyses de RPE, comme décrit pour le chimiorécepteur Tar (Ottemann et al., 1999) ou des marquages fluorescents pour étudier l'accessibilité des cystéines membranaires. Si nous ne pouvons pas mettre en évidence de mouvement de piston symétrique, cela pourrait indiquer une amplification du signal au sein de la protéine, avec peu de changements au niveau du segment membranaire, et une augmentation de l'amplitude de mouvement plus bas (écartement des hélices précédant le domaine PAS et rigidification du coiled coil précédant la kinase). En effet, de faibles variations dans le profil de formation de pont disulfure sont observables au centre du segment membranaire (motif GxxxA) et pourraient s'apparenter à un rapprochement des hélices ; ce léger changement de conformation pourrait être suffisant pour transmettre l'information au domaine en aval si un phénomène d'amplification a lieu au sein du senseur-kinase. Il faut noter également que tous les résidus de la membrane n'ont pas été ciblés et il n'est pas exclu que des modifications plus drastiques soient observables pour les quelques positions non testées.

Dans la famille de BvgS, le coiled coil reliant le segment membranaire au domaine PAS présente une variété de tailles mais pas par multiples d'heptades. Ainsi, on peut se demander quels seraient les mouvements de ce coiled coil pour permettre la transduction de signal. Les analyses de cysteine scanning ont montré une dynamique rotationnelle du linker à l'état basal et un mouvement d'écartement des hélices pour le passage en mode phosphatase. La taille et la composition du linker sont critiques pour l'activité et la régulation de BvgS, ceci est illustré par les nombreuses mutations dans cette région qui rendent BvgS insensible aux modulateurs.

Les analyses de cysteine scanning réalisées au niveau du domaine PAS ont mis en évidence un changement d'interface suite à la perception de modulateur. Une faible proportion de dimère était observable pour la grande majorité des positions testées à l'état basal, pouvant s'expliquer par une certaine flexibilité de ce domaine. Des expériences préliminaires de RMN sur le domaine PAS recombinant avaient montré sa grande mobilité qui pourrait être nécessaire pour l'activité kinase. L'ajout de modulateur diminue la formation de dimère pour la majorité des positions testées. Différents mouvements peuvent alors être proposés comme

une dé-dimérisation du domaine, ou des mouvements de rotation couplés ou non à des mouvements de cisaillement. Une dé-dimérisation du domaine pourrait être en accord avec le mouvement d'écartement des hélices en amont. La structure cristallographique du domaine PAS obtenue récemment montre un agencement entre monomères non physiologique, ce qui n'est pas inédit pour ce type de domaine. En effet, différentes structures de domaine PAS ont déjà été référencées comme étant 'aberrantes' avec des domaines en tête bêche ou présentant une interface de dimérisation très étendue/éloignée où les résidus des feuillets  $\beta$  ne présentent pas d'interaction. Sur base de la structure du domaine PAS de BvgS, il sera difficile de choisir des résidus potentiellement en interaction pour continuer notre analyse de topologie par cysteine scanning. De la dynamique moléculaire où des contraintes seront imposées pour favoriser un rapprochement des feuillets  $\beta$  pourrait permettre de reconstruire un modèle de dimère plus plausible et aider aux choix des résidus à cibler.

Les analyses réalisées au niveau du coiled coil reliant le domaine PAS à la kinase ont mis en évidence l'importance d'une balance entre rigidité et dynamique pour l'activité basale et la réponse à la modulation de BvgS. A l'état basal, le coiled coil présente une forte dynamique rotationnelle favorisant l'autophosphorylation de la kinase et est en accord avec les modèles de régulation proposés dans la littérature (modèle de flip-flop, partie II.A.3.b.1.). La perception de modulateur permet la rigidification du coiled coil, induisant le passage en mode phosphatase.

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que BvgS soit dynamique à l'état basal. Différents degrés de dynamique doivent exister au sein de la protéine pour permettre une signalisation par modules comme précédemment décrit pour les chimiorécepteurs Tar et Aer (partie V.F.). Trois phases de virulence, Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> et Bvg<sup>-</sup> ont été référencées (voir partie II.B.2.d.). Nous avons caractérisé la topologie et la dynamique de BvgS à l'état basal (phase de virulence, Bvg<sup>+</sup>) et après la perception de modulateur (phase d'avirulence, Bvg<sup>-</sup>). La phase Bvg<sup>i</sup> caractérisée par une faible activité de BvgS pourrait correspondre à une dynamique intermédiaire ou à un déplacement de l'équilibre entre les deux états déjà présentés. Ainsi, BvgS pourrait être caractérisé par trois ou deux états de signalisation.

Les chimères dépourvues de domaine PAS ont permis de mettre en évidence que les règles de régulation de BvgS pouvaient s'appliquer à la famille. Ainsi, la composition du coiled coil précédant la kinase est importante pour la capacité du senseur-kinase à passer d'un état d'activité à un autre. La kinase serait régulée par un changement de dynamique du coiled coil. Avec les coiled coils de petite taille insérés entre les domaines VFT et la kinase de BvgS, la perception de modulateur chimique n'est pas un signal assez fort pour permettre le changement d'état, comparé à la fermeture du VFT1, laissant à penser qu'*in vivo* la perception d'un ligand par ce domaine régulerait l'activité de la kinase. Un mécanisme de transmission d'information peut être proposé pour les chimères de BvgS et celui-ci pourrait être applicable à la famille. A l'état basal kinase, le senseur-kinase est caractérisé par une dynamique globale, des domaines périplasmiques et du coiled coil précédant la kinase qui serait sujet à des mouvements de rotation. La perception de modulateur (ou la fermeture du VFT1) génère un mouvement de piston symétrique des segments transmembranaires et un écartement des hélices en aval des domaines périplasmiques. Un point de pivot dans le coiled coil permettrait

des contacts proches des hélices au niveau du motif LLAAA, laissant le coiled coil adopter son interface hydrophobe caractéristique de l'état phosphatase. Deux registres de coiled coil ont pu être identifiés pour la majorité des linkers des homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS. Une inter-conversion entre ces deux registres permettrait la régulation de ces senseurs-kinases. L'état kinase serait caractérisé par un coiled coil stable en partie N-terminale et dynamique en partie C-terminale. L'état phosphatase quant à lui serait caractérisé par un coiled coil dynamique en partie N-terminale avec des mouvements d'écartement possibles, et la partie C-terminale du coiled coil serait stable, permettant sa rigidification. La composition des différents linkers pourrait faire intervenir des altérations de la périodicité comme des stutters, stammers ou skips (voir partie V.A.3), qui interviennent dans la régulation. Pour les homologues dépourvus d'un motif LLAAA discernable, il se pourrait alors que les règles de régulation diffèrent quelque peu de celles énoncées ci-dessus. Dans toutes nos chimères, nous avons conservé le segment membranaire de BvgS, mais il est vraisemblable que dans les protéines d'origine, le segment transmembranaire ait évolué pour s'adapter à la composition membranaire de l'organisme hôte, ce qui pourrait altérer un peu la dynamique et le mode de transmission de l'information.

### C. Etude du domaine PAS de BvgS

Les domaines PAS sont impliqués dans la perception de divers stimuli chimiques ou physiques (voir partie IV.D.1.). Ces domaines permettent d'induire une signalisation et renseignent la bactérie sur son environnement et son état métabolique. Nous avons identifié plusieurs molécules qui pourraient se fixer dans la cavité du domaine. Leur nature suggère un lien entre métabolisme et virulence. Des analyses d'interaction ligand-protéine pourront être effectuées pour déterminer les paramètres d'association avec la protéine. Etant donné les différentes molécules déterminées comme ligand potentiel du domaine PAS, nous pouvons nous demander si la cavité de ce domaine peut fixer plusieurs métabolites ou si certains ligands se fixeraient au niveau de l'interface dimérique. Des analyses de séquences de BvgS provenant d'isolats de *Bordetella* ont mis en évidence une forte conservation du domaine PAS laissant à penser que celui-ci pourrait percevoir un ligand ou que la cavité du domaine est importante pour l'activité du système. De par les différentes mutations introduites qui affectent l'activité de BvgS, nos travaux soulignent l'importance de l'intégrité du domaine PAS pour l'activité de BvgS. Nous avons focalisé notre attention sur les molécules stabilisant le domaine PAS, puisque notre hypothèse de départ était que ce dernier nécessitait d'être bien structuré et compact pour l'activité du système et que la fixation d'un ligand participait à sa structuration. Toutefois, il se pourrait que le domaine PAS fixe un ligand antagoniste, produit à un certain moment du cycle infectieux, qui le déstabiliserait ou tout simplement lui permettrait de changer d'interface/conformation/dynamique pour permettre le passage en mode phosphatase. Des études seront donc à poursuivre pour caractériser le rôle de fixation de ligand du domaine PAS.

Le domaine PAS de BvgS semble dispensable pour l'activité du senseur-kinase étant donné que le remplacement de celui-ci par des coiled coils provenant d'homologues de BvgS dépourvus de domaine PAS permet l'obtention de chimères présentant une activité kinase à l'état basale. Ainsi, le domaine PAS pourrait jouer un rôle amplificateur de signaux,

expliquant pourquoi en son absence le linker doit être de longueur suffisante pour jouer le même rôle. Pour certains variants de BvgS présentant des mutations au niveau de la portion périplasmique qui induisent une inactivation du système, il apparaît de manière spontanée dans le domaine PAS ou dans le segment qui le précède, des mutations permettant l'obtention d'un mutant avec une activité kinase et une insensibilité aux modulateurs. Nous avons essayé d'obtenir des mutations similaires en partant d'une chimère dépourvue de domaine PAS et portant une mutation dans le VFT2 qui inactive BvgS, mais aucun mutant hémolytique n'a pour le moment été obtenu, soulignant ainsi le fait que le domaine PAS, suite à ces mutations compensatrices, joue un rôle central dans la réactivation de certains mutants et servirait d'interrupteur pour permettre la transmission de l'information. Ainsi, pour les chimères dépourvues de domaine PAS, il faudrait certainement plusieurs mutations pour restaurer la dynamique nécessaire à l'activité kinase.

Les différentes mutations spontanées induisant une insensibilité aux modulateurs dans BvgS sauvage sont retrouvées principalement au niveau du coiled coil en amont du domaine PAS, et au niveau du domaine PAS lui-même. Certaines explications peuvent être proposées quant à leur fonction. Ainsi, au niveau du coiled coil, certaines mutations font intervenir la substitution d'un résidu chargé ce qui pourrait provoquer une déstabilisation des hélices et du coiled coil. Dans la partie basse de ce coiled coil, certaines mutations concernent des résidus potentiellement en interaction avec le domaine PAS, ce qui déconnecterait le domaine PAS des hélices flanquantes en amont. Certaines substitutions pourraient également déstabiliser le domaine PAS ou accroître sa dynamique, ce qui l'empêcherait d'effectuer la transition vers le mode phosphatase. Malheureusement, la structure cristallographique du domaine PAS récemment obtenue n'apporte pas d'éléments de réponse pour comprendre le rôle de ces résidus particuliers dans la signalisation. Chez EvgS, un homologue de BvgS chez *E. coli*, de nombreuses mutations induisant une insensibilité à un signal avéré pour EvgS (des pH acides) sont retrouvées au niveau du domaine PAS (Johnson et al., 2014), laissant penser que comme pour BvgS, le domaine PAS est un élément de régulation supplémentaire permettant la transduction de signal mais aussi une activation du système.

#### **D. Mutants à régulation inversée**

Lors de ce travail, trois mutants présentant une régulation inversée ont été obtenus, ce qui n'avait jamais été rapporté jusqu'ici dans la littérature de *B. pertussis*. Une étude plus approfondie a été initiée pour déterminer les règles qui s'appliquent à la chimère BvgS $\Delta$ PAS<sup>65</sup>. L'augmentation de son activité kinase requiert la perception de modulateurs chimiques (nicotinate et sulfate de magnésium), la fermeture du VFT1, ou le passage en phase stationnaire. La taille ainsi que la composition en acides aminés et particulièrement la présence de résidus chargés en sortie de membrane semblent déterminantes pour la régulation inversée du mutant. Des analyses de cysteine scanning seraient vraiment informatives pour déterminer l'interface du coiled coil en conditions basales et suite à la perception de modulateur. De nouvelles constructions chimériques devront être menées afin d'établir des règles concernant la régulation inversée.

Ces souches à régulation inversée sont également un atout pour la caractérisation de BvgS puisqu'elles pourront aider à l'identification de modulateurs physiologiques et à caractériser la variation phénotypique.

## **E. La modulation de la virulence de *B. pertussis***

### **1. Modulation chimique de la virulence : Perception du MgSO<sub>4</sub>**

Le sulfate de magnésium est un modulateur de virulence, mais jusqu'à ce jour son site de fixation n'a pas été identifié. Au vu des résultats obtenus en résonance paramagnétique électronique, il semblerait que le sulfate de magnésium se fixe au moins en partie à la portion périplasmique de BvgS. Ces données sont en accord avec le phénotype de certains mutants des domaines VFT2 (mutant BvgS<sub>F317A</sub> hypersensible, mutants avec un pont disulfure dans le VFT2, insensibles). La perception de sulfate de magnésium permet le ralentissement du lobe 2 du VFT1. De manière générale, les mutants des domaines périplasmiques insensibles au nicotinate le sont aussi au sulfate de magnésium. Pourtant pour certains mutants, une réponse différente aux deux modulateurs est observable ce qui laisse à penser que ces deux modulateurs jouent par des mécanismes partiellement distincts (Dupré E., Thèse de doctorat, 2013). L'effet du sulfate de magnésium a été testé sur les chimères dépourvues de domaine PAS. Ce modulateur permet le passage en mode phosphatase pour les différents mutants sensibles au nicotinate. Ainsi, le domaine PAS ne semble pas être le site de fixation de ce modulateur. Cependant, de façon intéressante, le mutant BvgS<sup>fl</sup><sub>1690C</sub> à régulation inversée n'est pas réactivé par le MgSO<sub>4</sub>.

Le sulfate de magnésium pourrait avoir plusieurs sites de fixation au niveau de BvgS. Ainsi, il pourrait se fixer dans la cavité du VFT2 ou entre la surface du VFT2 et la membrane, comme pour les ions Mg<sup>2+</sup> dans le cas de PhoQ (voir partie V.C.4.). Le sulfate de magnésium pourrait également se fixer à une interface de la région périplasmique, comme dans le cas des récepteurs eucaryotes au peptide natriurétique (voir partie III.B.5.c.). Certains coiled coils sont connus pour permettre la fixation d'ions à l'interface entre leurs hélices, comme dans le coiled coil à trois hélices de SadA de *Salmonella enterica*, un autotransporteur trimérique d'adhésines, qui présente de nombreux résidus polaires prédits pour être à l'interface du coiled coil. La structure de ce coiled coil fixant un anion de type bromide a été obtenue (Hartmann et al., 2009). Les ions sulfates ou magnésium pourraient agir de cette manière dans BvgS. Un autre site potentiel pour la fixation de MgSO<sub>4</sub> pourrait être au niveau de la kinase, elle-même.

### **2. Modulation physique de la virulence : Perception de la température**

Différentes mutations de BvgS au niveau de la portion périplasmique induisent une insensibilité du senseur-kinase à la température laissant à penser que la perception de ce stimulus pourrait se faire au niveau du périplasma (Dupré E., Thèse de doctorat, 2013). Lors de nos analyses de résonance paramagnétique électronique, nous avons voulu tester l'effet d'une diminution de la température sur la portion périplasmique de BvgS mais nous nous sommes heurtés à une limitation de l'appareillage de mesure. L'étude de la perception de la température a été poursuivie en effectuant des analyses de Phos-tag sur la souche sauvage. La perception d'un changement de température induit une déphosphorylation de BvgA en deux

temps, avec une phase rapide de quelques minutes puis une phase lente de plusieurs heures pour la déphosphorylation complète du régulateur de réponse. Cette cinétique en deux temps laisse à penser que plusieurs éléments de BvgS pourraient être impliqués dans la perception de la température ou qu'il faut suffisamment de temps à la bactérie pour s'adapter complètement à ce changement environnemental. Ainsi, la déphosphorylation rapide de BvgA pourrait être due à un ralentissement de la dynamique des VFT1, puis la modification de la membrane induirait un effet supplémentaire pour permettre la déphosphorylation complète de BvgA. Nous pouvons citer l'exemple de DesK, précédemment décrit dans la partie V.E., où une rigidification accompagnée d'un épaississement de la membrane surviennent après une diminution de la température. Il se pourrait également que le changement de température permette la production d'une molécule qui serait perçue par le domaine PAS et induirait le passage en mode phosphatase. Pour tester cette hypothèse, il faudrait déterminer la cinétique de déphosphorylation de BvgA pour une chimère dépourvue de domaine PAS et présentant une régulation par les modulateurs similaire à celle de BvgS.

### 3. Variation de phase

Les modulateurs de virulence déjà décrits tels que le nicotinate et le  $MgSO_4$  ou ceux déterminés lors de cette étude ne semblent pas être de bons ligands, et des concentrations millimolaires sont requises pour affecter l'activité de BvgS. Il se pourrait que *B. pertussis* ait évolué de telle sorte à fixer de 'mauvais' ligands et n'existe plus que sous deux phases, la phase  $Bvg^+$  sans fixation de ligand, à l'état basal, et la phase  $Bvg^i$  suite à la perception du stimulus. Il a été montré que ces deux phases avaient lieu chez l'homme (voir partie II.B.2.d.). La phase  $Bvg^-$ , utile à *B. bronchiseptica* pour sa survie dans l'environnement, pourrait ne plus exister chez *B. pertussis* étant donné que ce pathogène strictement humain a perdu de nombreux gènes pour sa survie dans l'environnement et que peu d'information sont disponibles quant à l'élaboration de cette phase chez l'homme. Toutefois, il n'est pas exclu que cette phase ait lieu à un moment précis dans le cycle infectieux de *B. pertussis*, lorsqu'elle rencontre un environnement particulier comme à l'intérieur d'un type cellulaire spécifique. Les infections de cellules phagocytaires réalisées lors de ce travail, ne nous ont pas permis de déterminer l'environnement dans lequel BvgS serait en phase  $Bvg^-$ . Récemment, il a été montré que le profil d'expression génique de *B. pertussis* était modifié au cours de l'infection sur modèle souris. Ainsi, les phases  $Bvg^+$  et  $Bvg^i$  seraient adoptées de manière préférentielle, mais certaines données obtenues supporteraient aussi l'existence de la phase  $Bvg^-$  durant l'infection. En effet, une vaccination avec des protéines membranaires isolées de bactéries en phase  $Bvg^-$  était capable d'induire une protection contre une infection intra-nasale. L'expression de plusieurs gènes *vrgs* durant l'infection a également été mise en évidence. De manière générale, plusieurs centaines de gènes sont exprimés différemment entre le haut et le bas du tractus respiratoire, suggérant que ces deux sites pourraient représenter des niches distinctes (Daan de Gouw, Thèse de doctorat, 2015). Il a également été suggéré que la phase  $Bvg^-$  s'effectuait pour des bactéries *B. bronchiseptica* extraites de poumons de souris infectées, mais que cette modulation de la virulence n'était effectuée que pour une petite proportion des bactéries durant l'infection (Mason et al., 2013). Ainsi, des analyses restent à poursuivre pour déterminer les ligands *in vivo* de *B. pertussis* et pour caractériser le changement de phase phénotypique qui s'effectuerait durant le cycle infectieux de la bactérie.



#### 4. Une régulation complexe de la virulence

Précédemment décrit comme essentiel à la virulence, BvgAS ne semble pas être le seul système à deux composants impliqué dans la pathogénie et la régulation de l'expression des facteurs de virulence bactérienne. En effet, le système RisAS semble requis pour la survie intracellulaire, la résistance au stress oxydatif et la persistance dans le modèle d'infection murin (Stenson et al., 2005). Il a été montré que *risA* affecte la transcription et l'expression des *vrgs*. De plus, la kinase PlrS ainsi que son régulateur de réponse influencent l'expression des gènes requis pour la persistance de *Bordetella* dans le tractus respiratoire profond et la phosphorylation de la kinase est requise pour la colonisation du tractus respiratoire par *B. bronchiseptica* (Kaut et al., 2011). Des études sont à poursuivre pour disséquer les mécanismes de régulation de la virulence de *B. pertussis*. Ces différents éléments supplémentaires rentrant en compte pour la régulation de la virulence pourront être ciblés en vue d'un développement vaccinal ou médicamenteux.

#### F. BvgS comme cible thérapeutique ?

BvgS pourrait servir de cible thérapeutique pour le développement de traitement contre la coqueluche. L'administration d'une molécule perçue par BvgS qui permettrait son inactivation serait un atout dans la lutte contre le développement de la maladie puisque les facteurs de virulence ne seraient alors plus produits. Plusieurs domaines VFT ont été référencés comme cibles pour le développement thérapeutique (cf partie III.B.6.). Le domaine VFT1 serait un bon candidat étant donné que sa fermeture affecte drastiquement l'activité de BvgS. Une molécule se fixant au niveau du domaine PAS et induisant une inactivation de BvgS serait encore plus intéressante puisqu'avec un ligand du VFT1, des mutations compensatrices induisant une réactivation de BvgS pourraient apparaître au niveau du domaine PAS ou du linker le précédant. Toutefois, pour cibler le domaine PAS, il faut prendre en compte le fait que la molécule doit parvenir dans le cytoplasme de la bactérie. Ce type de traitement pourrait en complément de la vaccination aider au non développement de la maladie ainsi que de limiter sa transmission étant donné que les facteurs de virulence ne seraient plus produits.

#### G. Etude de BvgS : les difficultés rencontrées

Lors de l'étude de BvgS, nous avons pu nous rendre compte de la subtilité des mécanismes impliqués dans le fonctionnement de ce senseur-kinase. Des modifications de BvgS, même légères, peuvent avoir un rôle drastique sur son activité. A cause de la difficulté de surproduire BvgS dans son environnement membranaire, des expériences *in vitro* n'ont malheureusement pas pu être initiées. De même, des essais de cristallisation avaient été programmés pour obtenir la structure de variants périplasmiques de BvgS, mais n'ont pas pu être réalisés puisque nous n'avons pas réussi à reproduire et améliorer les conditions de cristallisation de la protéine sauvage. Certaines études qu'on croyait prometteuses, comme par exemple la recherche de ligand pour le VFT1, se sont révélées peu concluantes. Malgré les nombreuses difficultés rencontrées et la complexité du système, nous avons réussi à apprivoiser BvgS pour que celui-ci nous livre peu à peu ses secrets...

# Perspectives



## XII. Perspectives

Différentes expériences peuvent être envisagées pour continuer la caractérisation de BvgS et l'étude de la régulation de la virulence de *Bordetella pertussis*.

Ainsi, l'étude des domaines périplasmiques de BvgS pourrait être poursuivie. Les deux domaines VFT présentent une charnière dont la structure ainsi que la composition diffèrent, avec une charnière souple pour le VFT1 favorisant sa dynamique et une charnière rigide pour le VFT2. Des modifications des résidus de ces charnières pour assouplir l'une ou rigidifier l'autre pourraient être réalisées. Sur base des VFT de transport, qui se ferment suite à la fixation d'un ligand, nous pourrions déterminer les résidus à substituer. Les deux types de charnières pourraient également être échangés entre les domaines VFT. Les phénotypes des mutants seraient étudiés *in vivo* chez *B. pertussis* et en parallèle des expériences de résonance paramagnétique électronique permettraient de déterminer la dynamique des domaines.

Le domaine VFT2 présente des boucles riches en résidus polaires ou chargés qui pourraient s'appuyer sur la membrane plasmique. Le remplacement de ces résidus chargés par des résidus neutres ou de courtes délétions permettraient de déterminer le rôle de ces résidus dans la transduction de signal pour tester l'hypothèse d'un mouvement de levier des domaines VFT2 sur la membrane.

La recherche de ligands pour le domaine VFT1 sera poursuivie grâce à notre souche à régulation inversée  $\Delta$ PAS 65 en testant des banques plus larges de molécules, ainsi que des lysats cellulaires, des lavages broncho-alvéolaires, des broyats d'organes murins (poumons, trachées)... Les analyses d'infection de cellules seront poursuivies dans différents modèles cellulaires (cf partie X. F.2.b.), afin de déterminer le microenvironnement responsable de la variation de phase. Des analyses biochimiques (TSA, thermophorèse ...) pourront être effectuées avec les potentiels ligands déjà déterminés et ceux qui le seront, pour identifier le site de fixation du modulateur et les constantes de dissociation. En effet, avec notre système de crible, il se pourrait que la molécule se fixe au niveau du VFT1, du VFT2, de leurs interfaces, mais également au niveau des différents coiled coil. Les analyses d'interactions ligand-protéine seront donc réalisées sur la protéine périplasmique recombinante dimérique et sur chaque domaine VFT isolé, dans le but de déterminer le site de fixation de la molécule. Des essais de co-cristallisation pourront être entrepris. A défaut de structure cristallographique, des analyses de 'docking' pourront être réalisées pour aider au choix des résidus à cibler en vue de déterminer ceux impliqués dans la fixation du modulateur.

L'étude de la transduction d'information des domaines périplasmiques jusqu'à la kinase pourra être poursuivie en continuant les analyses d'accessibilité des cystéines déjà initiées, pour déterminer si la transmission d'information au niveau du segment transmembranaire s'effectue par des mouvements de piston symétrique. Des analyses de cysteine scanning pourront aussi être réalisées pour des mutants particuliers comme pour le mutant BvgS<sup>fl</sup><sub>1690C</sub> qui présente une régulation inversée. D'autres substitutions du résidu Ile<sub>690</sub> pourront aider à comprendre ce qui cause la régulation inversée de cette protéine (hydrophobicité du résidu, encombrement stérique ...). Des combinaisons de mutations pourraient également être

réalisées en vue de comprendre le fonctionnement du mutant à régulation inversée BvgS<sup>fl</sup><sub>1690C</sub> et pour déterminer les règles de la transduction de signal au sein de BvgS.

Sur base de la structure cristallographique du domaine PAS récemment obtenue des analyses de dynamique moléculaire et la construction d'un modèle *in silico* aideront à l'identification de nouvelles positions pour réaliser des analyses de cysteine scanning. La recherche de ligands du domaine PAS sera poursuivie et les résidus potentiellement impliqués dans la fixation du ligand déterminés suite à des essais de co-cristallisation ou grâce à la technique de docking, seront ciblés par mutagenèse et les conséquences de ces modifications sur l'activité de BvgS seront déterminées *in bacterio*. Des analyses de thermophorèse et d'ITC seront réalisées pour déterminer des constantes de dissociation. Si un ligand est identifié, des études de résonance paramagnétique électronique sur la protéine PAS recombinante ligandée ou non seront utiles pour caractériser les mouvements du domaine PAS dans la signalisation de BvgS. Ces différentes analyses permettront de compléter l'étude de la topologie/dynamique déjà initiée et ainsi d'aider à la détermination des différentes interfaces du domaine PAS et des changements de structure quaternaires qui s'effectuent pour transmettre l'information au coiled coil sous-jacent.

Pour poursuivre la caractérisation de notre souche chimérique à régulation inversée,  $\Delta$ PAS 65, des analyses de cysteine scanning du coiled coil seront réalisées en parallèle sur le mutant  $\Delta$ PAS 65 et sur le mutant actif et hypersensible,  $\Delta$ PAS 64. D'autres mutagenèses seront réalisées pour permettre le renforcement différentiel des deux registres du coiled coil, la modification de la composition ou de la taille de certains mutants. De nouvelles chimères pourront également être construites pour déterminer d'autres éléments nécessaires à la régulation ou pour tester certaines de nos hypothèses.

Des analyses de transcriptomique pourraient être réalisées sur les souches à régulation inversée pour déterminer les changements dans le profil de transcription des gènes de *B. pertussis*. Des expérimentations en modèle animal permettront de déterminer la colonisation et la survie des mutants à régulation inversée. Pour mettre en évidence qu'une modulation phénotypique a lieu chez l'animal, des expérimentations de bioluminescence sur modèle murin pourraient être mises au point avec une souche à régulation inversée émettant de la luminescence après l'activation de BvgS.

Ces différentes expériences permettront d'apporter des éléments supplémentaires à la compréhension du fonctionnement de BvgS, avec la détermination des règles de transduction de signal et de régulation qui seront applicables à la famille de BvgS.

# **Bibliographie**





- Ahuja, U., Shokeen, B., Cheng, N., Cho, Y., Blum, C., Coppola, G., Miller, J.F., 2016. Differential regulation of type III secretion and virulence genes in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* by a secreted anti- $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 201600320.
- Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., Buschiazzi, A., 2009. Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16185–16190.
- Alber, T., 1992. Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 205–210.
- Ames, P., Zhou, Q., Parkinson, J.S., 2008. Mutational analysis of the connector segment in the HAMP domain of Tsr, the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *J. Bacteriol.* 190, 6676–85.
- Anand-Srivastava, M.B., 2005. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26, 1044–1059.
- Anantharaman, V., Balaji, S., Aravind, L., 2006. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol. Direct* 1, 25.
- Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., 2005. The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J. Mol. Biol.* 351, 799–809.
- Aricò, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., Rappuoli, R., 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6671–6675.
- Armstrong, S.K., 2015. Bacterial Metabolism in the Host Environment: Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–23.
- Ashenberg, O., Keating, A.E., Laub, M.T., 2013. Helix bundle loops determine whether histidine kinases autophosphorylate in cis or in trans. *J. Mol. Biol.* 425, 1198–1209.
- Ayers, R.A., Moffat, K., 2008. Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains. *Biochemistry* 47, 12078–86.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M., Stock, J.B., 2005. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays* 28, 9–22.
- Bantscheff, M., Perraud, A L., Bock, A, Rippe, K., Weiss, V., Glocker, M., Gross, R., 2000. Structure-function relationships in the Bvg and Evg two-component phosphorelay systems. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 317–23.
- Bassinat, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P., Guiso, N., 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 68, 1934–41.
- Bauer, W.J., Luthra, A., Zhu, G., Radolf, J.D., Malkowski, M.G., Caimano, M.J., 2015. Structural characterization and modeling of the *Borrelia burgdorferi* hybrid histidine kinase Hk1 periplasmic sensor: A system for sensing small molecules associated with tick feeding. *J. Struct. Biol.* 192, 48–58.
- Beier, D., Gross, R., 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 143–152. 5
- Beier, D., Schwarz, B., Fuchs, T.M., Gross, R., 1995. In vivo characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* 248, 596–610.
- Bennett, B., Kimball, E., Gao, M., 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem.* 5, 593–599.
- Berntsson, R.P.A., Smits, S.H.J., Schmitt, L., Slotboom, D.J., Poolman, B., 2010. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* 584, 2606–2617.

- Bhate, M.P., Molnar, K.S., Goulian, M., DeGrado, W.F., 2015. Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* 23, 981–994.
- Bick, M.J., Lamour, V., Rajashankar, K.R., Gordiyenko, Y., Robinson, C. V., Darst, S.A., 2009. How to Switch Off a Histidine Kinase: Crystal Structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J. Mol. Biol.* 386, 163–177.
- Blom, J., Hansen, G. A, Poulsen, F.M., 1983. Morphology of cells and hemagglutinogens of *Bordetella* species: resolution of substructural units in fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 42, 308–317.
- Bock, A., Gross, R., 2001. The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 119–130.
- Bock, A., Gross, R., 2002. The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem* 269, 3479–3484.
- Bogdan, J.A., Nazario-larrieu, J., Sarwar, J., Alexander, P., Blake, M.S., 2001. *Bordetella pertussis* Autoregulates Pertussis Toxin Production through the Metabolism of Cysteine. *Society* 69, 6823–6830.
- Bogdanov, M., Zhang, W., Xie, J., Dowhan, W., 2005. Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM<sup>TM</sup>): Application to lipid- specific membrane protein topogenesis. *Methods* 36, 148–171.
- Borrok, M.J., Zhu, Y., Forest, K.T., Kiessling, L.L., 2009. Structure-Based Design of a Periplasmic Binding Protein Antagonist that Prevents Domain Closure. *ACS Chem Biol.* 4, 447–456.
- Boucher, P.E., Yang, M.S., Schmidt, D.M., Stibitz, S., 2001. Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *pha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 183, 536–544.
- Boulanger, A., Chen, Q., Hinton, D.M., Stibitz, S., 2013. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol Microbiol* 88, 156–172.
- Bourret, R.B., 2010. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 142–149. d
- Buchner, S., Schlundt, A., Lassak, J., Sattler, M., Jung, K., 2015. Structural and Functional Analysis of the Signal-Transducing Linker in the pH-Responsive One-Component System CadC of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 427, 2548–2561.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S. V, 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82–88.
- Casino, P., Miguel-Romero, L., Marina, A., 2014. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat. Commun.* 5, 1–11.
- Casino, P., Rubio, V., Marina, A., 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 763–771.
- Chang, C., Tesar, C., Gu, M., Babnigg, G., Joachimiak, A., Raj Pokkuluri, P., Szurmant, H., Schiffer, M., 2010. Extracytoplasmic PAS-like domains are common in signal transduction proteins. *J. Bacteriol.* 192, 1156–1159.
- Chen, J.C., Liu, J.H., Hsu, D.W., Shu, J.C., Chen, C.Y., Chen, C.C., 2015. Methylatable signaling helix coordinated inhibitory domain in sensor kinase modulates environmental stress response in *Bacillus cereus*. *PLoS One* 10, 1–21.
- Chervitz, S. a, Falke, J.J., 1996. Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 93, 2545–2550.
- Cheung, J., Bingman, C. a., Reingold, M., Hendrickson, W. a., Waldburger, C.D., 2008. Crystal

- structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J. Biol. Chem.* 283, 13762–13770.
- Cheung, J., Hendrickson, W.A., 2009. Structural Analysis of Ligand Stimulation of the Histidine Kinase NarX. *Structure* 17, 190–201.
- Chu, B.C.H., Chan, D.I., Dewolf, T., Periole, X., Vogel, H.J., 2014. Molecular dynamics simulations reveal that apo-HisJ can sample a closed conformation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 82, 386–398.
- Chu, B.C.H., Vogel, H.J., 2011. A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport. *Biol. Chem.* 392, 39–52.
- Cohen, C., Parry, D.A., 1986.  $\alpha$ -Helical coiled coils — a widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 11, 245–248.
- Coote, J.G., 1991. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2493–2503.
- Cotter, P.A., Dirita, V.J., 2000. BACTERIAL VIRULENCE GENE REGULATION: An Evolutionary Perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 519–65.
- Cotter, P.A., Jones, A.M., 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 11, 367–373.
- Cotter, P.A., Miller, J.F., 1994. BvgAS-mediated signal transduction: Analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect. Immun.* 62, 3381–3390.
- Cotter, P.A., Miller, J.F., 1997. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol. Microbiol.* 24, 671–85.
- Crane, J., Lilly, A., Randall, L., 2010. Characterization of interactions between proteins using site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy. Crane JM, Lilly AA, Randall LL. *Methods Mol Biol.* 2010 ;619:173-90. *Methods Mol Biol.* 619, 173–90.
- Crépin, S., Chekabab, S.M., Le Bihan, G., Bertrand, N., Dozois, C.M., Harel, J., 2011. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 153, 82–88.
- Croasdale, R., Ivins, F.J., Muskett, F., Daviter, T., Scott, D.J., Hardy, T., Smerdon, S.J., Fry, A.M., Pfuhl, M., 2011. An Undecided Coiled Coil: THE LEUCINE ZIPPER OF Nek2 KINASE EXHIBITS ATYPICAL CONFORMATIONAL EXCHANGE DYNAMICS. *J. Biol. Chem.* 286, 27537–27547.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A., Miller, J.F., 2006. Species- and Strain-Specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella* BvgAS. *Journal of Bacteriology* 188, 1775–1785.
- Curran, A.R., Engelman, D.M., 2003. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 412–417.
- Cusanovich, M.A., Meyer, T.E., 2003. Photoactive yellow protein: A prototypic PAS domain sensory protein and development of a common signaling mechanism. *Biochemistry* 42, 4759–4770.
- Cybulski, L.E., Ballering, J., Moussatova, A., Inda, M.E., Vazquez, D.B., Wassenaar, T.A., de Mendoza, D., Tieleman, D.P., Killian, J.A., 2015. Activation of the bacterial thermosensor DesK involves a serine zipper dimerization motif that is modulated by bilayer thickness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 6353–6358.
- Cybulski, L.E., Mendoza, D. De, 2011. Playing with transmembrane signals. *Communicative & Integrative Biology* 4:1, 69-71.
- Dago, A.E., Schug, A., Procaccini, A., Hoch, J.A., Weigt, M., Szurmant, H., 2012. Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and

- mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E1733–E1742.
- Decker, K.B., James, T.D., Stibitz, S., Hinton, D.M., 2012. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiol.* 158, 1665–1676.
- Deora, R., 2002. Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J. Bacteriol.* 184, 6942–6951.
- Derzelle, S., Ngo, S., Namane, A., Kunst, F., Danchin, A., Bertin, P., 2004. AstR – AstS, a new two-component signal transduction system, mediates swarming, adaptation to stationary phase and phenotypic variation in *Photobacterium luminescens*. *Microbiol.*, 150, 897–910.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A., Mooi, F.R., 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.* 1, 0373–0383.
- Diensthuber, R.P., Bommer, M., Gleichmann, T., Möglich, A., 2013. Full-Length Structure of a Sensor Histidine Kinase Pinpoints Coaxial Coiled Coils as Signal Transducers and Modulators. *Structure* 21, 1127–1136.
- Dupré, E., Herrou, J., Lensink, M.F., Wintjens, R., Vagin, A., Lebedev, A., Crosson, S., Villeret, V., Loch, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2015a. Virulence Regulation with Venus Flytrap Domains: Structure and Function of the Periplasmic Moiety of the Sensor-Kinase BvgS. *PLOS Pathog.* 11, e1004700.
- Dupré, E., Lesne, E., Guérin, J., Lensink, M.F., Verger, A., de Ruyck, J., Brysbaert, G., Vezin, H., Loch, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2015b. Signal Transduction by BvgS Sensor Kinase. *J. Biol. Chem.* 290, 23307–23319.
- Dupré, E., Wohlkonig, A., Herrou, J., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., Antoine, R., 2013. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiol.* 13, 172.
- Dutta, A., Shrivastava, I.H., Sukumaran, M., Greger, I.H., Bahar, I., 2012. Comparative Dynamics of NMDA- and AMPA-Glutamate Receptor N-Terminal Domains. *Structure* 20, 1838–1849.
- Dutta, R., Qin, L., Inouye, M., 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* 34, 633–640.
- Dwyer, M.A., Hellinga, H.W., 2004. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 495–504.
- Eby, J.C., Gray, M.C., Mangan, A.R., Donato, G.M., Hewlett, E.L., 2011. Role of CD11b/CD18 in the process of intoxication by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 80, 850–9.
- Eguchi, Y., Utsumi, R., 2014. Alkali metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 196, 3140–3149.
- Eilers, M., Patel, A.B., Liu, W., Smith, S.O., 2002. Comparison of helix interactions in membrane and soluble alpha-bundle proteins. *Biophys. J.* 82, 2720–36.
- Eldering, G., Kendrick, P., 1937. *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *J. Bacteriol.* 35, 561–572.
- Falke, J.J., Erbse, A.H., 2009. The Piston Rises Again. *Structure* 17, 1149–1151.
- Felder, C.B., Graul, R.C., Lee, Y., Merkle, H.P., Sadee, W., 1999. The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci* 1, E2.
- Feng, Z., Ma, S., Hu, G., Xie, X.-Q., 2015. Allosteric Binding Site and Activation Mechanism of Class C G-Protein Coupled Receptors: Metabotropic Glutamate Receptor Family. *AAPS J.* 17, 737–753.

- Ferhat, M., 2008. RPE (Resonance Paramagnetique Electronique) : Applications biomédicales. *Les Technol. Lab.* 10, 10–15.
- Ferris, H.U., Coles, M., Lupas, A.N., Hartmann, M.D., 2014. Crystallographic snapshot of the *Escherichia coli* EnvZ histidine kinase in an active conformation. *J. Struct. Biol.* 186, 376–9.
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 136–169.
- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L.L., Bateman, A., 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34, D247–D251.
- Finn, T.M., Stevens, L. a., 1995. Tracheal colonization factor: A *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.* 16, 625–634.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J.D., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C., Samama, J.P., 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* 3, 417–424.
- Friedman, A.M., Fischmann, T.O., Steitz, T.A., 1995. Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* 268, 1721–7.
- Fukami-kobayashi, K., Tateno, Y., Nishikawa, K., 1999. Domain Dislocation : a Change of Core Structure in Periplasmic Binding Proteins in their Evolutionary History. *J. Mol. Biol.* 286, 279–290.
- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y., Nishikawa, K., 2003. Parallel evolution of ligand specificity between LacI/GalR family repressors and periplasmic sugar-binding proteins. *Mol. Biol. Evol.* 20, 267–277.
- Galperin, M.Y., 2006. Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* 188, 4169–4182.
- Galperin, M.Y., 2010. Diversity of Structure and Function of Response Regulator Output Domains. *Curr Opin Microbiol* 13, 150–159.
- Gao, R., Stock, A.M., 2009. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu Rev Microbiol* 63, 133–154.
- Garcia, D., Watts, K.J., Johnson, M.S., Taylor, B.L., 2016. Delineating PAS-HAMP interaction surfaces and signalling-associated changes in the aerotaxis receptor Aer. *Mol. Microbiol.* 100, 156–172.
- Gáspári, Z., Nyitray, L., 2011. Coiled coils as possible models of protein structure evolution. *Biomol. Concepts* 2, 199–210.
- Gerharz, T., Reinelt, S., Kaspar, S., Scapozza, L., Bott, M., 2003. Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA. *Biochemistry* 42, 5917–5924.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J., Mooi, F.R., 1996. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect. Immun.* 64, 2657–65.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A., 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 7, 3997–4004.
- Glekas, G.D., Foster, R.M., Cates, J.R., Estrella, J. a., Wawrzyniak, M.J., Rao, C. V., Ordal, G.W., 2010. A PAS domain binds asparagine in the chemotaxis receptor McpB in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 285, 1870–1878.
- Goldberg, S.D., Clinthorne, G.D., Goulian, M., DeGrado, W.F., 2010. Transmembrane polar interactions are required for signaling in the *Escherichia coli* sensor kinase PhoQ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 8141–8146.

- Gouw, D. De, Serra, D.O., Jonge, M.I. De, Hermans, P.W.M., Wessels, H.J.C.T., Zomer, A., Yantorno, O.M., Diavatopoulos, D.A., Mooi, F.R., 2014. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg. Microbes Infect.* 3.
- Goyard, S., Bellalou, J., Mireau, H., Ullmann, A., 1994. Mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* Gene That Confer Altered Expression of the *flaB* Gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 5163–5166.
- Gross, R., Keidel, K., Schmitt, K., 2010. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 155–63.
- Gruber, M., Lupas, A.N., 2003. Historical review: another 50th anniversary--new periodicities in coiled coils. *Trends Biochem. Sci.* 28, 679–85.
- Guiso, N., 2009. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1565–9.
- Guiso, N., Wirsing von König, C.H., Forsyth, K., Tan, T., Plotkin, S.A., 2011. The Global Pertussis Initiative: Report from a Round Table Meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine* 29, 1115–1121.
- Gutu, A.D., Wayne, K.J., Sham, L.T., Winkler, M.E., 2010. Kinetic Characterization of the WalRKSpn (VicRK) Two-Component System of *Streptococcus pneumoniae*: Dependence of WalKSpn (VicK) Phosphatase Activity on Its PAS Domain. *J. Bacteriol.* 192, 2346–2358.
- Halavaty, A.S., Moffat, K., 2013. Coiled-coil dimerization of the LOV2 domain of the blue-light photoreceptor phototropin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. Sect. F* 1316–1321.
- Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Locht, C., Brennan, M.J., 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* 62, 5010–5019.
- Harper, S.M., Christie, J.M., Gardner, K.H., 2004. Disruption of the LOV – J  $\alpha$  Helix Interaction Activates Phototropin Kinase Activity Disruption of the LOV - J R Helix Interaction Activates Phototropin Kinase Activity. *Biochemistry* 43, 16184–16192.
- Hartmann, M.D., Ridderbusch, O., Zeth, K., Albrecht, R., Testa, O., Woolfson, D.N., Sauer, G., Dunin-Horkawicz, S., Lupas, A.N., Alvarez, B.H., 2009. A coiled-coil motif that sequesters ions to the hydrophobic core. *Proc. Natl. AcadSci. U.S.A.* 106, 16950–16955.
- Harvill, E.T., Preston, A., Cotter, P. a, Andrew, G., Maskell, D.J., Miller, J.F., Allen, A.G., 2000. Multiple Roles for *Bordetella* Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection Multiple Roles for *Bordetella* Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection 68, 6720–6728.
- Hazenbos, W.L., Geuijen, C.A., van den Berg, B.M., Mooi, F.R., van Furth, R., 1995. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J. Infect. Dis.* 171, 924–9.
- He, X.L., Dukkupati, A., Wang, X., Garcia, K.C., 2005. A new paradigm for hormone recognition and allosteric receptor activation revealed from structural studies of NPR-C. *Peptides* 26, 1035–1043.
- Heininger, A., Yusuf, R., Lawrence, R.J., Draheim, R.R., 2016. Identification of transmembrane helix 1 (TM1) surfaces important for EnvZ dimerisation and signal output. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 1868–1875.
- Henry, J.T., Crosson, S., 2011. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and Structural Context. *Annu Rev Microbiol* 65, 261–286.
- Herrmann, J.R., Fuchs, A., Panitz, J.C., Eckert, T., Unterreitmeier, S., Frishman, D., Langosch, D., 2010. Ionic interactions promote transmembrane helix-helix association depending on sequence context. *J. Mol. Biol.* 396, 452–461.

- Herrou, J., Bompard, C., Wintjens, R., Dupre, E., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2010. Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17351–17355.
- Herrou, J., Crosson, S., 2012. Function, structure, and mechanism in bacterial photosensory LOV proteins. *Nat Rev Microbiol* 9, 713–723.
- Herrou, J., Debie, A.-S., Willery, E., Renaud-Mongénie, G., Renaud-Mongénie, G., Locht, C., Mooi, F., Jacob-Dubuisson, F., Antoine, R., 2009. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* 4, e6996.
- Hewlett, E.L., 1997. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, S78–84.
- Ho, W.W., Li, H., Eakanunkul, S., Tong, Y., Wilks, A., Guo, M., Poulos, T.L., 2007. Holo- and apo-bound structures of bacterial periplasmic heme-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 35796–35802.
- Hoersch, D., Otto, H., Joshi, C.P., Borucki, B., Cusanovich, M.A., Heyn, M.P., 2007. Role of a conserved salt bridge between the PAS core and the N-terminal domain in the activation of the photoreceptor photoactive yellow protein. *Biophys. J.* 93, 1687–99.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B. a, Hankinson, O., 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954–958.
- Hsieh, Y., Wanner, B., 2010. Global regulation by the seven-component P i signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 198–203.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., Coles, M., 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126, 929–40.
- Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F., Cotter, P. a., 2010. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect. Immun.* 78, 2901–2909.
- Inda, M.E., Vandenbranden, M., Fernández, A., de Mendoza, D., Ruysschaert, J.-M., Cybulski, L.E., 2014. A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 3579–84.
- Jacob-Dubuisson, F., Wintjens, R., Herrou, J., Dupre, E., Antoine, R., 2012. BvgS of Pathogenic *Bordetellae*: A Paradigm for Sensor kinases with Venus Flytrap Perception Domains., in: *Two Component System in Bacteria*, R. Gross, and D. Beier, Eds. (Caister Academic Press). pp. 57–83.
- Javadpour, M.M., Eilers, M., Groesbeek, M., Smith, S.O., 1999. Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys. J.* 77, 1609–1618.
- Johnson, M.D., Bell, J., Clarke, K., Chandler, R., Pathak, P., Xia, Y., Marshall, R.L., Weinstock, G.M., Loman, N.J., Winn, P.J., Lund, P.A., 2014. Characterization of mutations in the PAS domain of the EvgS sensor kinase selected by laboratory evolution for acid resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 93, 911–927.
- Jones, A.M., Boucher, P.E., Williams, C.L., Stibitz, S., Cotter, P. a, 2005. Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 58, 700–13.
- Kandt, C., Xu, Z., Tieleman, D.P., 2006. Opening and closing motions in the periplasmic vitamin B12 binding protein BtuF. *Biochemistry* 45, 13284–13292.
- Kaut, C.S., Duncan, M.D., Kim, J.Y., Maclaren, J.J., Cochran, K.T., Julio, S.M., 2011. A novel sensor kinase is required for *Bordetella bronchiseptica* to colonize the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 79, 3216–3228.



- Kelly, D.J., Thomas, G.H., 2001. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea [Review]. *FEMS Microbiol.Rev.* 25, 405–424.
- Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., Moffat, K., 2007. Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: Signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry* 46, 3614–3623.
- Khorchid, A., Ikura, M., 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 307–312.
- Killian, J.A., Von Heijne, G., 2000. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429–434. d
- Kim, J.R., Cho, K.H., 2006. The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in *E. coli* realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises. *Comput. Biol. Chem.* 30, 438–444.
- Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Eguchi, Y., Yanagihara, S., Edahiro, K., Inoue, Y., Taniguchi, M., Yoshida, M., Yamamoto, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Utsumi, R., Koike, T., 2015. Functional Characterization of the Receiver Domain for Phosphorelay Control in Hybrid Sensor Kinases. *PLoS One* 10, e0132598.
- Knapp, S., Mekalanos, J.J., 1988. Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 170, 5059–5066.
- Kumauchi, M., Kaledhonkar, S., Philip, A.F., Wycoff, J., Hara, M., Li, Y., Xie, A., Hoff, W.D., 2010. A conserved helical capping hydrogen bond in PAS domains controls signaling kinetics in the superfamily prototype photoactive yellow protein. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15820–30.
- Lacey, B.W., 1960. Antigenic modulation of *Haemophilus pertussis*. *J Gen Microbiol* 58, 57–93.
- Lai, Y., Lin, G., Yang, S., Chang, H., Peng, H., 2003. Identification and characterization of KvgAS , a two-component system in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 121–126.
- Lamberti, Y. a, Hayes, J.A., Perez Vidakovics, M.L., Harvill, E.T., Rodriguez, M.E., 2010. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 78, 907–13.
- Lamberti, Y., Hilario, J., Surmann, K., Valdez, H., Holubova, J., Ve, B., Sebo, P., Schmidt, F., Völker, U., Eugenia, M., 2016. Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages. *J. Proteomics* 136, 55–67.
- Lawlor, M.S., Hsu, J., Rick, P.D., Miller, V.L., 2005. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol. Microbiol.* 58, 1054–1073.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., Brennan, M.J., 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 345–9.
- Lemmin, T., Soto, C.S., Clinthorne, G., DeGrado, W.F., Dal Peraro, M., 2013. Assembly of the transmembrane domain of *E. coli* PhoQ histidine kinase: implications for signal transduction from molecular simulations. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1002878.
- Leslie, P.H., Gardner, A.D., 1931. The Phases of *Haemophilus pertussis*. *J. Hyg.* 31, 423–34.
- Lesne, E., Krammer, E.-M., Dupre, E., Loch, C., Lensink, M.F., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2016. Balance between Coiled-Coil Stability and Dynamics Regulates Activity of BvgS Sensor Kinase in *Bordetella*. *MBio* 7, 1–10.
- Li, E., Wimley, W.C., Hristova, K., 2012. Transmembrane helix dimerization: Beyond the search for sequence motifs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 183–193.
- Libster, R., Edwards, K., 2012. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines* 11, 1331–46.

- Little, R., Slavny, P., Dixon, R., 2012. Influence of PAS Domain Flanking Regions on Oligomerisation and Redox Signalling By NifL. *PLoS One* 7, e46651.
- Liu, J., Yang, J., Wen, J., Yang, Y., Wei, X., Zhang, X., Wang, Y.-P., 2014. Mutational analysis of dimeric linkers in peri- and cytoplasmic domains of histidine kinase DctB reveals their functional roles in signal transduction. *Open Biol.* 4, 140023.
- Locher, K.P., 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 426–431.
- Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2001. Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 82–9.
- Locht, C., Coutte, L., Mielcarek, N., 2011. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J.* 278, 4668–4682.
- Locht, C., Mielcarek, N., 2014. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert Rev. Vaccines* 12, 1–12.
- Locht, C., Mielcarek, N., 2012. New pertussis vaccination approaches: En route to protect newborns? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 121–133.
- Lopez, M.M., 1954. The genus Bordetella. *Rev. Sanid. Hig. Publica (Madr).* 28, 247–260.
- Lowe, E.C., Baslé, A., Czjzek, M., Firbank, S.J., Bolam, D.N., 2012. A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a Bacteroides hybrid two-component system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7298–303.
- Luker, K.E., Tyler, a N., Marshall, G.R., Goldman, W.E., 1995. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol. Microbiol.* 16, 733–43.
- Lupas, A., 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 375–382.
- Lupas, A N., Gruber, M., 2005. The structure of a-helical coiled coils. *Adv. Protein. Chem.* 70, 37–78.
- Manetti, R., Aricò, B., Rappuoli, R., Scarlato, V., 1994. Mutations in the linker region of BvgS abolish response to environmental signals for the regulation of the virulence factors in Bordetella pertussis. *Gene* 150, 123–127.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2001. Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABA(B) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14643–14648.
- Marina, A., Waldburger, C.D., Hendrickson, W.A., 2005. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* 24, 4247–4259.
- Martín, C., Etxaniz, A., Uribe, K.B., Etxebarria, A., González-Bullón, D., Arlucea, J., Goñi, F.M., Aréchaga, J., Ostolaza, H., 2015. Adenylate Cyclase Toxin promotes bacterial internalisation into non phagocytic cells. *Sci. Rep.* 5, 1–16.
- Martínez de Tejada, G., Miller, J.F., Cotter, P. a, 1996. Comparative analysis of the virulence control systems of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica. *Mol. Microbiol.* 22, 895–908.
- Martinez De Tejada, G.M., Cotter, P. a., Heining, U., Camilli, A., Akerley, B.J., Mekalanos, J.J., Miller, J.F., 1998. Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of Bordetella pertussis is required for respiratory infection in mice. *Infect. Immun.* 66, 2762–2768.
- Martinez-wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W., Camilli, A., 2008. The Vibrio cholerae Hybrid Sensor Kinase VieS Contributes to Motility and Biofilm Regulation by Altering the Cyclic Diguanylate Level . *Journal of bacteriology* 190, 6439–6447.
- Marvin, J.S., Hellinga, H.W., 2001. Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling. *Nat. Struct. Biol.* 8, 795–798.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Uden, G., 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing

Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 910–938.

Mason, E., Henderson, M.W., Scheller, E. V., Byrd, M.S., Cotter, P.A., 2013. Evidence for phenotypic bistability resulting from transcriptional interference of *bvgAS* in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 90, 716–733.

Mason, J.M., Arndt, K.M., 2004. Coiled coil domains: Stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem* 5, 170–176.

Masure, H.R., 1992. Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6521–6525.

Matamouros, S., Hager, K.R., Miller, I., 2015. HAMP Domain Rotation and Tilting Movements Associated with Signal Transduction in the PhoQ Sensor Kinase 6, 1–12.

Matthews, E.E., Zoonens, M., Engelman, D.M., 2006. Dynamic Helix Interactions in Transmembrane Signaling. *Cell* 127, 447–450.

Mattoo, S., Cherry, J.D., 2005. Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies Molecular Pathogenesis , Epidemiology , and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Su. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 326–382.

Mayer, M.L., 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440, 456–462.

McClain, D.L., Gurnon, D.G., Oakley, M.G., 2002. Importance of potential interhelical salt-bridges involving interior residues for coiled-coil stability and quaternary structure. *J. Mol. Biol.* 324, 257–270.

Mechaly, A.E., Sassoon, N., Betton, J.-M., Alzari, P.M., 2014. Segmental helical motions and dynamical asymmetry modulate histidine kinase autophosphorylation. *PLoS Biol.* 12, e1001776.

Meier, M., Stetefeld, J., Burkhard, P., 2010. The many types of interhelical ionic interactions in coiled coils - An overview. *J. Struct. Biol.* 170, 192–201.

Meinhardt, S., Manley, M.W., Becker, N.A., Hessman, J.A., Maher, L.J., Swint-Kruse, L., 2012. Novel insights from hybrid LacI/GalR proteins: Family-wide functional attributes and biologically significant variation in transcription repression. *Nucleic Acids Res.* 40, 11139–11154.

Melton, A.R., Weiss, A.A., 1993. Characterization of Environmental Regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 61, 807–815.

Melvin, J. a, Scheller, E. V, Miller, J.F., Cotter, P. a, 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 12, 274–288.

Merkel, T.J., Stibitz, S., 1995. Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 177, 2727–36.

Meyerson, J.R., Kumar, J., Chittori, S., Rao, P., Pierson, J., Bartesaghi, A., Mayer, M.L., Subramaniam, S., 2014. Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature* 514, 328–334.

Mielcarek, N., Debrue, A.S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A. Ben, Creusy, C., Engle, J., Goldman, W.E., Loch, C., 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2, 0662–0670.

Miller, J.F., Johnson, S.A., Black, W.J., Beattie, D.T., Mekalanos, J.J., Falkow, S., 1992. Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* gene. *J. Bacteriol.* 174, 970–979.

Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., Shiro, Y., 2000. Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 301, 415–31.

- Möglich, A., Ayers, R.A., Moffa, K., 2009a. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure* 17, 1282–1294.
- Möglich, A., Ayers, R.A., Moffat, K., 2009b. Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *J. Mol. Biol.* 385, 1433–1444.
- Möglich, A., Moffat, K., 2007. Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA. *J. Mol. Biol.* 373, 112–126.
- Moitra, J., Szilák, L., Krylov, D., Vinson, C., 1997. Leucine is the most stabilizing aliphatic amino acid in the d position of a dimeric leucine zipper coiled coil. *Biochemistry* 36, 12567–73.
- Molnar, K.S., Bonomi, M., Pellarin, R., Clinthorne, G.D., Gonzalez, G., Goldberg, S.D., Goulian, M., Sali, A., DeGrado, W.F., 2014. Cys-Scanning Disulfide Crosslinking and Bayesian Modeling Probe the Transmembrane Signaling Mechanism of the Histidine Kinase, PhoQ. *Structure* 22, 1239–1251.
- Mondéjar, L.G., Lupas, A., Schultz, A., Schultz, J.E., 2012. HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenylyl cyclase as a reporter. *J. Biol. Chem.* 287, 1022–1031.
- Monzel, C., Degreif-Dünnwald, P., Gröpper, C., Griesinger, C., Unden, G., 2013. The cytoplasmic PASC domain of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: Role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *Microbiologyopen* 2, 912–927.
- Monzel, C., Unden, G., 2015. Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. *PNAS*. 122, 11042–11047 |
- Moore, B.S., Mirshahi, U.L., Ebersole, T.L., Mirshahi, T., 2013. A conserved mechanism for gating in an ionotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 18842–18852.
- Moore, J.O., Hendrickson, W.A., 2009. Structural Analysis of Sensor Domains from the TMAO-Responsive Histidine Kinase Receptor TorS. *Structure* 17, 1195–1204.
- Mougel, C., Zhulin, I.B., 2001. CHASE: An extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* 26, 582–584.
- Mueller, B.K., Subramaniam, S., Senes, A., 2014. A frequent, GxxxG-mediated, transmembrane association motif is optimized for the formation of interhelical C $\alpha$ -H hydrogen bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E888–95.
- Mulligan, C., Fischer, M., Thomas, G.H., 2011. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 68–86.
- Nakamura, M.M., Liew, S.Y., Cummings, C. a., Brinig, M.M., Dieterich, C., Relman, D. a., 2006. Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 74, 5537–5548.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K. a, Crews, S.T., 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157–1167.
- Nan, B., Liu, X., Zhou, Y., Liu, J., Zhang, L., Wen, J., Zhang, X., Su, X.D., Wang, Y.P., 2010. From signal perception to signal transduction: Ligand-induced dimeric switch of DctB sensory domain in solution. *Mol. Microbiol.* 75, 1484–1494.
- Neiditch, M.B., Federle, M.J., Pompeani, A.J., Kelly, R.C., Swem, D.L., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2006. Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing. *Cell* 126, 1095–1108.
- Nicoletti, F., Bruno, V., Ngomba, R.T., Gradini, R., Battaglia, G., 2015. Metabotropic glutamate receptors as drug targets : what ’ s new ? *Curr. Opin. Pharmacol.* 20, 89–94.
- O’Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T., 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a

two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254, 539–544.

Oh, B.H., Pandit, J., Kang, C.H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G.F., Kim, S.H., 1993. Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* 268, 11348–11355.

Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K., Koshland, D.E., 1999. A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* 285, 1751–1754.

Pandini, A., Bonati, L., 2005. Conservation and specialization in PAS domain dynamics. *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 127–137.

Pantoliano, M.W., Petrella, E.C., Kwasnoski, J.D., Lobanov, V.S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. a, Lane, P., Salemme, F.R., 2001. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.* 6, 429–440.

Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J.F., Sebahia, M., Bentley, S.D., Parkhill, J., Harvill, E.T., 2012. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics* 13, 545.

Parkinson, J.S., Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., 2015. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends Microbiol.* 23, 257–266.

Parry, D. a D., Fraser, R.D.B., Squire, J.M., 2008. Fifty years of coiled-coils and  $\alpha$ -helical bundles: A close relationship between sequence and structure. *J. Struct. Biol.* 163, 258–269.

Perraud, A L., Rippe, K., Bantscheff, M., Glocker, M., Lucassen, M., Jung, K., Sebald, W., Weiss, V., Gross, R., 2000. Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1478, 341–54.

Perraud, A.L., Kimmel, B., Weiss, V., Gross, R., 1998. Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C- terminal HPt domains of the sensor proteins. *Mol. Microbiol.* 27, 875–887.

Perry, S., Shearer, N., Little, R., Dixon, R., 2005. Mutational analysis of the nucleotide-binding domain of the anti-activator NifL. *J. Mol. Biol.* 346, 935–949.

Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D., Steinhoff, H.J., 1999. Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 287, 163–71.

Philip, A.F., Kumauchi, M., Hoff, W.D., 2010. Robustness and evolvability in the functional anatomy of a PER-ARNT-SIM (PAS) domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 17986–17991.

Pin, J.P., Kniazeff, J., Binet, V., Liu, J., Maurel, D., Galvez, T., Duthey, B., Havlickova, M., Blahos, J., Prézeau, L., Rondard, P., 2004. Activation mechanism of the heterodimeric GABA B receptor. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1565–1572.

Planamente, S., Vigouroux, A., Mondy, S., Nicaise, M., Faure, D., More, S., 2010. A Conserved Mechanism of GABA Binding and Antagonism Is Revealed by Structure-Function Analysis of the Periplasmic Binding Protein Atu2422 in *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of biological chemistry* 285, 30294–30303.

Podgornaia, A.I., Laub, M.T., 2013. Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 156–162.

Ponting, C.P., Aravind, L., 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.* 7, R674–R677.

Porter, J.F., Connor, K., Donachie, W., 1994. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* 140, 255–261.

- Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., Masure, H.R., 1993. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 61, 2780–5.
- Prugnola, A., Aricò, B., Manetti, R., Rappuoli, R., Scarlato, V., 1995. Response of the *bvg* regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures and short-term temperature shifts. *Microbiology* 141, 2529–34.
- Pusztai, Z., Joó, I., 1967. The role of the serologic type in experimental immunity against *B. Pertussis*. *Prog. Immunobiol. Stand.* 3, 309–14.
- Quioco, F.A., Ledvina, P.S., 1996. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: Variation of common themes. *Mol. Microbiol.* 20, 17–25.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K., Wright, S.D., 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* 61, 1375–82.
- Rinaldi, J., Gallo, M., Klinke, S., Paris, G., Bonomi, H.R., Bogomolni, R. A., Cicero, D.O., Goldbaum, F. A., 2012. The  $\beta$ -scaffold of the LOV domain of the brucella light-activated histidine kinase is a key element for signal transduction. *J. Mol. Biol.* 420, 112–127.
- Roberts, M., Fairweather, N.F., Leininger, E., Pickard, D., Hewlett, E.L., Robinson, A., Hayward, C., Dougan, G., Charles, I.G., 1991. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol. Microbiol.* 5, 1393–404.
- Robinson, V.L., Buckler, D.R., Stock, A.M., 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* 7, 626–633.
- Rogers, E.A., Terekhova, D., Zhang, H., Hovis, K.M., Marconi, R.T., 2009. Rrp1, a cyclic-di-GMP-producing response regulator, is an important regulator of *Borrelia burgdorferi* core cellular functions. *Mol Microbiol* 71, 1551–1573.
- Rondard, P., Goudet, C., Kniazeff, J., Pin, J.P., Pr??zeau, L., 2011. The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology* 60, 82–92.
- Rowatt, E., 1957. The Growth of *Bordetella pertussis*: a Review. *J. gen. Microb.* 17, 297–326.
- Roy, C.R., Falkow, S., 1991. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J. Bacteriol.* 173, 2385–2392.
- Saita, E.A., Abriata, L., Tsai, Y.T., Trajtenberg, F., Lemmin, T., Buschiazzo, A., Peraro, M.D., de Mendoza, D., Albanesi, D., 2015. A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK. *Mol. Microbiol.* 1–14.
- Salazar, M.E., Laub, M.T., 2015. Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 7–14.
- Samanta, D., Borbat, P.P., Dzikovski, B., Freed, J.H., Crane, B.R., 2015. Bacterial chemoreceptor dynamics correlate with activity state and are coupled over long distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2, 2455–2460.
- Scarlato, V., Prugnola, a, Aricó, B., Rappuoli, R., 1990. Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6753–6757.
- Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.F., Ebert-Jung, A., Basché, T., Erker, W., Unden, G., 2012. CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *In vivo*. *J. Bacteriol.* 194, 636–645.

- Schneider, B., Gross, R., Haas, A., 2000. Phagosome Acidification Has Opposite Effects on Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 68, 7039–7048.
- Senes, A., Engel, D.E., DeGrado, W.F., 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 465–79.
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C., Becker, S., 2008. A Ligand-Induced Switch in the Periplasmic Domain of Sensor Histidine Kinase CitA. *J. Mol. Biol.* 377, 512–523.
- Shi, R., McDonald, L., Cygler, M., Ekiel, I., 2014. Coiled-Coil Helix Rotation Selects Repressing or Activating State of Transcriptional Regulator DhaR. *Structure* 22, 478–487.
- Shi, R., Proteau, A., Wagner, J., Cui, Q., Purisima, E.O., Matte, A., Cygler, M., 2009. Trapping open and closed forms of FitE - A group III periplasmic binding protein. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 75, 598–609.
- Slavny, P., Little, R., Salinas, P., Clarke, T. a., Dixon, R., 2010. Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 75, 61–75.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., Gouaux, E., 2009. X-ray structure of AMPA-subtype glutamate receptor: symmetry and mechanism. *Nature* 462, 745–756.
- Stefanelli, P., Fazio, C., Fedele, G., Spensieri, F., Ausiello, C.M., Mastrantonio, P., 2009. A natural pertactin deficient strain of *Bordetella pertussis* shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol.* 32, 159–166.
- Steffen, P., Goyard, S., Ullmann, A., 1996. Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 15, 102–9.
- Stenson, T.H., Allen, A.G., Al-Meer, J.A., Maskell, D., Pepler, M.S., 2005. *Bordetella pertussis* *risA*, but not *risS*, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect. Immun.* 73, 5995–6004.
- Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D., Falkow, S., 1988a. The vir locus and phase - variation in *Bordetella pertussis*. *Tokai J Exp Clin Med.* 1988;13 13, 223–6.
- Stibitz, S., Weiss, A.A., Falkow, S., 1988b. Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous hemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus *vir*. *J. Bacteriol.* 170, 2904–2913.
- Stibitz, S., Yang, M.S., 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 173, 4288–96.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000a. Two-component signal transduction. *Reactions* 69, 183–215.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000b. Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem* 69, 183–215.
- Straussman, R., Ben-Ya'acov, A., Woolfson, D.N., Ravid, S., 2007. Kinking the coiled coil--negatively charged residues at the coiled-coil interface. *J. Mol. Biol.* 366, 1232–42.
- Swint-Kruse, L., Matthews, K.S., 2009. Allostery in the LacI / GalR Family : Variations on a Theme. *Curr Opin Microbiol* 12, 129–137.
- Szurmant, H., Hoch, J.A., 2010. Interaction Fidelity in Two-Component Signaling. *Curr Opin Microbiol* 13, 190–197.
- Szurmant, H., White, R. a., Hoch, J. a., 2007a. Sensor complexes regulating two-component signal



transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 706–715.

Tam, R., Saier, M.H., 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 320–46.

Tan, E., Rao, F., Pasunooti, S., Pham, T.H., Soehano, I., Turner, M.S., Liew, C.W., Lescar, J., Pervushin, K., Liang, Z.X., 2013. Solution structure of the PAS domain of a thermophilic YybT protein homolog reveals a potential ligand-binding site. *J. Biol. Chem.* 288, 11949–11959.

Taylor, B.L., Zhulin, I.B., 1999. PAS Domains : Internal Sensors of Oxygen , Redox Potential , and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 479–506.

Teese, M.G., Langosch, D., 2015. Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry.* 54, 5125–5135

Tetsch, L., Jung, K., 2009. The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol. Microbiol.* 73, 982–991.

Thalen, M., van den IJssel, J., Jiskoot, W., Zomer, B., Roholl, P., de Gooijer, C., Beuvery, C., Tramper, J., 1999. Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *J. Biotechnol.* 75, 147–159.

Thorstensson, R., Trollfors, B., Al-Tawil, N., Jahnmatz, M., Bergstrom, J., Ljungman, M., Torner, A., Wehlin, L., Van Broekhoven, A., Bosman, F., Debrie, A.S., Mielcarek, N., Loch, C., 2014. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* 9.

Trajtenberg, F., Graña, M., Ruétalo, N., Botti, H., Buschiazzi, A., 2010. Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 24892–903.

Trakhanov, S., Vyas, N.K., Luecke, H., Kristensen, D.M., Ma, J., Quijcho, F.A., 2005. Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: Trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* 44, 6597–6608.

Uhl, M.A., Miller, J.F., 1996a. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15, 1028–36.

Uhl, M.A., Miller, J.F., 1996b. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J. Biol. Chem.* 271, 33176–33180.

Uhl, M.A., Miller, J.F., 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1163–1167.

Ulrich, L.E., Koonin, E. V., Zhulin, I.B., 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 52–56.

Utsumi, R., Katayama, S., Tanabe, H., Noda, M., Taniguchi, M., Horie, T., Ikeda, M., Igaki, S., Nakagawa, H., Miwa, A., 1994. Newly identified genes involved in the signal transduction *Escherichia coli* K-12. *Gene* 140, 73–77.

van den Berg, B.M., Beekhuizen, H., Willems, R.J., Mooi, F.R., van Furth, R., 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect. Immun.* 67, 1056–62.

Vandebriel, R.J., Hellwig, S.M.M., Vermeulen, J.P., Hoekman, J.H.G., Dormans, J.A.M.A., Roholl, P.J.M., Mooi, F.R., 2003. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb. Pathog.* 35, 19–29.

Vergara-Irigaray, N., Chávarri-Martínez, A., Rodríguez-Cuesta, J., Miller, J.F., Cotter, P.A., Martínez

- de Tejada, G., 2005. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect. Immun.* 73, 748–60.
- von König, C.-H.W., 2005. Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, S66–S68.
- Walker, K.A., Obrist, M.W., Mildiner-earley, S., Miller, V.L., 2010. Identification of YsrT and Evidence that YsrRST Constitute a Unique Phosphorelay System in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology* 192, 5887–5897.
- Wang, B., Barahona, M., Buck, M., Schumacher, J., 2013. Rewiring cell signalling through chimaeric regulatory protein engineering. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1195–200.
- Wang, C., Sang, J., Wang, J., Su, M., Downey, J.S., Wu, Q., Wang, S., Cai, Y., Xu, X., Wu, J., Senadheera, D.B., Cvitkovitch, D.G., Chen, L., Goodman, S.D., Han, A., 2013. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLoS Biol.* 11, e1001493.
- Wang, L., Quan, C., Xiong, W., Qu, X., Fan, S., Hu, W., 2014. New insight into transmembrane topology of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 988–93.
- Wang, S., 2012. Bacterial Two-Component Systems : Structures and Signaling Mechanisms, in: *Protein Phosphorylation in Human Health*, Dr. Cai Huang (Ed.). pp. 439–466.
- Watanabe, T., Okada, A., Gotoh, Y., 2008. Inhibitors Targeting Two-Component Signal Transduction. *Bacterial SignalTransduction: Networksand Drug Targets*, edited by Ryutaro Utsumi. pp 229-236.
- Watts, K.J., Sommer, K., Fry, S.L., Johnson, M.S., Taylor, B.L., 2006. Function of the N-Terminal Cap of the PAS Domain in Signaling by the Aerotaxis Receptor Aer. *Journal of bacteriology* 188, 2154–2162.
- Weiss, A A, Falkow, S., 1984. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 43, 263–9.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., Falkow, S., 1983. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 42, 33–41.
- Wendelboe, A.M., Van Rie, A., Salmaso, S., Englund, J.A., 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, S58–61.
- Willems, R.J., Geuijen, C., van der Heide, H.G., Matheson, M., Robinson, a, Versluis, L.F., Ebberink, R., Theelen, J., Mooi, F.R., 1993. Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. *Mol. Microbiol.* 9, 623–34.
- Willett, J.W., Kirby, J.R., 2012. Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS Genet.* 8, e1003084.
- Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L., Nickerson, C. a, 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* 78, 216–24.
- Winnen, B., Anderson, E., Cole, J.L., King, G.F., Rowland, S.L., 2013. Role of the PAS sensor domains in the bacillus subtilis sporulation kinase KinA. *J. Bacteriol.* 195, 2349–2358.
- Winnen, B., Hvorup, R.N., Saier, M.H., 2003. The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Res. Microbiol.* 154, 457–465.
- Witan, J., Monzel, C., Scheu, P.D., Uden, G., 2012. The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: Two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biol. Chem.* 393, 1291–1297.
- Woolfson, B.D.N., 2005. THE DESIGN OF COILED-COIL STRUCTURES AND ASSEMBLIES I . *Introduction to Protein Design. Advances* 70, 79–112.

- Wright, G.A., Crowder, R.L., Draheim, R.R., Manson, M.D., 2011. Mutational analysis of the transmembrane helix 2-HAMP domain connection in the *Escherichia coli* aspartate chemoreceptor Tar. *J. Bacteriol.* 193, 82–90.
- Yamada, S., Sugimoto, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H., Shiro, Y., 2009. Structure of PAS-Linked Histidine Kinase and the Response Regulator Complex. *Structure* 17, 1333–1344.
- Yu, D., Ma, X., Tu, Y., Lai, L., 2015. Both piston-like and rotational motions are present in bacterial chemoreceptor signaling. *Sci. Rep.* 5, 8640.
- Zayner, J.P., Antoniou, C., Sosnick, T.R., 2012. The amino-terminal helix modulates light-activated conformational changes in AsLOV2. *J. Mol. Biol.* 419, 61–74.
- Zhang, S.-Q., Kulp, D.W., Schramm, C.A., Mravic, M., Samish, I., DeGrado, W.F., 2015. The membrane- and soluble-protein helix-helix interactome: similar geometry via different interactions. *Structure* 23, 527–41.
- Zhu, S., Stroebel, D., Yao, C.A., Taly, A., Paoletti, P., 2013. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 477–85.
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R., 1997. PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22, 331–333.
- Zoltowski, B.D., Crane, B.R., 2008. Light activation of the LOV protein Vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry.* 47, 7012–7019.
- Zoltowski, B.D., Vaccaro, B., Crane, B.R., 2009. Mechanism Based Tuning of a LOV Domain Photoreceptor. *Nat Chem Biol.* 5, 827–834.



*Bordetella pertussis* est l'agent responsable de la coqueluche. Pour coloniser le tractus respiratoire humain, cette bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, produit de nombreux facteurs de virulence dont l'expression est sous la dépendance du système à deux composants BvgAS. BvgS est un senseur-kinase dimérique. Chaque monomère est constitué de trois domaines putatifs de perception - deux domaines Venus flytrap périplasmiques et un domaine PAS cytoplasmique -, suivis du domaine enzymatique et deux autres domaines, de phospho-transfert et receveur, impliqués dans la cascade de phosphorylation. L'expression du régulon de virulence est activée suite à la phosphorylation par BvgS du régulateur de réponse BvgA. BvgS est en mode kinase à l'état basal, et la perception de basses températures ou de signaux chimiques comme les ions sulfate ou nicotinate permet son passage en mode phosphatase. L'étude présentée dans ce manuscrit vise à caractériser le senseur-kinase BvgS en analysant les domaines putatifs de perception ainsi que la transduction de signal qui s'effectue au sein de la molécule.

L'étude de la portion périplasmique a permis de mettre en évidence, à l'état basal, un gradient de dynamique décroissant. En se fixant au domaine VFT2 proximal à la membrane, le nicotinate induirait une diminution de la dynamique du second lobe du VFT1 grâce à la formation d'un bloc compact entre le domaine VFT2 et le deuxième lobe du domaine VFT1. Cette rigidification exercerait une tension sur les hélices  $\alpha$  qui précèdent les segments transmembranaires, provoquant une transition de la portion cytoplasmique vers l'état phosphatase. La perception de modulateurs par le domaine VFT2 - ou possiblement la fixation d'un ligand dans la cavité du VFT1- modifierait cette dynamique et induirait le changement d'activité de BvgS. Ainsi, nous proposons un modèle dans lequel le VFT1 est considéré comme le moteur du système, lui impulsant une dynamique qui serait relayée ou atténuée par le domaine VFT2. Une recherche de ligands antagonistes pour le domaine VFT1 a été entreprise, selon l'idée que la fixation d'un ligand réduirait la dynamique de ce dernier.

Au sein du dimère, des connecteurs prédits pour former des enroulements d'hélices  $\alpha$  ('coiled coils') relient entre eux les domaines VFT et PAS, et les domaines PAS et kinase de BvgS. La transduction d'information entre les domaines périplasmiques et le site enzymatique de BvgS a été analysée par mutagenèse dirigée et 'cysteine scanning'. Des contacts proches sont observés entre les hélices constituant le segment transmembranaire, qui ne semblent pas être modifiés après perception de modulateur. Nous suggérons donc un modèle de piston symétrique pour la transmission d'information au travers de la membrane. Le coiled coil putatif précédant le domaine PAS présente une certaine dynamique rotationnelle à l'état basal. La perception de modulateurs semble induire l'écartement de ces hélices, ce qui pourrait permettre un changement de l'interface des domaines PAS. L'étude de la topologie du domaine PAS confirme une modification de cette interface entre les modes kinase et phosphatase de BvgS. Enfin, le coiled coil reliant les domaines PAS et kinase est sujet à une forte dynamique rotationnelle à l'état basal, en accord avec un modèle de régulation de l'activité kinase proposé dans d'autres systèmes. Suite à la perception de modulateur, une rigidification marquée de ce coiled coil est observée, permettant le passage en mode phosphatase. L'existence de deux états dynamiques différents de ce coiled coil a également été mise en évidence en absence du domaine PAS.

Ces études ont permis d'avancer dans la compréhension de BvgS et de proposer un modèle de la signalisation au sein de ce senseur-kinase, qui pourrait s'appliquer aux autres membres de la famille de BvgS.