HAL
open science

Implication du système de sécrétion de type VI de la souche Pseudomonas fluorescens MFE01 dans l'activité antibactérienne, la formation de biofilm et l'inhibition de mobilité.

Mathias Gallique

To cite this version:

Mathias Gallique. Implication du système de sécrétion de type VI de la souche Pseudomonas fluorescens MFE01 dans l'activité antibactérienne, la formation de biofilm et l'inhibition de mobilité.. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR087 . tel-01953457

HAL Id: tel-01953457

https://theses.hal.science/tel-01953457v1

Submitted on 13 Dec 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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Implication du système de sécrétion de type VI de la souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 dans l'activité antibactérienne, la formation de biofilm et l'inhibition de mobilité

Présentée et soutenue par
Mathias GALLIQUE

Thèse soutenue publiquement le 12 Décembre 2017 devant le jury composé de		
Catherine SANTAELLA	Chargée de Recherche, Aix-Marseille Université	Rapporteur
Sophie BLEVES	Professeur d'Université, Aix-Marseille Université	Rapporteur
Eric CASCALES	Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université	Examinateur
Alain GIVAUDAN	Directeur de Recherche, Université de Montpellier 2	Examinateur
Pierre CORNELIS	Professeur Emérite, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Marc FEUILLOLEY	Professeur d'Université, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Annabelle MERIEAU	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Annabelle MERIEAU, Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement LMSM EA4312, Université de Rouen Normandie

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

EdNBISE Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

LMSM

Et voilà … la thèse se finit. Une page se tourne, une autre s'ouvre. Quatre ans (thèse et master)… Oui déjà quatre ans passés à vos côtés, quatre ans de bons souvenirs. Le temps passe vraiment vite en fait. Merci à tous pour cette expérience inoubliable. Croyez-moi, vous avez tous contribué au bon déroulement de ma thèse. Inutile de vous dire que je rigole tout seul devant mon clavier en me rappelant diverses anecdotes (non ne vous inquiétiez pas, je ne sors pas de dossiers compromettants !). Si mes remerciements sont longs, c'est tout simplement que je tiens à vous remercier chacun comme il se doit !

Je remercie très sincèrement le professeur Marc Feuilloley, directeur du LMSM pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et pour m'avoir fait confiance durant toutes ces années. Je tiens à te remercier pour l'organisation des repas de labo, qui apportent une véritable convivialité au labo.

Ma thèse a été entièrement financée par une allocation régionale. Un grand merci au Grand Réseau de Recherche Chimie-Biologie-Santé qui a financé mes trois années de thèse.

J'ai conscience qu'être membre d'un jury de thèse demande de consacrer un temps précieux, malgré un agenda chargé ! Par conséquent, je tiens à remercier très sincèrement tous les membres du jury pour leur disponibilité : Catherine Santaella, Sophie Bleves, Eric Cascales, Alain Givaudan, Pierre Cornelis, Marc Feuilloley et Annabelle Merieau. Encore un grand merci à vous d'avoir accepté d'être présents et de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. J'espère que vous prendrez un grand plaisir à lire ma thèse et à découvrir le fruit de mes trois années doctorales.

Un énorme merci à Annabelle Merieau, pour m'avoir encadré pendant 4 ans, depuis le stage de master 1 jusqu'à la thèse. Tu m'as fait confiance durant toutes ces années. Je te remercie pour ton encadrement, ta disponibilité (à ces nombreuses réunions improvisées dans le couloir du labo !) mais également pour ta bonne humeur constante, pour m'avoir appris beaucoup de choses (je pense notamment au test oxydase qui nous a bien sauvé ce jour-là !) mais surtout de m'avoir supporté pendant toutes ces années (eh oui le matin je suis grognon !). Bref, je suis vraiment reconnaissant de l'encadrement et des compétences que tu as partagé à travers ces quatre années passées au LMSM. Il faut bien l'avouer, tu la vends très bien MFE01 ! Un énorme merci à toi !

Je remercie très sincèrement Artemis Kosta, responsable de la plateforme de Microscopie de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM, FR 3479) qui a consacrée de nombreuses heures sur l'acquisition d'images des différents mutants ! Un grand merci pour ces magnifiques images de flagelles. Et oui, voir pour la première fois sa petite bactérie que l'on a nourrie, choyée et côtoyée pendant des années, c'est tout simplement merveilleux !

Je remercie très profondément Eric Cascales ainsi que toute son équipe, pour m'avoir accueilli pendant deux mois au sein du Cascales lab à Marseille ! Merci à Laureen, Maxence, Nicolas, Laure, Eric (Durand), Ignacio. Ça a été une grande expérience pour moi et je n'ai manqué de rien, vous avez été aux petits soins. J'ai vraiment bien été intégré par les membres du labo et je sais faire du double hybride maintenant (j'ai quand même été émerveillé quand ça s'est « illuminé » !). Bref, vraiment une superbe collaboration, je garde d'excellents souvenirs. Et puis là-bas, les calanques, le Soleil, la mer, le bonheur quoi ! Sugiton me manque !

Coco, vraiment je ne sais pas comment tu fais pour avoir autant de patience et de gentillesse. Ma thèse ne se serait jamais aussi bien déroulée si tu n'avais pas été là. Tu es toujours prête à rendre service, même si tu as une manip en cours ! Un énorme merci pour ta bonne humeur tout au long de l'année, tes précieux conseils et ton implication dans mon projet de thèse. Grâce à toi, j'ai pu avancer d'avantage, merci à toi. J'en profite également pour remercier Yoan Konto-Ghiorghi pour son investissement dans notre projet et sa contribution à la recherche de promoteurs au sein du génome.

Merci aussi aux discussions et conseils sur la transciptomique, je pense notamment à Rachel, Oliver, Sylvie et Emeline (toute l'équipe bleue quoi !). Merci aussi aux techniciens, Olivier, Magalie, Chloé et Pierre-Jean qui ont trouvé du temps lors des commandes, les problèmes d'appareillage et de consommables ! Camille, merci pour ta gentillesse et d'avoir pensé à moi pour cette magnifique bactérie rouge pour mes p'tits dessins bactériens ! Merci à toi Cathy pour ta patience (désolé pour tous les « bah désolé j'savais pas ! », pour les dossiers administratifs, ce n'est pas du tout mon point fort).

Florie, je ne sais comment te remercier pour ta gentillesse et pour tes idées dans l'approche HPLC-MS pour l'identification de toxines et de cette future collaboration

avec ton ancien labo. C'est important d'avoir une vision par une personne externe au sujet et qui vous donne d'autres idées auxquelles vous n'aviez pas pensé !

Tout le travail que j'ai accompli n'aurait jamais pu aussi bien avancer sans l'aide des stagiaires que j'ai pu encadrer, un grand merci à vous tous. Mathilde, je ne me fais aucun souci pour l'avenir du sujet. Je te l'ai déjà dit, mais je suis vraiment content que ce soit toi qui prennes le relai, car tu as des idées et de la patience, éléments importants pour la réussite d'une thèse. Tu es une personne agréable, toujours de bonne humeur et pleine d'humour ! Et puis, sur un malentendu, on arrivera à les trouver ces toxines ! Je te confie ma prestigieuse roue à CoIP « fait-maison » que j'ai bricolé de mes propres mains, à la lueur de mon front ! Comme quoi avec des falcons, 4 vis, 1 morceau de bois et 8 épingles à linge, on peut tout faire !

La thèse n'est pas chose facile au quotidien, c'est un projet qui demande de l'investissement personnel et de la persévérance. Et les heures ne se comptent pas. La thèse n'est pas qu'une équipe doctorant – encadrant, il y a aussi les autres thésards qui contribuent indirectement à votre projet. Il est essentiel qu'une bonne ambiance soit au rendez-vous dans un labo, nous procure un soutien et nous donne l'envie d'aller encore plus loin ! Et pour ça un énorme merci à tous les maîtres de conférences, ingénieurs, post-doc et thésards qui sont ou ont été au sein de notre labo. Sans vous, ma thèse n'aurait pas été aussi conviviale.

Andréa, quel plaisir d'avoir partagé le bureau avec toi. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, tes succulents repas chinois et ta disponibilité quand j'avais besoin de faire les courses (« y'a des promos !! »). Je te souhaite une excellente fin de thèse avec de superbes articles à la clef !

Mille mercis à Damien et Mélou pour votre constante bonne humeur, les pauses, les fou-rires (craquage le Vendredi « Mikit ») et toutes les soirées passées ensemble. Mélyssa garde précieusement le livre des perles, que l'on n'oublie pas nos mythiques citations de soirée (j'avoue que j'y ai bien contribué aussi). Vous allez me manquer. Je vous souhaite une bonne continuation à tous les deux ! Merci aussi à Thomas et Valérie pour votre gentillesse, les soirées passées à vos côtés mais surtout pour ces innombrables rigolades (non non, je ne dirai pas que Thomas a des talents pour les bruits d'animaux ! Oups tant pis je l'ai dit !).

OULALA ! Un grand merci à toi Ségolène ou Ségogo ou Sigoulène (♪all the single ladies♪♫) pour ces innombrables soirées et tous ces fou-rires. « Una cerveza por favor », c'est la seule chose que l'on savait dire en espagnol (indispensable pour la survie cette phrase !). Et puis au bout de cinq jours, on l'a trouvé cette fichue fontaine bateau ! On a bien rigolé durant le séjour, sacré Antonio, toujours le mot pour rire !! Ali, tes cours d'espagnol ou les rigolades dans les couloirs, ça va me manquer, vraiment de bons souvenirs de toi, je te remercie pour ta joie et ta bonne humeur perpétuelle. « Mais t'as pas de père, toi le glyphosate » : Maximilien, tu m'as bien fait rire durant ces six mois passés avec nous. Tu as toutes les capacités pour une thèse, ce que je te souhaite par la suite d'ailleurs.

Une grande pensée aux thésards présents au début de ma thèse et qui sont partis, les personnes arrivent et d'autres repartent, ça fait partie du jeu. Merci à vous tous pour ces nombreuses rigolades, discussions, conseils et voyages aux congrès. Merci à Rachel (alias Rara ou Raraleuse comme dirait Thibault) pour ta démo sur l'extraction d'ARN et ta gentillesse. Chacha je te souhaite plein de bonheur pour ta nouvelle petite famille, Tatiana (ou Taitina, d'après Starbuck coffee) pour ce séjour inoubliable à Maastricht (et ta version de la Marseillaise au bureau), Thibault (ou Timoche) pour les rigolades et le temps passé pour la mise en place de la flow cell, Dodo et Cécé (ou la reine des neige) pour ces petits apéros en terrasse et les rigolades. Merci aussi à Awa pour ta gentillesse et tes expressions. Je dois dire que je me suis bien éclaté avec vous pendant toutes ces années! Ça fait toujours un peu vide sans vous et je vous souhaite plein de réussite dans votre carrière scientifique! J'espère vous revoir bientôt les loulous !

Victorien, milles mercis pour ton encadrement et la transmission du projet lors de mon master 2. J'ai été vraiment content d'avoir travaillé à tes côtés pendant mes deux stages de master. Je dois bien l'avouer, je me suis bien éclaté à tes côtés (rechercher les produits de labo avec les « confisquéééééé !!! », c'est vraiment plus marrant !).

Un grand merci à ma famille pour votre soutien et vos encouragements, mon frère Hugo, mon père, ma mère, ma tante Véro et mes grands-parents ! Merci à ma sister Angélina, je peux toujours compter sur toi ma princesse. Tu as une grande importance pour moi, je t'adore soeurette !

Merci aussi aux amis qui ont été à mes côtes pendant ces trois ans de thèse. Je pense notamment à Laura, avec toutes nos soirées MasterChef (rares sont les personnes m'ayant vu avec mon beau tablier de cuistot). Jeremy, on en a fait des voyages ensemble, le Connemara, Maynooth (vive le Roost !), le road trip le long de la côte Adriatique (Budva restera quand même une de mes meilleurs destinations) et partir à vélo à Brighton, que de bons souvenirs tout ça !

Une dernière phrase pour remercier tous ceux que je n'ai pas cités, et qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Je pense notamment à Nicole, Xavier, Olivier, Nathalie, Cécile, Anne, Djouar, Christian, Jeremie, Lucille, Manuella ainsi que tous ceux que j'oublie involontairement.

INTRODUCTION 17
I. Les *Pseudomonas fluorescens* et leurs rôles dans la rhizosphère 21
A. Prélude : *Pseudomonas fluorescens,* une espèce en remaniement 21
B. Scénario global: interaction entre les plantes et les rhizobactéries 22
C. Une interaction plante-bactérie hautement régulée 25
1) Implication de la cascade GacS/GacA 25
2) Quorum sensing 26
D. La compétition bactérienne par la biodisponibilité des nutriments 28
1) Les sidérophores : compétition pour la biodisponibilité du fer 28
2) Solubilisation de phosphate : compétition pour le phosphate 29
E. Les facteurs sécrétés dans la rhizosphère 30
1) Le DAPG 31
2) Exotoxines hydrolytiques de la chitine 33
3) Le cyanure d'hydrogène 36
4) Les cyclolipopeptides 37
5) Les pyocines 39
6) Et le système de sécrétion de type VI ? 43
F. Communication des bactéries vers les plantes 44
1) Production de phytohormones 44
2) Production de composants organiques volatiles 45
G. La colonisation des plantes : biofilm, flagelle et chimiotactisme 47
1) Le biofilm bactérien 47
2) Le flagelle 49
3) Le Chimiotactisme 57
H. Reconnaissance des micro-organismes par les plantes 58
1) La résistance systémique induite et résistance acquise systémique 58
2) Eliciteurs 61
II. Les Systèmes de sécrétion 62
A. Généralités 62
B. Le système de sécrétion de type VI 64
1) Historique et généralités 64
2) Le SST6, un assemblage dynamique 67
3) Régulation du SST6 chez *Pseudomonas aeruginosa* 90
4) Rôles du SST6 101
5) Reste-t-il d'autres mécanismes à découvrir ? 125
OBJECTIFS DE LA THESE 131
MATERIELS ET METHODES 135
I. Physiologie bactérienne 137

1) Composition des milieux de culture 137
2) Conditions de culture des souches bactériennes 137
3) Conservation des souches 137
4) Test de mobilité de type « swimming » 140
5) Inhibition de mobilité de type « swarming » ou « swarm killing » 140
6) Activité antibactérienne en condition solide 140
7) Test d'activité antibactérienne *in planta* sur l'endive 141
8) Test d'activité antibactérienne *in planta* sur tubercule de pommes de terre 142
9) Conjugaison bactérienne et mutagénèse 142
10) Formation de biofilm en condition statique 143
11) Formation de biofilm en condition dynamique « flow cell » 144
12) Observation de biofilm par microscopie confocale 145
13) Test statistique 145
II. Culture de cellules eucaryotes et test de cytotoxicité 146
1) Culture des cellules HaCaT 146
2) Test de cytotoxicité de la souche MFE01 sur les cellules HaCaT 146
3) Dosage de la lactate déshydrogénase des cellules HaCaT infectées 147
III. Techniques d'interaction protéine-protéine 148
1) Double hybride bactérien 148
2) Co-immunoprécipitation 149
IV. Techniques analytiques des échantillons protéiques 150
1) Analyse des protéines du surnageant de culture 150
2) Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE 150
3) Western Blot 151
4) Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie 152
5) Digestion des protéines d'intérêts extraites sur gel SDS-PAGE 152
6) Préparation de plaque pour l'analyse MALDI-TOF 153
7) Analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF 153
V. Techniques de biologie moléculaire 154
1) Annotation du génome de *P. fluorescens* MFE01 154
2) Extraction d'ADN et de plasmide 154
3) Conception des amorces et amplification par PCR 155
4) Séparation des fragments d'acide nucléique 156
5) Purification et extraction sur gel des fragments d'ADN 156
6) Digestion enzymatique et ligature 156
7) Clonage par « megaprimer » polymerase chain reaction 157
8) Vérification de la séquence nucléotidique 158
9) Transformation des souches d'*Escherichia coli* 158

10) Transformations des souches de *Pseudomonas* ... 160
VI. Transciptomique ... 160
1) Extraction des ARN totaux ... 160
2) Reverse transcriptase (RT) ou transcription inverse ... 161
3) PCR quantitative en temps réel ... 162
4) Analyse des expressions transcriptionnelles ... 163
RESULTATS ... 165
I. Article 1 ... 167
II. Article 2 ... 181
III. Mini-Revue ... 203
IV. Article 3 ... 216
DISCUSSION, RESULTATS PRELIMINAIRES ET PERSPECTIVES ... 240
I. Une seule machinerie, une panoplie de gènes *vgrG* et *hcp* ... 242
II. Le SST6 de la souche MFE01 est fortement impliqué dans l'activité antibactérienne ... 243
III. Activité de biocontrôle et moyen de lutte contre des pathogènes ... 246
IV. Implication de la protéine Hcp1 dans l'immobilisation de bactéries compétitrices ... 249
V. Implication du facteur sigma FliA dans la régulation des gènes de classe IV ... 250
VI. Effet de la mutation des gènes *hcp1* et *tssC* sur l'expression des gènes flagellaires ... 251
VII. La protéine Hcp1, transport d'au moins deux toxines ciblant l'assemblage du flagelle ... 252
VIII. Identification des toxines associées à Hcp1 ... 256
CONCLUSION ... 262
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 268
ANNEXES ... 294
I. Articles ... 296
1) Articles publiés ... 296
2) Articles en préparation ... 296
II. Communication affichée ... 296
1) Journée de l'école doctorale ... 296
2) Congrès international et posters ... 297
III. Communication orale ... 297
IV. Curriculum vitae ... 305
V. Résumé en anglais ... 306

Figure 1: Schéma des interactions entre plantes, bactéries PGPR et phytopathogènes au niveau de la rhizosphère. 22
Figure 2: Relations entre les bactéries PGPR et le système racinaire d'une plante. 23
Figure 3: Les différentes voies métaboliques impliquées dans la production d'auxine par la bactérie. 23
Figure 4: Analyse génomique comparative de différentes souches du genre *Pseudomonas*. 27
Figure 5: Voies métaboliques impliquées dans la synthèse de l'acide gluconique et l'acide 2-kétogluconique. 29
Figure 6: Les différents composants antibiotiques produits par les bactéries du genre *Pseudomonas*. 31
Figure 7: Voie métabolique pour la synthèse du DAPG. 32
Figure 8: Représentation schématique de l'acitivité catalytique des enzymes dégradant la chitine et le chitibiose. 34
Figure 9: Environnement du gène codant la toxine insecticide des souches *Pseudomonas protegens* CHAO et Pf-5. 36
Figure 10: Organisation des clusters et structure des cyclolipopeptides de type orfamide, viscosine et massetolide. 37
Figure 11: Proposition d'un modèle de la régulation de la production de massetolide chez *Pseudomonas fluorescens* SS101. 39
Figure 12: Structure de la pyocine de type R2 de *Pseudomonas aeruginosa*. 40
Figure 13: Observation par microscopie électronique à transmission de pyocines de type F2 de *P. aeruginosa*. 41
Figure 14: Schéma représentant le rôle de l'enzyme bactérienne ACC désaminase. 45
Figure 15: Voies métaboliques bactériennes impliquées dans la production de composants volatiles organiques. 46
Figure 16: Les différentes étapes de formation de biofilm bactérien. 48
Figure 17: Représentation schématique de la structure du nano-moteur flagellaire. 50
Figure 18: Régulation hiérarchique de l'expression des gènes flagellaires chez *P. aeruginosa*. 51
Figure 19: Etapes d'assemblage du flagelle de classe IV. 52
Figure 20: Interaction des sous-unités flagellaires avec l'appareil d'export. 54
Figure 21: La protéine FliD forme un complexe hexamérique chez *P. aeruginosa*. 55
Figure 22: Mécanisme d'assemblage des monomères de flagelline par la protéine de cap FliD. 56
Figure 23: Représentation de la réponse chimiotactique impliquée dans la mobilité chez *P. aeruginosa*. 59
Figure 24: Schéma des différentes résistances systémiques de la plante. 60
Figure 25: Voie de transduction de signal des diférentes résistances systèmiques d'*Arabidobsis thaliana*. 61
Figure 26: Structures de différents systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif. 63
Figure 27: Distribution phylogénétique des SST6. 65
Figure 28: Comparaison des structures du bactériophage et du SST6. 66
Figure 29: Mode d'assemblage du SST6. 68
Figure 30: Assemblage et structure du complexe membranaire. 69
Figure 31: Modèle du complexe membranaire durant la sécrétion de l'aiguille Hcp/VgrG. 70
Figure 32: Représentation de la séquence de *tssM* et des traductions correspondantes chez *Citrobacter rodentium*. 72
Figure 33: L'assemblage du complexe membranaire nécessite l'activité hydrolase de MltE. 73
Figure 34: Observation par microscopie électronique des « antennes » du SST6 chez *Myxococcus xanthus*. 74
Figure 35: Comparaison entre les structures du complexe basal du bactériophage T4 et celui du SST6. 75
Figure 36: Les différents types d'assemblage des hexamères d'Hcp chez *Escherichia coli* EAEC. 76
Figure 37: Observation par microscopie électronique de TssA associée au complexe membranaire. 76
Figure 38: Synthèse des interactions entre les différents composants du SST6 chez *E. coli* EAEC. 78
Figure 39: Comparaison entre les structures de la pointe du bactériophage T4 et de VgrG. 80
Figure 40: Structure tridimensionnelle du complexe $(gp5)_3$-$(gp27)_3$ et du trimère de VgrG1. 81
Figure 41: Importance du SST6 de *Vibrio cholerae* lors de la phagocytose. 82
Figure 42: La protéine à motif PAAR s'associe avec le trimère VgrG. 83
Figure 43: La gaine TssBC entourant le tube interne d'Hcp. 84
Figure 44: Structure du complexe TssA d'*E. coli* EAEC. 84
Figure 45: Superposition du complexe TssA sur l'extrémité distale de la gaine. 85
Figure 46: Les différents modèles possibles d'assemblage de la queue contractile par TssA. 85
Figure 47: La protéine TssA1 de *P. aeruginosa* serait localisée au niveau du complexe basal. 86
Figure 48: Observation par microscopie électronique du SST6 à l'état détendu et contracté. 87
Figure 49: Mode de contraction du bactériophage A511. 88
Figure 50: Modèle du recyclage de la gaine. 89
Figure 51: Modèle du recrutement de ClpV par le domaine N-terminale de TssB chez *P. aeruginosa*. 89
Figure 52: Organisation génomique des différents clusters de SST6 chez *P. aeruginosa*. 90
Figure 53: Schéma représentant la régulation des gènes par le facteur sigma RpoN. 91
Figure 54: Modèle d'action du répresseur Fur. 93
Figure 55: Régulation de la transition entre les modes de vies de *P. aeruginosa*. 95
Figure 56: Modèle représentant la voie de signalisation HptB chez *P. aeruginosa*. 96
Figure 57: Modèle du mécanisme PARA (*Pseudomonas aeruginosa* response to antagonism). 97
Figure 58: Prédiction des sites de liaison de RsmA sur les ARNm. 97
Figure 59: Systèmes à deux composants et c-di-GMP dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. 98
Figure 60: Régulation post-traductionnelle du H1-T6SS par la voie de phosphorylation des thréonines. 100
Figure 61: Découvertes chronologiques des diverses espèces bactériennes possédant une activité bactéricide *via* le SST6.. 101
Figure 62: Les principaux rôles du SST6. 102
Figure 63: Structure et fonction des toxines délivrées par le SST6 ciblant le peptidoglycane. 105
Figure 64: Activité des effecteurs de type lipase sur les phospholipides. 112
Figure 65: Importance du SST6 dans la protection de l'intestin de la souris contre la colonisation d'agents pathogènes. 112
Figure 66: Action de PldA et PldB sur le remodelage du cytosquelette d'actine des cellules eucaryotes. 115

Figure 67: Modèle du transport des ions manganèse chez *Burkholderia thailandensis*. 117
Figure 68: Mécanisme d'action de TseF dans l'acquisition d'ion ferrique. 119
Figure 69: Schéma du mode d'action de *V. cholerae* dans l'acquisition d'ADN par transfert horizontal 121
Figure 70: Le SST6 et le système d'import d'ADN de *Vibrio cholerae* sont co-régulés par trois protéines. 122
Figure 71: Les différents systèmes contractiles connus. 125
Figure 72: Mécanisme d'action des différentes structures contractiles. 127
Figure 73: Représentation des structures des SST6 ainsi que les systèmes contractiles extracellulaires (eCIS). 128
Figure 74: Représentation du protocole du test d'activité antibactérienne. 141
Figure 75: Système de chambre en flux « flow cell ». 145
Figure 76: Organisation génomique du cluster SST6 et des opérons *hcp* de la souche *P. fluorescens* MFE01. 243
Figure 77: Schéma explicatif de l'activité antibactérienne exercée par les toxines associées à Hcp3. 244
Figure 78: Schéma explicatif de la mise en évidence des protéines d'immunité des toxines associées à Hcp3. 245
Figure 79: Rôles probables du SST6 et réseau d'interactions plante-bactérie et bactérie-bactérie dans la rhizosphère. 248
Figure 80: Les différentes interactions entre les protéines VgrG et l'adaptateur Tec1. 253
Figure 81: Mobilité et séparation des protéines du surnageant des souches MFE01, MFE01Δ*tec1* et MFE01Δ*vgrG1*. 254
Figure 82: Observation par microscopie électronique à transmission de MFE01 et MFE01Δ*tec1*. 254
Figure 83: Modèle d'action des toxines associées à Hcp1 sur l'inhibition de mobilité d'une bactérie compétitrice. 256
Figure 84: Proposition d'un modèle d'action des toxines associées à Hcp1 et Tec1. 257
Figure 85: Les effecteurs jouent un rôle crucial dans la compétition et l'adaptation. 265

Tableau 1: Composition des milieux de culture 137
Tableau 2: Liste des souches utilisées 138
Tableau 3: Liste des plasmides 139
Tableau 4: Liste des amorces utilisées pour la mutagénèse 143
Tableau 5: Listes des amorces utilisées pour le BACTH 148
Tableau 6: composition du tampon de réhydratation 150
Tableau 7: Composition des gels SDS-PAGE utilisés au cours de ce travail 151
Tableau 8: Composition de la solution de trypsinolyse 152
Tableau 9: Amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'ADN d'intérêts 155
Tableau 10: Mix réactionnel et cycle PCR utilisés pour amplifier des fragments d'acide nucléique 156
Tableau 11: Mix réactionnel et cycle PCR utilisés pour le deuxième cycle PCR « Megaprimer » 158
Tableau 12: Composition de la solution de TSB 159
Tableau 13: Composition de la solution de KCM 5X 159
Tableau 14: Mix réactionnel et cycle de la RT-PCR 161
Tableau 15: Amorces utilisée pour l'étude de l'expression des gènes en qRT-PCR 162

AAA: ATPases Associated with various cellular Activities

ABA: Acide Abscissique

ACC: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate

ACD: Actin Crosslinking Domain

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ADPRT: Adenosine Diphosphate-Ribosyltransferase

AFP: Anti-Feeding Prophage

AHT: Anhydrotétracycline

AMP: Adénosine Mono Phosphate

AmrZ: Alginate and motility regulator Z

Ap: Ampicilline

APEC: Avian Pathogenic *Escherichia coli*

ARN: Acide Ribonucléique

BACTH: Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system

BDC: Composant dérivé de bactérie

BFT: *Bacteroides fragilis* toxin

BICAM: Bicarbonate de soude

C-di-GMP : Diguanylate mono-phosphate cyclique

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate

CLP: Cyclopeptide

ClpV: Caseinolytic peptidase V

CM: Membrane cytoplasmique

CW: Clockwise

CCW: Counterclockwise

DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern

DAPG: 2,4-diacetylphloroglucinol

DEPC: Diéthyl pyrocarbonate

DGC: Diguanylate cyclase

DMDS: Dimethyl Disulfide

DMEM: milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO: Densité optique

Duf: Domaine à function inconnue

EAEC: *Escherichia coli* Entéro-Agrégative

EBP: Enhancer Binding Protein

ECF: Fonction extracytoplasmique

eCIS: extracellular Contractile Injection System

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

EF-Tu: Elongation Factor Thermounstable

EPS: Exopolysaccharide

ET: éthylène

ETBF: *Bacteroides fragilis* Entéro-Toxigénique

ETEC: *Escherichia coli* Entéro-Toxigénique

FBS: Fur Binding Site

Fha1: Forkhead-associated protein

Fit: *Pseudomonas fluorescens* insecticidal toxin

Fur: Ferric uptake regulator

GA: Gibbérelline

Gac: Global antibiotic and cyanide control

Gad: Gluconate déshydrogénase

Gcd: Glucose déshydrogénase

GFP: Green Fluorescent Protein

GlcNAc: N-Acétyl-D-Glucosamine

Gm: Gentamycine

H1-T6SS: Hcp secretion island-I-encoded type VI secretion system of *P. aeruginosa*

HaCaT*:* Human adult low Calcium Temperature

HAP: Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HBB: Hook Basal Body

HCCA: Acide α-Cyano-4-Hydroxycinnamique

HCD*:* High Cell Density

HCl: acide chloridrique

HCN: Cyanure d'hydrogène

Hcp: Haemolysin-coregulated protein

Hcp-ET: Haemolysin coregulated protein with C-terminal Extension Toxin

HGT: Transfert de Gènes Horizontal

HPLC: Chromatographie Liquide sous Haute Pression

Hpt: Histidine phototransfert protein

HSL: Homosérine Lactone

IAA: Acide indole-3-Acetique

IcmF: Intracellular multiplication protein F

Ids: Identification of self

IHF: Integration Host Factor

IM: Membrane interne

Imp: Impaired in nitrogen fixation

IPTG: Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside

IQS: Integrated Quorum Sensing

ISR: Résistance Systémique Induise

JA: Acide Jasmonique ou Jasmonate

Km: kanamycine

LadS: Lost adherence

LB: milieu Luria Bertani

LDH: Lactate Déshydrogénase

LPS: Lipopolysaccharide

LTG: Lytic Transglycosylase

MAC: Metamorphosis-Associated Contractile structure

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

MAMP: Microbe-Associated Molecular Pattern

MAPG: Monoacetylphloroglucinol

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP: Methyl-accepting Chemotaxis Protein

MCS: Casset de Multiclonage

mDAP: acide méso-Diaminopimélique

MFS: Majeur Facilitator Superfamily

MMBL: Monocot Mannose-Binding Lectins

MOI: Multiplicity Of Infection

mRNA: ARN messager

MS: Spectrométrie de Masse

MTA: Methylthiol Acetate

MTI: MAMP-Triggered Immunity

MurNAc: N-Acétyl-Muramique

MvfR: Multiple virulence factor Regulator

NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NRPS: Nonribosomal Peptides Synthetase

NTBF: Non-Toxigenic *Bacteroides fragilis*

OB: Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding

OM: Membrane externe

OMP: Protéine de membrane externe

OMV: Vésicule de membrane externe

ORF: Open Reading Frame

P: Périplasme

PA: acide phosphatique

PAAR*:* Proline Alanine Alanine Arginine

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern

PARA: *Pseudomonas aeruginosa* Response to Antagonism

PBS: tampon phosphate salin

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDE: Phosphodiestérase

PG: Phloroglucinol

PGAP1: Post-Glycosylphosphatidylinositol Attachment to Proteins 1

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PGPF: Plant Growth Promoting Fungi

PhI: polyketide synthase de type III

Pi: Phosphate inorganique

PLT: pyoluteorin

PMF: Peptide Mass Fingerprinting

PQS: *Pseudomonas Quinolone Signal*

PQQ: Pyrroloquinoline Quinone

PR: Pathogenesis-Related protein

PRN: Pyrrolnitrin

PRR: Pattern Recognition Receptors

PSM: Phosphate Solubilizing Microorganism

PVC: *Photorhabdus* Virulence Cassette

Q-PCR: quantitative polymerase chain reaction

QS: Quorum Sensing

RBD: Domaine de Liaison au Récepteur

RBS: Site de Liaison au Ribosome

RetS: Regulator of exopolysaccharide and type III Secretion

Rhs: Rearrangement hotspot

Rif: Rifampicine

ROS: Espèce Réactive de l'Oxygène

Rpm: Rotation par minute

rRNA: ARN ribosomique

Rsm: Regulation of secondary metabolites

RT: Reverse Transcriptase

SA: Acide Salicylique

SAM: S-Adenosyl-Methionine

SAR: Résistance Systémique Acquise

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

Sfa: Sigma factor activation

sRNA: small RNA

SST: Système de Sécrétion de Type (nommé de 1 à 9)

SST3: Système de Sécrétion de Type III

SST6: Système de Sécrétion de Type VI

STEC: Shiga Toxin-producing *E. coli*

SVF: sérum de veau fœtal

Tae: Type VI amidase effector

Tai: Type VI amidase immunity protein

Tag: Type six secretion associated gene

TAT: Twin-Arginine Translocation pathway

Tc: Tétracycline

TCA: Acide Trichloroacétique

TCST: Système à Deux Composants

Tde: Type VI secretion DNAse effector

Tdi: Type VI secretion DNAse immunity protein

Tec: T6SS effector chaperone

TFA: Acide Trifluoroacétique

Tge: Type VI glycoside hydrolase effector

Tgi: Type VI glycoside hydrolase immunity protein

Tle: Type VI lipase effector

Tli: Type VI lipase immunity protein

TlpE: Type 6 PGAP1-like Effector

Tn-seq: Transposon mutagenesis and deep sequencing

TPP: Voie de Phosphorylation des Thréonines

Tris: Tris-hydroxy-méthylamino-méthane

tRNA: ARN de transfert

Tse: Type six secretion exported protein

TseM: Type VI secretion system effector for Manganese acquisition

TseZ: Type VI secretion system effector for Zinc acquisition

Tss: Type six secretion protein

TPR: Tetratricopeptide Repeat

UAS: Sequence d'Activation en Amont

Vip: ClpV interacting protein

VgrG: Valine-glycine repeat protein G

VOC: Composant Organique Volatile

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

YezP: *Yersinia* extracellular zinc-binding Protein

INTRODUCTION

Avant-propos

Le genre *Pseudomonas* est contenu dans le phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonadales*. Migula décrit en 1894 les bactéries du genre *Pseudomonas* comme des cellules de forme allongée, mobiles et strictement aérobies (Migula, 1894). Les *Pseudomonas* sont des bacilles (droits ou légèrement incurvés) à Gram négatif, aux extrémités arrondies et d'une taille moyenne de 2 µm de long et 0,5 µm de large (Palleroni *et al.,* 1984).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires, c'est-à-dire retrouvées dans de nombreux environnements comme le sol, l'air, l'eau, les végétaux et les animaux. L'ubiquité de ces bactéries résulte de la capacité adaptatrice de ces dernières, due notamment à la présence de nombreux systèmes à deux composants. Ces systèmes permettent de percevoir les signaux environnementaux et de moduler rapidement l'expression de nombreux gènes et jouent alors un rôle essentiel pour le fitness et l'adaptation bactérienne. Les bactéries, pour coloniser et persister au sein d'une niche écologique, ont recours à différents mécanismes pour combattre les autres micro-organismes présents dans l'environnement. Parmi ces mécanismes, le système de sécrétion de type VI (SST6) est comparé à une seringue permettant l'injection de molécules toxiques et est considéré comme une arme bactérienne.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier le SST6 de la souche environnementale *Pseudomonas fluorescens* MFE01. Cette étude se focalise sur le rôle du SST6 dans l'activité antibactérienne *in vitro* et *in planta*, dans la formation de biofilm mais également sur l'impact de ce système de sécrétion sur l'assemblage du flagelle bactérien.

I. Les *Pseudomonas fluorescens* et leurs rôles dans la rhizosphère

A. Prélude : *Pseudomonas fluorescens,* une espèce en remaniement

P. aeruginosa, espèce modèle du genre *Pseudomonas*, est considérée comme un pathogène opportuniste nosocomial pouvant induire chez des patients immunodéprimés des infections pulmonaires et urinaires. Chez les grands brulés, sujets à diverses infections bactériennes, *P. aeruginosa* est responsable de 36% des infections (Revathi et al., 1998).

Exception faite de certaines souches, l'espèce *P. fluorescens* contrairement à *P. aeruginosa* regroupe des bactéries psychrotrophes, non virulentes envers l'homme. L'espèce *P. fluorescens* est ubiquitaire et est souvent retrouvée dans le sol, notamment au niveau du système racinaire des plantes (la rhizosphère). Une majorité de ces souches rhizosphériques sont bénéfiques pour la croissance des plantes et sont ainsi appelées Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Ce chapitre portera surtout sur la relation entre les différents facteurs sécrétés et le rôle de PGPR de certaines souches de *P. fluorescens* et espèces apparentées dans la protection de la plante vis-à-vis des phytopathogènes présents dans le sol.

Suite à un remaniement de la classification des *Pseudomonas fluorescens* en 2012, certaines souches ont été reclassées dans des espèces apparentées, ce qui induit l'existence d'un ensemble appelé les *Pseudomonas fluorescens* « *sensu lato* » (Bodilis et al., 2012; Loper et al., 2012). Par opposition, les *Pseudomonas fluorescens* « *sensu stricto* » sont des souches qui ont conservé leur nom d'espèce. Par exemple, *P. fluorescens* CHAO et Pf-5 ont été reclassées dans l'espèce *Pseudomonas protegens*. De manière volontaire, je parlerai plusieurs fois au cours de ce chapitre de ces souches *P. protegens* CHAO et Pf-5 comme espèces apparentées aux *Pseudomonas fluorescens*, pour illustrer les différentes stratégies des rhizobactéries dans la compétition avec des phytopathogènes et dans la colonisation de niches écologiques, caractéristiques des PGPR. Il faut également prendre en considération que certaines souches classées *P. fluorescens* avant 2012 peuvent appartenir à une autre espèce du genre *Pseudomonas* sans pour autant avoir été renommées par la suite.

B. Scénario global: interaction entre les plantes et les rhizobactéries

La plante est tributaire d'un environnement fluctuant et est exposée à la fois à des stress abiotiques (pH, osmose, carence en nutriments…) mais aussi à des stress biotiques tels que les phytopathogènes (bactéries, champignons, insectes…). Parmi les micro-organismes en contact avec la plante, se trouvent des bactéries qui peuvent être bénéfiques pour la plante et qui peuvent protéger la plante de manière indirecte, en défendant le système racinaire contre les phytopathogènes ou en induisant les défenses de la plante (figure 1).

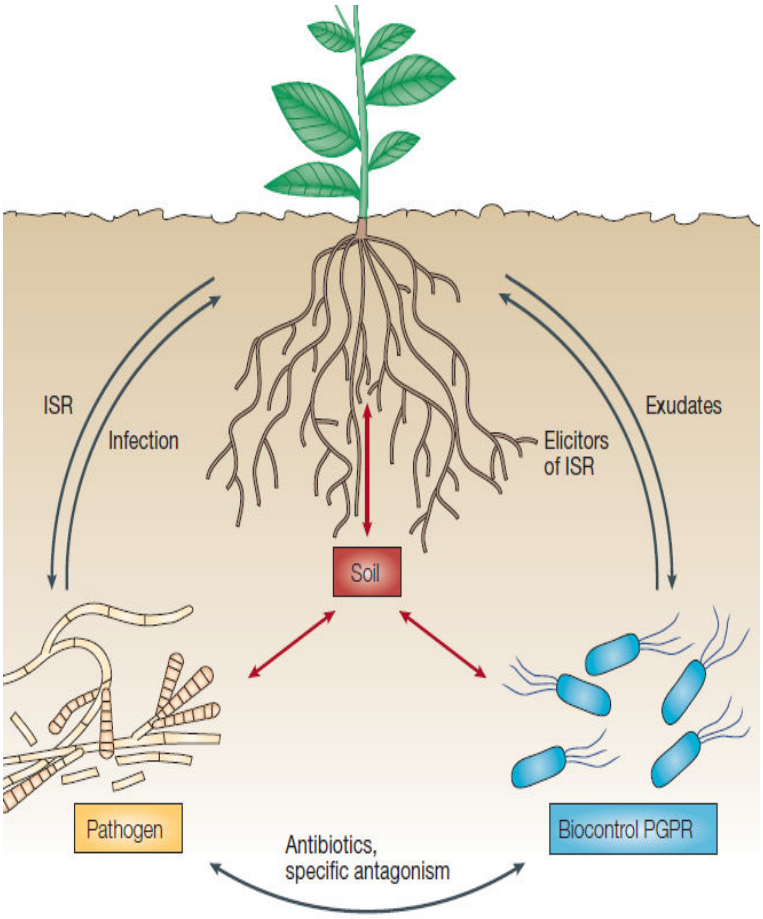


Figure 1: Schéma des interactions entre plantes, bactéries PGPR et phytopathogènes au niveau de la rhizosphère. (Haas and Défago, 2005). ISR : Résistance systémique induite et PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

Ces bactéries peuvent aussi agir de manière directe en favorisant la croissance de la plante par l'intermédiaire de production de phytohormones (Haas and Défago, 2005; Hernández-León et al., 2015) (figures 2 et 3).

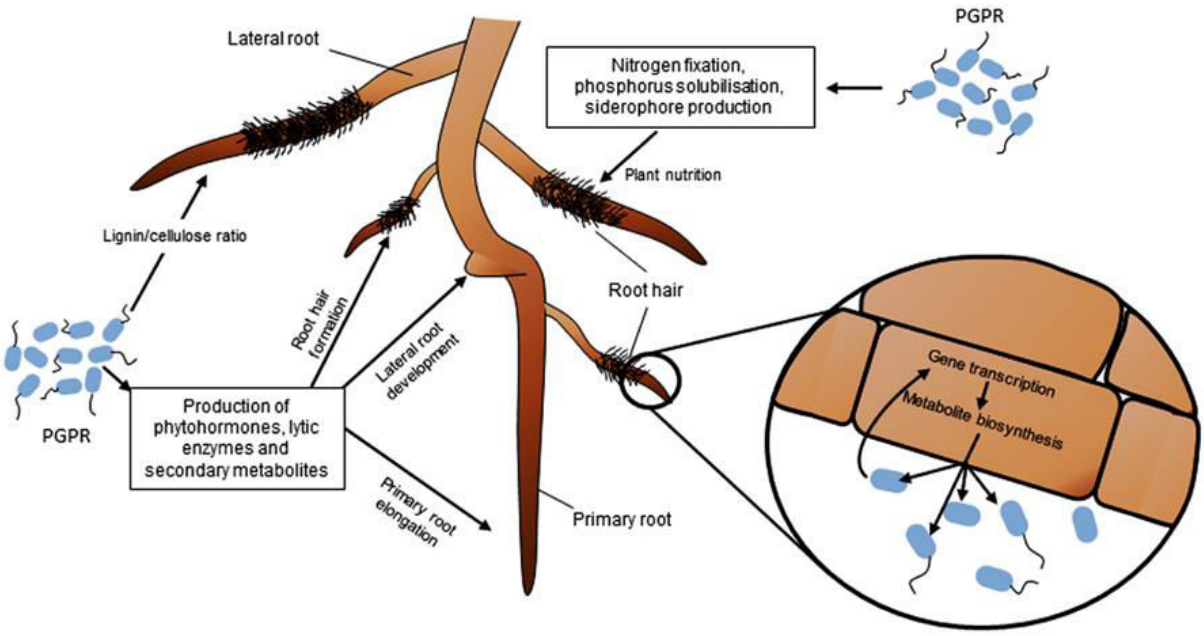


Figure 2: Relations entre les bactéries PGPR et le système racinaire d'une plante. (Vacheron et al., 2013). Les PGPR peuvent moduler la croissance de la plante (réduction du taux de croissance de la racine primaire et augmentation du nombre et de la longueur des racines latérales et des radicelles) en produisant des phytohormones, des enzymes et des métabolites secondaires. Les PGPR inflencent également la nutrition de la plante *via* la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et la production de sidérophore, modifiant ainsi la physiologie de la racine (modification de la transcription de gènes et de la biosynthèse de métabolites). PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

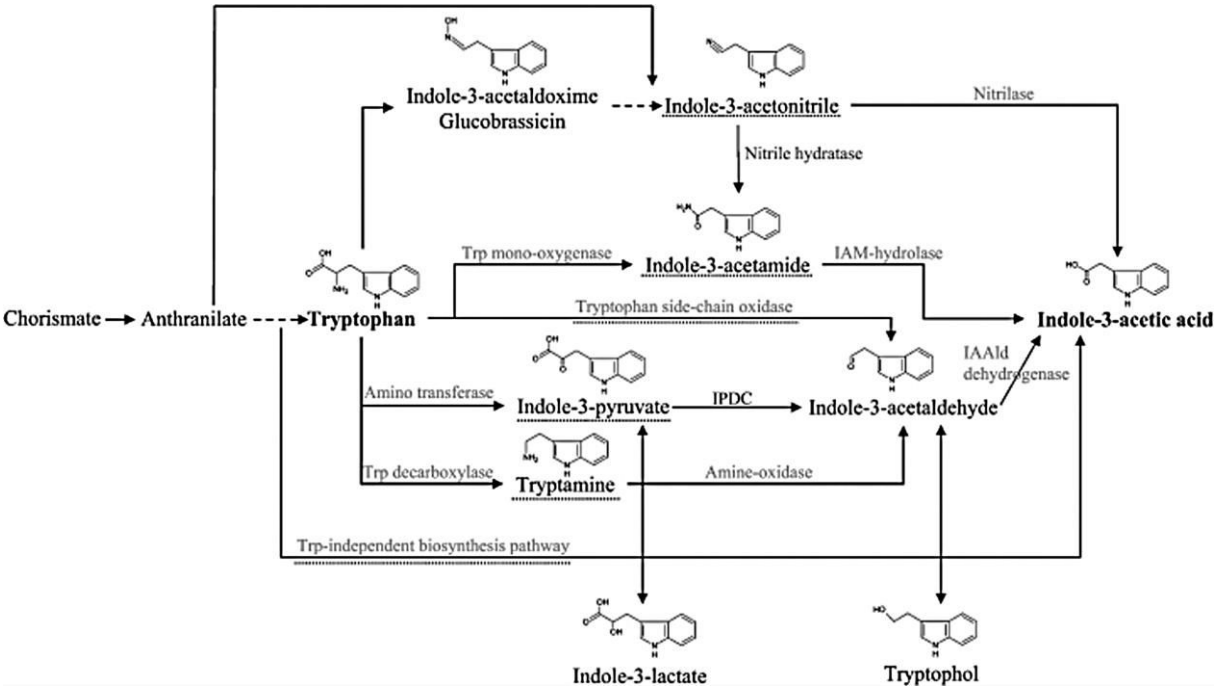


Figure 3: Les différentes voies métaboliques impliquées dans la production d'auxine par la bactérie. (Spaepen et al., 2007).

Certaines souches PGPR ont des effets néfastes sur les phytopathogènes par l'intermédiaire d'activités antifongiques, antibactériennes, voire insecticides, limitant ainsi les infections et infestations de la plante. Cette défense exercée par les PGPR peut être la conséquence de la limitation de la biodisponibilité d'éléments essentiels à la croissance des phytopathogènes (compétition vis-à-vis de cette molécule), ou de la production de composant antagoniste à large spectre ou spécifique à un phytopathogène.

La présence des PGPR peut promouvoir la résistance systémique induite de la plante (ISR, induced systemic resistance), améliorant ainsi sa protection contre un large spectre de phytopathogènes (Van der Ent et al., 2009). D'autre part, beaucoup de souches de *Pseudomonas spp.* ont la capacité de produire des phytohormones, dont l'auxine (IAA, indole-3-acetic acid), qui favorisent la croissance et le développement de la plante. Mais l'auxine est également une molécule signal qui a une influence sur le comportement bactérien (Spaepen et al., 2007).

La plante libère des exsudats riches en carbone, « attirant » les micro-organismes de la rhizosphère : des acides organiques (citrate, acétate, succinate, pyruvate…), des sucres (ribose, galactose, glucose, fructose, sucrose…) mais aussi des acides aminés, vitamines et nucléobases (Haas and Défago, 2005). La composition des exsudats peut « sélectionner » la diversité des rhizobactéries colonisatrices selon leur capacité à métaboliser ces différentes sources de carbones qui diffèrent entre les plantes (Goddard et al., 2001).

Au niveau de la rhizosphère, il existe un réseau de communication sous-terrain complexe et très dynamique. Les PGPR ayant colonisé la partie racinaire exercent un rôle essentiel dans sa protection, communiquant avec les racines et les autres micro-organismes présents. L'utilisation de pesticides dans l'agriculture, néfastes pour les organismes, l'environnement et pour l'homme, est de plus en plus critiquée et soumise à controverse. Les PGPR pourraient remplacer les pesticides utilisés en agriculture et devenir des agents de biocontrôle afin de promouvoir la culture et limiter les infections par les phytopathogènes.

C. Une interaction plante-bactérie hautement régulée

1) Implication de la cascade GacS/GacA

Les systèmes à deux composants (TCST : two-component signal transduction systems) sont essentiels dans l'adaptation aux fluctuations des conditions environnementales.

GacS/GacA (Gac : global antibiotic and cyanide control) est un système à deux composants qui relaie un signal extérieur *via* GacS (le sensor) et le convertit *via* GacA (le régulateur de réponse). Le système Gac active la transcription des petits ARNs (sRNA : small RNA) RsmY et RsmZ (Rsm : regulation of secondary metabolites). RsmY possède une grande affinité pour RsmA, une protéine qui se fixe sur certains ARNm et empêche leur traduction. La séquestration de RsmA par les ARNs permet aux ribosomes de se fixer sur les ARNm et ainsi effectuer leur traduction en protéines. Le régulateur global GacA est très conservé chez les bactéries à Gram négatif (Reimmann et al., 1997) et requis pour la production d'exoenzymes et de métabolites secondaires chez les *Pseudomonas*. De plus, le TCST GacS/GacA est un régulateur important qui contribue à la colonisation de la rhizosphère (Cheng et al., 2013). Chez la souche *P. protegens* CHAO, GacA est un régulateur positif de la production de métabolites tels que le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) et le cyanure d'hydrogène (HCN), qui contribuent à la suppression de la pourriture de la racine noire du tabac induie par *Thielaviopsis basicola* (Laville et al., 1992). A l'inverse, une mutation de *gacS* chez *P. fluorescens* SBW25 augmente la production de l'acide gluconique et de l'acide 2-kétogluconique qui inhibent la croissance des pathogènes par acidification du milieu extracellulaire (Cheng et al., 2015). Le senseur GacS de la souche *P. fluorescens* SBW25 est impliqué dans la régulation positive ou négative de la production de 24 molécules volatiles (VOC : volatile organic compound) dont trois alkènes acycliques (3-nonene, 4-undecyne, 1-undecene) affectant la croissance de la plante (Cheng et al., 2016). Le régulateur post-transcriptionnel RsmA, dont l'action est inhibée par les ARNs RsmY et RsmZ dépendant du système Gac, réprime la production des homosérines lactones impliquées dans le quorum sensing (Pessi et al., 2001). Le système Gac, qui permet de lever la répression exercée par RsmA, est ainsi un activateur de la communication par quorum sensing.

2) Quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un système d'auto-induction permettant une communication entre les bactéries, une synchronisation de leur physiologie (en modulant l'expression de gènes spécifiques) et ainsi l'adoption d'un comportement social. Chaque cellule produit un niveau basal de molécules signal auto-inductrices et peut détecter l'accumulation de ces molécules. Le taux de ces signaux dans le milieu extracellulaire est donc proportionnel à la population bactérienne. Plus cette population est dense, plus le taux de molécules signal est important. Au-delà d'un seuil limite, les voies du QS régulent certaines voies métaboliques. Chez *P. aeruginosa*, il existe quatre classes d'auto-inducteurs (Lee and Zhang, 2015): les homosérines lactones (HSL : homosérine lactone, odDHL : 3-oxo-dodecanoyl-HSL et BHL : N-butyrylhomoserine lactones), contrôlées par les cascades Las et Rhl respectivement), le système *Pseudomonas* quinolone signal (PQS contrôlé par la cascade MvfR) et le integrated quorum sensing (IQS). Pour la plupart des souches de *P. fluorescens*, aucune de ces molécules n'a été retrouvé (Tashiro et al., 2013), excepté pour quelques souches. Par exemple, la souche rhizosphérique *P. fluorescens* CLR711 produit une homosérine lactone C6-HSL (Ghirardi et al., 2012). La souche *P. fluorescens* 2-79 produit quatre formes d'homosérines lactones : 3-hydroxy-C6-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL et C8-HSL (Cha et al., 1998; Shaw et al., 1997). *P. fluorescens* CMR12a, isolée de la rhizosphère, produit un auto-inducteur de type acyl-HSL (3-hydroxy-C12-HSL) typique de *P. aeruginosa* (De Maeyer et al., 2011) mais également des phénazines.

Les composants phénazines, synthétisés par de nombreuses espèces de *Pseudomonas* (par exemple *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*), ne sont pas uniquement des molécules signal. En effet, ces métabolites secondaires possèdent également une toxicité contre les bactéries et champignons suite à la génération d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS : reactive oxygen specie) (Price-Whelan et al., 2006; Tashiro et al., 2013). La sécrétion de ce type de molécules participe à la compétition liée aux niches écologiques. De nombreuses souches du genre *Pseudomonas*, possèdent au sein de leur génome, des gènes qui codent pour différents arsenaux impliqués dans cette compétition, tels que les antibiotiques, exo-enzymes, toxines ou systèmes de sécrétion (figure 4).

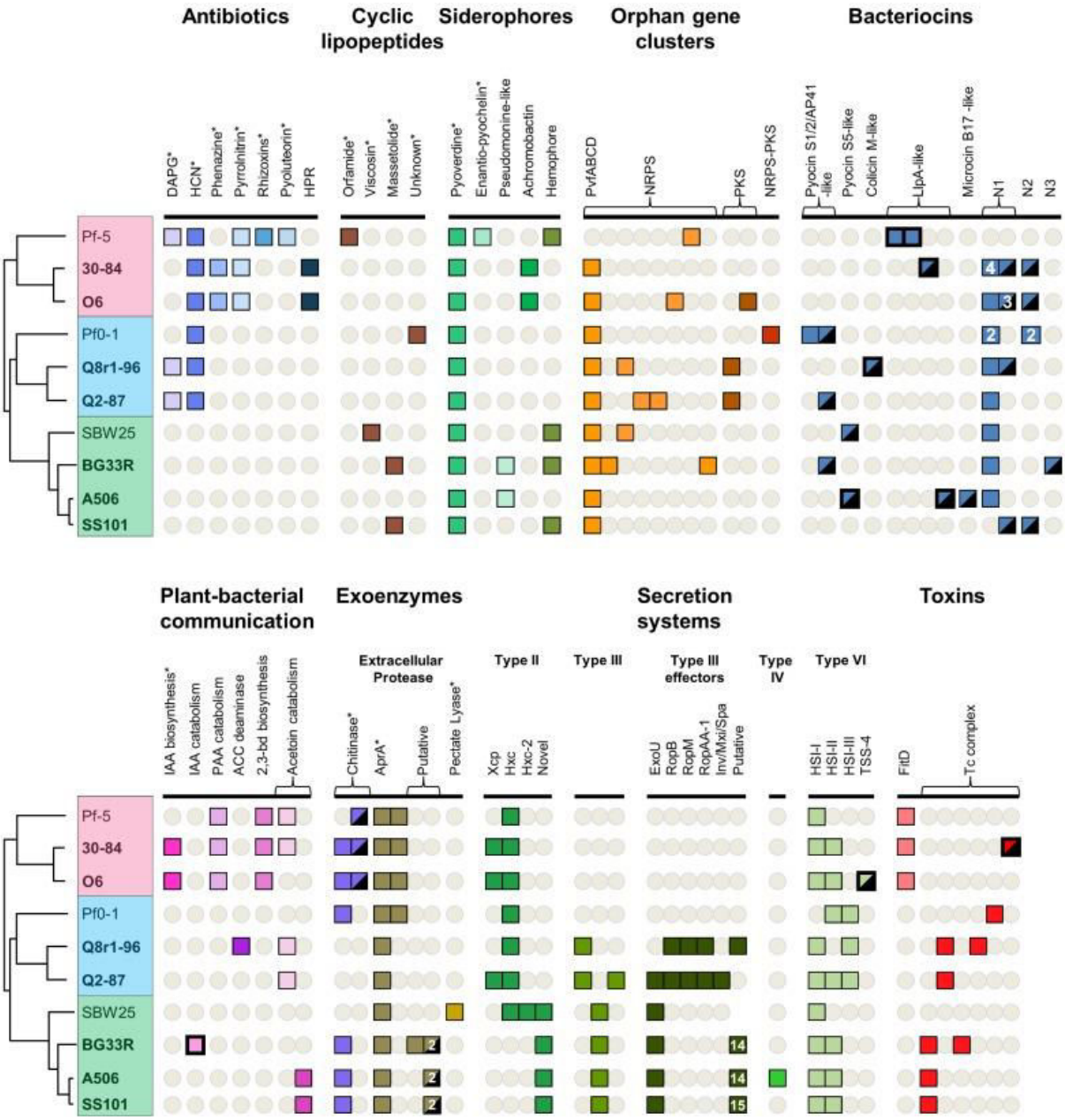


Figure 4: Analyse génomique comparative de différentes souches du genre *Pseudomonas*. (Loper et al., 2012). Les carrés colorés correspondent à la présence d'un gène ou cluster dans le génome (la présence d'un chiffre à l'intérieur du carré indique le nombre de copies si supérieur à 1). Les cercles vides indiquent l'absence de gène chez cette souche.

D. La compétition bactérienne par la biodisponibilité des nutriments

1) Les sidérophores : compétition pour la biodisponibilité du fer

La forme assimilable par les micro-organismes du fer(III) est un facteur limitant de la croissance bactérienne dans l'environnement. Les micro-organismes sont donc en compétition vis-à-vis de cet élément. L'ion ferrique Fe^{2+} s'associe au site catalytique d'enzymes impliquées dans le métabolisme et est donc indispensable à la croissance et au métabolisme bactérien, à une concentration de l'ordre du µM. Les *P. fluorescens* sécrètent dans l'environnement des sidérophores impliqués dans l'assimilation de l'ion ferrique. Les sidérophores, molécules chélatrices d'environ 1kDa présentent une forte affinité pour Fe^{3+}.

La pyoverdine (appelée aussi pseudobactine) est un pigment de couleur jaune-vert, caractéristique des *Pseudomonas fluorescens*. Elle est composée de trois parties caractéristiques des sidérophores : une partie chromophore (dérivée d'une quinolone) responsable de la fluorescence, une chaîne acyl et d'une chaîne peptidique (Meyer, 2000). Plus de 40 pyoverdines structurellement différentes ont été identifiées. De manière souche dépendante, il existe d'autres sidérophores chez les *Pseudomonas fluorescens* dont l'acide salicylique (Meyer et al., 1992), la pseudomonine (dérivée de l'acide salicylique) mais aussi la quinolobactine (8-hydroxy-4-methoxy-2-quinoline carboxylic acid) (Cornelis and Matthijs, 2002; Matthijs et al., 2004).

Les bactéries produisant des sidérophores ont d'une part un avantage compétitif lors de la colonisation de la rhizosphère et d'autre part peuvent exercer une activité de protection de la racine en « privant » les pathogènes de cet élément indispensable (Haas and Défago, 2005). Il a été montré que la souche *P. fluorescens* C7R12 peut être utilisée comme agent de biocontrôle pour lutter contre les phytopathogènes, responsables de maladies de la racine de blé dont la fusariose, en lien avec sa production de sidérophores. Cette souche de la rhizosphère du lin (Mirleau et al., 2001; Trapet et al., 2016) sécrète des sidérophores dans le sol, réduisant ainsi la biodisponibilité du fer tellurique pour les organismes compétiteurs. La souche C7R12 peut être alors être considérée comme PGPR par son action bénéfique sur la croissance des plantes. Van Loon et collaborateurs ont démontré que les sidérophores

produits par la souche *P. fluorescens* WCS374 permettent d'activer la résistance des plants de tabac amenant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (van Loon et al., 2008).

2) Solubilisation de phosphate : compétition pour le phosphate

Le phosphate bio-assimilable, indispensable pour la croissance de la plante, est lui aussi un facteur de croissance limitant dans le sol. En effet, 70% des phosphates dans le sol sont complexés avec des cations (Adhikary et al., 2014). Certaines bactéries rhizosphériques, dont les *Pseudomonas*, ont la capacité de mobiliser les phosphates insolubles en éléments bio-assimilables par la plante et sont appelées PSM (PSM : phosphate solubilizing microorganism) (Richardson et al., 2009). Par conséquent, les micro-organismes biofertilisants présents dans le sol font partie intégrante du cycle du phosphate dans la rhizosphère. La souche *P. fluorescens* F113, mais aussi les souches *P. protegens* CHAO et Pf-5, peuvent solubiliser la forme $Ca_3(PO_4)_2$ en phosphate inorganique soluble (Pi) (Miller et al., 2010). Chez ces souches, la libération de phosphate soluble Pi est corrélée à l'acidification du milieu par production d'acide organique comme l'acide gluconique et l'acide 2-kétogluconique, métabolisés à partir de glucose par les enzymes glucose déshydrogénase (Gcd) et gluconate déshydrogénase (Gad) (figure 5).

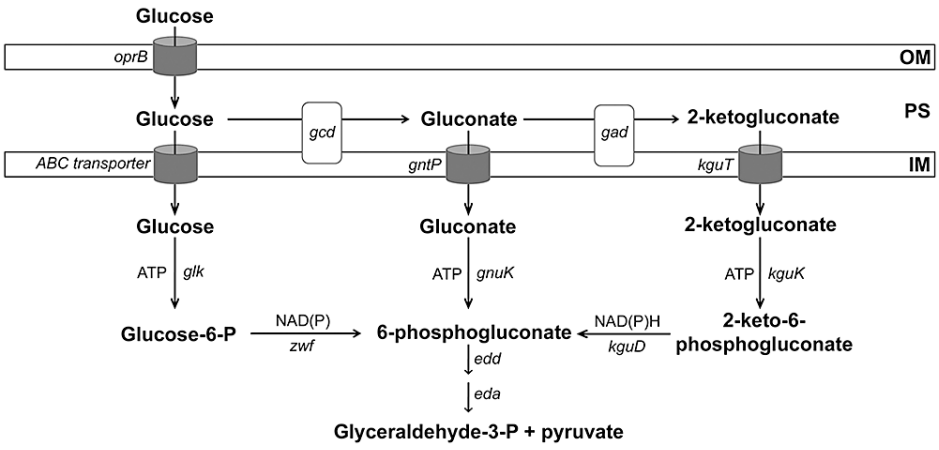


Figure 5: Voies métaboliques impliquées dans la synthèse de l'acide gluconique et l'acide 2-kétogluconique. (Miller et al., 2010). OM : membrane externe ; IM : membrane interne ; PS : espace périplasmique et NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate).

La pyrroloquinoline quinone (PQQ) est un co-facteur essentiel des déshydrogénases dont la Gcd. La souche F113 ne possède pas le gène codant pour la gluconate déshydrogénase et produit uniquement l'acide gluconique. Un mutant de la souche F113 ne produisant plus l'acide gluconique (le gène *gcd* est muté) est toujours capable de diminuer le pH et de libérer du phosphate inorganique, suggérant un mécanisme additionnel de la solubilisation de phosphate par acidification du milieu extracellulaire (Miller et al., 2010).

La souche *P. fluorescens* RAF15, isolée de la rhizosphère de ginseng, produit différents acides organiques dont majoritairement l'acide gluconique et l'acide tartrique mais produit également en plus faible proportion l'acide 2-kétogluconique, l'acide formique et l'acide acétique (Park et al., 2009). Cette production d'acides est corrélée à la baisse du pH (pH 4) et à la hausse de phosphate organique.

Une intégration chromosomique artificielle de l'opéron citrate (citrate synthase *gltA1* et transporteur *citC* provenant d'une souche d'*E. coli*) chez la souche *P. fluorescens* Pf0-1 améliore la sécrétion d'acides citrique et gluconique, augmentant ainsi la capacité de la souche à solubiliser du phosphate (Adhikary et al., 2014).

En plus de la compétition bactérienne pour un facteur limitant, les bactéries sont capables de sécréter des molécules néfastes pour le développement de micro-organismes compétiteurs.

E. Les facteurs sécrétés dans la rhizosphère

Contrairement à ce qui est décrit pour les *P. aeruginosa*, très peu d'exotoxines sont connues chez les *P. fluorescens*. La souche *P. protegens* CHAO sécrète trois métabolites toxiques : le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol), le PLT (pyoluteorin) et le PRN (pyrrolnitrin) (Baehler et al., 2005) mais également d'autres composants antibiotiques (Haas and Défago, 2005) (figure 6). Parmi ces 3 métabolites, les effets et régulations de la production du DAPG sont les plus documentés.

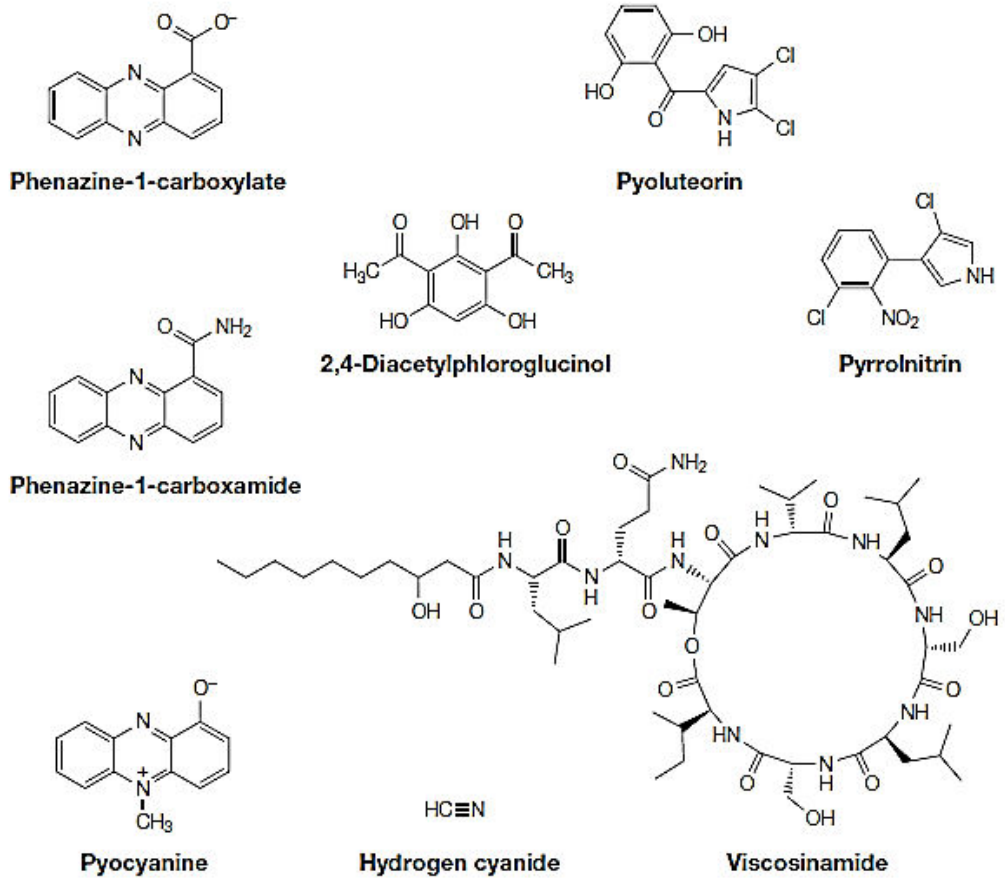


Figure 6: Les différents composants antibiotiques produits par les bactéries du genre *Pseudomonas*. (Haas and Défago, 2005).

1) Le DAPG

Le DAPG est un métabolite secondaire qui est toxique sur de nombreux organismes comme les bactéries, les champignons, protistes et nématodes (Meyer et al., 2009). Par exemple, le DAPG cause des altérations de la membrane plasmique, la vacuolisation et la désintégration des constituants cellulaires de l'oomycète *Pythium ultimum* var. *sporangiiferum* (de Souza et al., 2003). Le DAPG est synthétisé à partir de phloroglucinol (PG) par l'intermédiaire du précurseur monoacetylphloroglucinol (MAPG) (Bangera and Thomashow, 1999; Jousset and Bonkowski, 2010). L'enzyme PhlD (polyketide synthase de type III) permet de synthétiser le phloroglucinol, PhlABC permet l'acétylation du PG et du MAPG et l'hydrolase PhlG dégrade le DAPG en MAPG (figure 7) (Kidarsa et al., 2011).

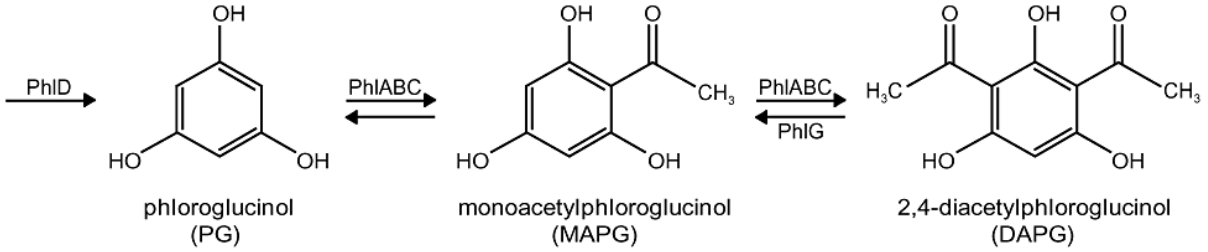


Figure 7: Voie métabolique pour la synthèse du DAPG. (Kidarsa et al., 2011). Le DAPG est synthétisé à partir de phloroglucinol (PG) par l'intermédiaire du précurseur monoacetylphloroglucinol (MAPG) *via* les enzymes PhlABC. L'enzyme PhlG permet de dégrader le DAPG en MAPG.

Jousset et al. ont démontré qu'en présence du phytopathogène *Pythium ultimum,* l'expression du gène *phlA* (un des gènes du locus *phlABCD* codant pour les enzymes impliquées dans la production de MAPG et de DAPG) chez la souche CHAO est augmentée (Jousset et al., 2011), conduisant à une augmentation de la production de l'antifongique DAPG. L'expression du gène *phlA* n'est pas modulée directement par contact entre l'oomycète et la bactérie mais par la production de l'acide vanillique, l'acide paracoumarique et de l'acide fumarique, produits par la plante en réponse à l'agression du pathogène. Cette étude propose une interaction tripartite entre les plantes, les pathogènes de racines et les rhizobactéries. En effet, l'agent infectieux déclenche la production de trois exsudats de la plante impliqués dans l'induction du gène *phlA* codant pour l'antifongique.

Bien que le DAPG soit un antifongique bénéfique, il s'avère avoir des quelques effets phytotoxiques. Le DAPG altère la croissance, le développement et la morphologie des plants de tomates. Il inhibe la croissance des racines primaires et stimule le développement de racines secondaires (Brazelton et al., 2008). L'effet du DAPG sur les plantes conforte l'idée que cette molécule soit produite uniquement en cas de nécessité, c'est-à-dire seulement en présence de l'agent infectieux (Jousset et al., 2011). Ceci confirme ainsi l'existence d'une communication indispensable entre les bactéries et la plante. La production de DAPG est ainsi localisée à l'endroit même de l'infection et au moment propice. L'équipe de Rochat a montré qu'il existe un lien entre la colonisation des racines du blé et la surexpression des gènes antifongiques *phlA* et *prnA* (Rochat et al., 2010). Le gène *pnrA*, en plus des gènes *pnrBCD*, permet la biosynthèse du composant antifongique PRN (pyrrolnitrin) chez la souche *P. fluorescens* BL915, par exemple (Hammer et al., 1997).

Acanthamoeba castellanii, amibe ubiquitaire pouvant causer la kératite amibienne et des encéphalites chez l'homme, induit, sans contact direct, la production de DAPG de la souche *P. fluorescens* Q2-87 (Jousset and Bonkowski, 2010). La présence de l'amibe, libérant des signaux diffusibles, activerait la conversion du MAPG, moins toxique et servant de réserve, en DAPG. Cette régulation permet une adaptation rapide de la souche Q2-87 dans la production du composé toxique DAPG, tout en évitant une auto-intoxication liée à l'accumulation du DAPG.

L'hydrolase PhlG, retrouvée chez les souches de *Pseudomonas* produisant le DAPG, permet de dégrader spécifiquement le DAPG en MAPG (Bottiglieri and Keel, 2006). Cette dégradation pourrait là encore prévenir d'une accumulation importante de ce métabolite secondaire et éviterait une auto-intoxication.

P. protegens CHAO possède elle aussi une activité toxique envers l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Le surnageant de culture de l'amibe induit chez la souche CHAO l'expression des gènes *phlA* et *prnA* (Jousset et al., 2010), corrélée avec l'augmentation de la toxicité de la souche CHAO envers *Acanthamoeba castellanii*. En revanche, le surnageant de l'amibe réprime l'expression du gène *pltA*, codant pour une protéine impliquée dans la synthèse du composant PLT (pyoluteorin). Ces résultats montrent la production de métabolites secondaires néfastes pour l'amibe suite à sa perception par la souche *P. protegens* CHAO.

2) Exotoxines hydrolytiques de la chitine

La chitine est un polysaccharide, formé de résidus N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés par des liaisons β-1,4 (Neiendam Nielsen and Sørensen, 1999), de la paroi des champignons mais également présente dans la cuticule externe de l'exosquelette des insectes. De nombreuses souches produisent des enzymes chitinolytiques, exotoxines permettant la dégradation cet élément structural (figure 8), impliquées dans l'activité antifongique et insecticide.

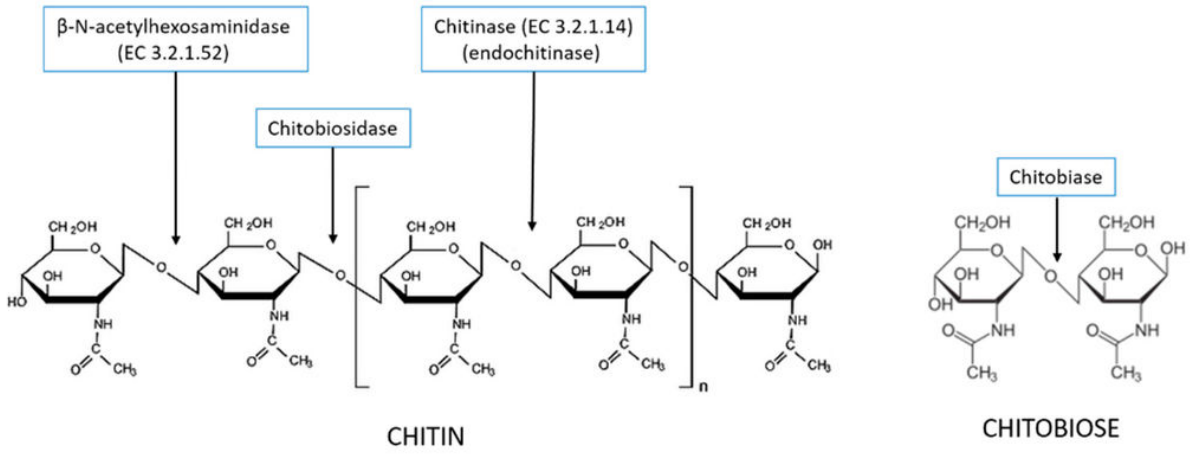


Figure 8: Représentation schématique de l'acitivité catalytique des enzymes dégradant la chitine et le chitibiose. (Fenice, 2016).

Plusieurs types d'enzymes chitinolytiques ont été décrits (Neiendam Nielsen and Sørensen, 1999) : la chitinase (ou endochitinase) (1,4-β-poly-N-acetyl-glucosaminidase) hydrolysant aléatoirement la chitine en oligomère ; l'exochitinase (ou chitobiosidase) (exo-N,N′-diacetylchitobiohydrolase), hydrolysant les extrémités du polymère / oligomère de chitine ; et la N-acetyl-glucosaminidase (ou NAGase ou chitobiase) hydrolysant les dimères de chitobiose et libérant les monomères de GlcNAc.

La souche *P. fluorescens* NCIM-2631 présente une activité toxique envers le moustique *Aedes aegypti via* une exotoxine de type chitinase. L'utilisation de cette souche comme agent de biocontrôle afin de limiter la transmission d'agents pathogènes *via* ce moustique est envisageable (Mahamuni et al., 2016). Une autre souche de *P. fluorescens* (dont le nom n'est pas précisé) produit une protéine de 44 kDa létale envers les larves et asticots de la mouche *Musca domestica*, mais sans effet contre les mammifères (Padmanabhan et al., 2005).

La chitinase C, codée par le gène *chiC*, ainsi qu'une phospholipase C codée par le gène *plcN* contribuent à l'activité insecticide de la souche CHAO après ingestion chez la larve de *Plutella xylostella* (Flury et al., 2016), un papillon parasite connu sous le nom de la teigne des crucifères ou teigne des choux. Différentes souches de *P. fluorescens* isolées de l'orge et de la canne à sucre possèdent à la fois l'activité endochitinase et chitobiosidase, pouvant être couplées sur une seule et même enzyme, ainsi qu'une faible activité extracellulaire NAGase (Neiendam Nielsen and

Sørensen, 1999). Ces souches disposent d'un arsenal complet pour hydrolyser la chitine de *Rhizoctonia solani*, et peuvent alors être utilisées comme agents de biocontrôle.

La souche de *Pseudomonas* fluorescente PGC2 (souche non définie comme *fluorescens* mais fluorescente) possède à la fois une activité chitinase et une activité β-1,3-glucanase (Arora et al., 2008) permettant la dégradation des hyphes de *Rhizoctonia solani* (agent responsable de la variole des tubercules) et *Phytophthora capsici* (agent pathogène des cucurbitacées et des solanacées). La paroi de *R. solani* contient plus de polymère de β-1,3-glucane que de chitine, alors que celle du genre *Phytophthora* ne possède pas de chitine. La production des deux enzymes hydrolytiques est primordiale à une activité antifongique efficace.

La souche *P. fluorescens* In_5, isolée de la pomme de terre de Groenland (Michelsen and Stougaard, 2011) inhibe un large spectre de champignons tels que *Fusarium graminearum* (ascomycète), *R. solani*, (basidiomycète) et *Pythium aphanidermatum* (oomycète). Cette souche synthétise également une enzyme de type β-1,3-glucanase, de la chitinase ainsi qu'une protéase et du cyanure d'hydrogène.

D'autres protéines peuvent avoir une activité entomopathogène. Par exemple, les souches de *P. protegens* CHAO et Pf-5 sécrètent la toxine Fit (*Pseudomonas fluorescens* insecticidal toxin), codée par le gène *fitD,* qui exerce une activité insecticide sur la larve *Galleria mellonella* (fausse teigne de la cire) (Péchy-Tarr et al., 2008). Cette toxine, homologue à la toxine Mcf1 de *Photorhabdus luminescens* pourrait induire une mort massive chez les larves après ingestion (Dowling et al., 2007).

Le gène *fitD* est encadré par *fitA*, *fitB*, *fitC* en amont et *fitE* en aval (figure 9), qui codent pour des composants du système de sécrétion de type I (Péchy-Tarr et al., 2008, 2013) permettant l'export de la toxine. Les gènes *fitF*, *fitG* et *fitH* codent pour des protéines à fonctions régulatrices putatives. Cependant, le mutant *fitD* conserve une activité insecticide, indiquant l'existence d'autres facteurs de virulence (Flury et al., 2016). Ainsi, les souches *P. fluorescens* DSM 50090^T et SS101, dépourvues des gènes *fit* (uniquement présents chez les *Pseudomonas* de clade I), causent des infections létales contre la larve *G. mellonella*.

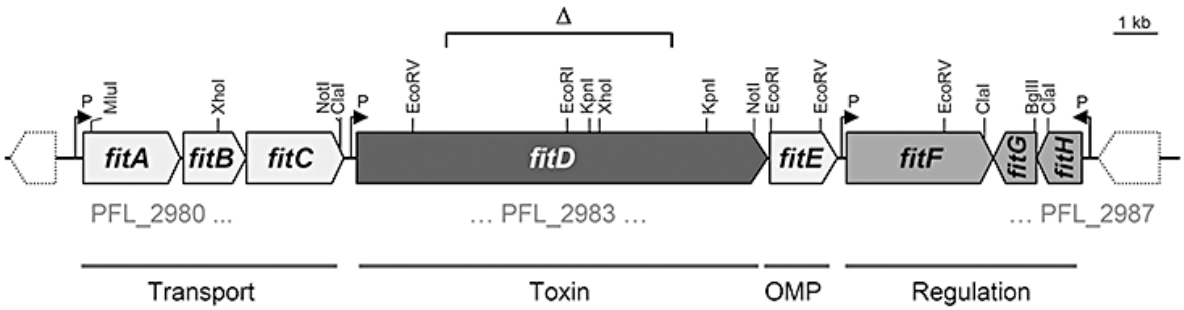


Figure 9: Environnement du gène codant la toxine insecticide des souches *Pseudomonas protegens* CHAO et Pf-5. (Péchy-Tarr et al., 2008). OMP : outer membrane protein.

3) Le cyanure d'hydrogène

Comme les exotoxines référencées précédemment, le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé toxique néfaste pour les organismes et peut participer à la lutte envers différents pathogènes dans la rhizosphère. Par exemple, le HCN inhibe l'activité cytochrome C oxydase de la chaîne respiratoire de la termite *Odontotermes obesus* (Devi and Kothamasi, 2009). Le surnageant de culture de l'amibe *A. castellanii* induit lui aussi modérément l'expression du gène *hcnA*, codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de cyanure d'hydrogène chez la souche *P. protegens* CHAO (Jousset et al., 2010). La souche CHAO produit ce métabolite secondaire, toxique pour le nématode *Caenorhabditis elegans* présent dans le sol (Neidig et al., 2011).

Différentes souches de *P. fluorescens*, isolées au niveau de la rhizosphère d'arachides en Inde, ont des effets inhibiteurs envers différents pathogènes dont *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* et *Fusarium pallidoroseum* (Sajeli Begum et al., 2014). Il s'avère que ces souches isolées produisent de l'HCN et des dipeptides cycliques.

Cependant, le cyanure d'hydrogène interfère sur la croissance racinaire en inhibant la biosynthèse de l'auxine, une phytohormone contrôlant la croissance de la plante (Rudrappa et al., 2008). Les auteurs montrent également que cet exo-métabolite empêche la formation de biofilm de *Bacillus subtilis*, espèce considérée comme PGPR. Le cyanure d'hydrogène peut ainsi affecter négativement le processus de biocontrôle.

4) Les cyclolipopeptides

Les cyclolipopeptides (CLP) sont connus comme antimicrobiens, composés cytotoxiques et surfactants. Les CLP sont composés d'un acide gras rattaché à un oligopeptide (Raaijmakers et al., 2006). Les CLP sont synthétisés par des peptides synthases non ribosomales (NRPS : nonribosomal peptides synthetases). Parmi les CLP, la synthèse de la viscosine implique l'expression des gènes *viscA*, *viscB* et *viscC* (de Bruijn et al., 2007). La synthèse du massetolide A requiert l'expression de *massA*, *massB* et *massC* (de Bruijn et al., 2008) (figure 10).

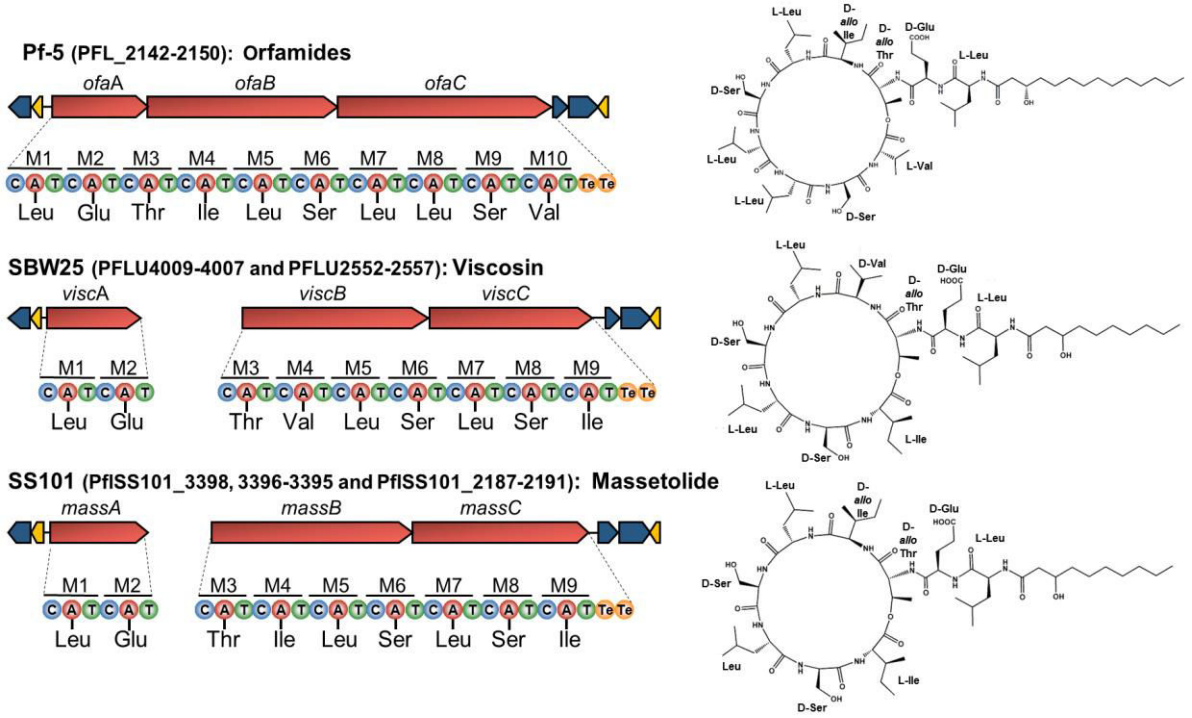


Figure 10: Organisation des clusters et structure des cyclolipopeptides de type orfamide, viscosine et massetolide. Adapté de (Loper et al., 2012). Les flèches rouges correspondent aux NRPS qui possèdent 9 ou 10 domaines (M1-M10) contenant les domaines C (condensation), A (adénylation) et T (thiolation).

Les CLP sécrétés par le genre *Pseudomonas* sont classés en quatre groupes principaux selon la composition et la longueur de l'acide gras ainsi que la nature du peptide : amphisine, syringomycine, tolaasine et viscosine (Nybroe and Sørensen, 2004; Raaijmakers et al., 2006). La nature de la chaîne acyl est déterminante pour l'activité antibactérienne car l'hydrophobicité de la chaîne permet l'incorporation aux

membranes bactériennes (Vilà et al., 2016). L'amphisine produite par la souche *P. fluorescens* DSS73 permet d'adsorber (fixation de molécule sur une surface solide) des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polluants présents dans l'environnement (Groboillot et al., 2011). L'amphisine étant biodégradable, la souche DSS73 peut être utilisée en bioremédiation pour décontaminer les sols pollués.

Globalement les CLP jouent un rôle important dans la colonisation de la plante (Nielsen et al., 2005; Tran et al., 2007). Ainsi, l'amphisine produite par la souche DSS73 est importante dans la colonisation de la betterave à sucre (Nielsen et al., 2005). De même, Tran et collaborateurs ont montré que le massetolide A, produit par *P. fluorescens* SS101, contribue à la colonisation. Ce CLP permet aussi l'induction de la résistance systémique de la tomate et possède une action toxique envers le pathogène *Phytophthora infestans*. Par leur propriété de biosurfactant, les cyclolipopeptides peuvent être indispensables pour la mobilité de la bactérie (Nybroe and Sørensen, 2004; Yang et al., 2014a). Or, la mobilité est importante dans la colonisation de la racine (Barahona et al., 2016; de Weert et al., 2002).

Dans l'étude menée par l'équipe de Yang, la souche *P. fluorescens* HC1-07, isolée de la phyllosphère (partie aérienne de la plante qui peut servir d'habitat aux micro-organismes) du blé, produit un CLP de structure similaire à la viscosine (Yang et al., 2014a). Les deux mutants des gènes *viscB* (codant pour la NRPS ViscB) et *prtR2* (codant pour le facteur anti-sigma transmembranaire PrtR2) ne produisent pas de CLP, ce qui les rend moins efficaces dans le biocontrôle que la souche sauvage. En effet, les CLP produits par la souche HC1-07 inhibent la croissance de l'hyphe des champignons phytopathogènes *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Rhizoctonia solani* AG-8 (Yang et al., 2014a). Les CLP jouent de plus un rôle important dans la formation de biofilm en régulant l'attachement et le détachement sur les surfaces (de Bruijn et al., 2007, 2008; Yang et al., 2014a). Deux gènes, *viscAR* et *viscBCR*, dont l'expression permet la synthèse de régulateurs transcriptionnels de la famille LuxR, sont impliqués dans l'inhibition de l'expression des gènes *viscABC* et donc de la biosynthèse de la viscosine chez *P. fluorescens* SBW25 (de Bruijn and Raaijmakers, 2009a). Chez la souche *P. fluorescens* SS101, l'expression des trois gènes codants pour les NRPS MassA, MassB et MassC est réprimée par MassAR et MassBCR, régulateurs transcriptionnels de la famille LuxR (de Bruijn and Raaijmakers, 2009b; Song et al., 2014).

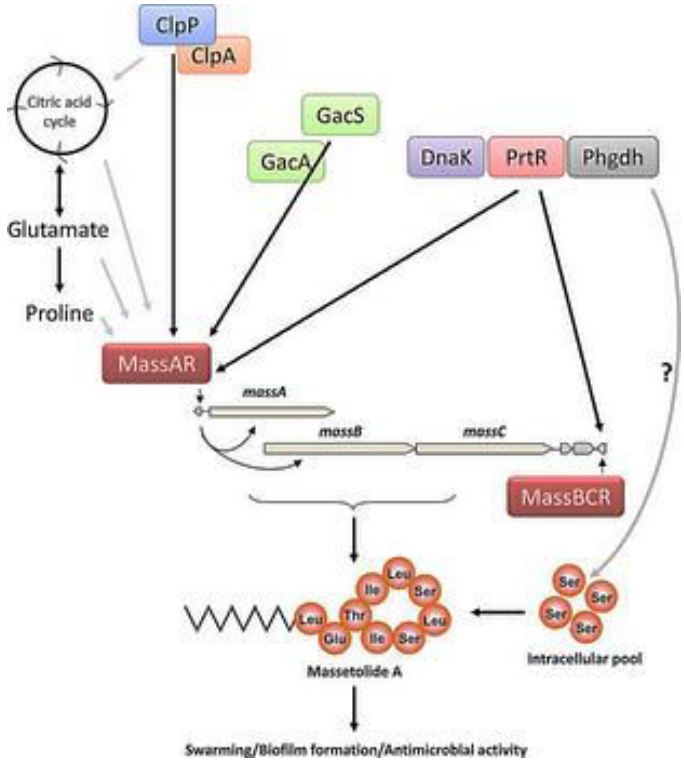


Figure 11: Proposition d'un modèle de la régulation de la production de massetolide chez *Pseudomonas fluorescens* SS101. (Song et al., 2014).

par le système à deux composants GacS/GacA, par la sérine protéase ClpP, la chaperonne DnaK (famille Hsp70) ainsi que par le facteur anti-sigma PrtR (figure 11). En effet la mutation des gènes codant les deux ARNs RsmY et RsmZ de la souche SS101 diminue la production de massetolide A (Song et al., 2014).

5) Les pyocines

Les pyocines sont impliquées dans l'activité antibactérienne et dans la colonisation de la rhizosphère. Certaines sont structurellement similaires au système de sécrétion de type VI (SST6). Je développerai donc considérablement, au cours de ce chapitre, les études portant sur des pyocines appartenant au genre *Pseudomonas*, sans me limiter à l'espèce *fluorescens*.

Plus de 90% des souches de *P. aeruginosa* produisent des bactériocines, appelées pyocines (Michel-Briand and Baysse, 2002). La production des pyocines peut être induite par des agents mutagènes tels que les rayons ultraviolets (Matsui et al., 1993;

Jacob, 1954), le peroxyde d'hydrogène (Chang et al., 2005) ou la mitomycine C (Kageyama, 1964). Fischer et collaborateurs ont montré que ces différents agents mutagènes induisent l'expression du gène *ptm* codant pour une pyocine chez une souche de *P. fluorescens* (Fischer et al., 2012). Les structures de certaines pyocines ressemblent fortement à la queue de certains bactériophages et les gènes les spécifiant sont situés le chromosome bactérien. Il existe plusieurs types de pyocines :

a) Les pyocines de type R

Cette structure contractile est constituée d'une gaine formée d'anneaux hexamériques, d'un tube interne ainsi que d'une structure basale, d'un diamètre de 24 nm, terminée par six fibres caudales (Ge et al., 2015; Williams et al., 2008). Cinq pyocines de type R ont été identifiées (R1 à R5), caractérisées par les domaines C-terminal de leurs fibres qui diffèrent et sont spécifiques à une cible donnée (Ge et al., 2015). Contrairement à d'autres systèmes contractiles, la pyocine de type R2 ne délivre ni ADN ni toxine, mais sa toxicité repose sur la formation d'un pore membranaire induisant la dépolarisation de la membrane chargée négativement, suite à la translocation de proton/cation à travers la lumière du tube interne. Longue de 120 nm et large de 18 nm à l'état détendu, la forme contractée mesure 46 nm de long et 24 nm de large (Ge et al., 2015) (figure 12).

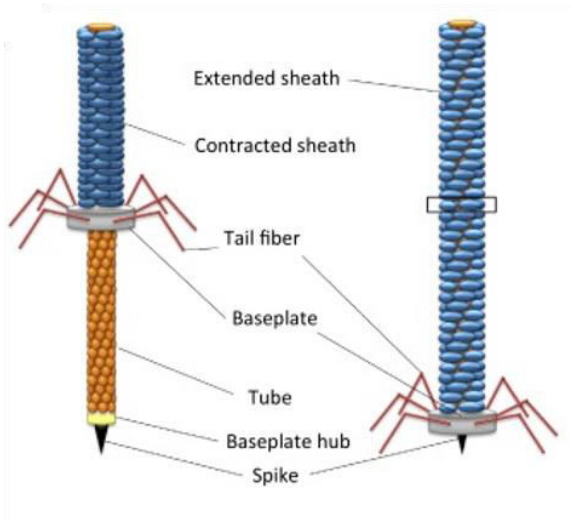


Figure 12: Structure de la pyocine de type R2 de *Pseudomonas aeruginosa*. (Ghequire and Mot, 2015).

La longueur de la pyocine de type R2 est cinq fois moins importante que celle du SST6. La structure des tubes hexamériques de la pyocine R2 ressemble fortement aux hexamères d'Hcp (Haemolysin-coregulated protein) constituant le tube du système de sécrétion de type VI (Ge et al., 2015). Par leur propriété électrostatique dipolaire (une face chargée négativement et l'autre chargée positivement), les anneaux constituants le tube interne s'auto-assembleraient. En ce qui concerne la gaine, il est possible que la structure basale serve de plateforme et initie l'assemblage, de manière similaire au bactériophage T4 (Ge et al., 2015). Un gène codant pour une protéine structurale de la pyocine de type R, le gène répresseur *prtR*, ainsi que les gènes *lys* (pour endolysine) et *hol* (pour holine), codant pour un système lytique ont été retrouvés chez la souche *P. fluorescens* SF4c, isolée de la rhizosphère (Fischer et al., 2012).

b) Les pyocines de type F

Alors que les pyocines de type R sont similaires au phage P2, les pyocines de type F sont similaires au phage lambda (Nakayama et al., 2000). Cette structure flexible et non contractile (figure 13), longue de 106 nm (23 anneaux) et d'un diamètre de 10 nm, est prolongée par une terminaison constituée de plusieurs fibres. Des clusters de gènes codant pour des pyocines de type F ont également été retrouvés chez les rhizobactéries *P. fluorescens* SF4c (Fischer et al., 2012) et SF39a (Ly et al., 2015).

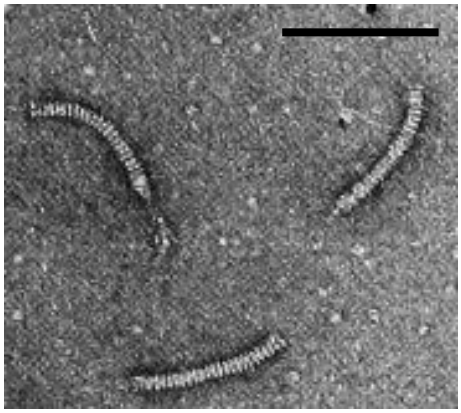


Figure 13: Observation par microscopie électronique à transmission de pyocines de type F2 de *P. aeruginosa*. (Kuroda and Kageyama, 1981) La barre représente 100 nm.

c) Les pyocines de type S

Contrairement aux pyocines de type R et F, les pyocines de type S sont sensibles aux protéases. Elles sont composées de deux protéines, dont la plus grosse possède une activité toxique tandis que la petite protéine est décrite sous le terme de protéine d'immunité. En effet, elle permet de protéger la bactérie productrice de l'effet de la toxine. Ces pyocines solubles peuvent se fixer, *via* leur domaine de liaison aux récepteurs (RBD : receptor binding domain), sur les récepteurs de la membrane externe impliqués dans l'import du fer. Par exemple chez *P. aeruginosa*, les pyocines S2 et S3 interagissent, respectivement avec FpvAI et FpvAII, des récepteurs de la pyoverdine (Elfarash et al., 2012). Les pyocines de type S peuvent avoir différentes actions et sont classées par groupes : dégradation de l'ADN (S1, S2 et S3) (Michel-Briand and Baysse, 2002), dégradation des ARNt (S4) (Elfarash et al., 2012) (ARNt : ARN de transfert), formation de pore membranaire (S5) (Ling et al., 2010) ou clivage d'une liaison de l'ARNr 16S (S6) (Dingemans et al., 2016) (ARNr : ARN ribosomique). Chez différentes souches de *P. aeruginosa*, douze pyocines de type S ont été répertoriées en 2014 (Ghequire and De Mot, 2014). Un gène codant pour une pyocine de type S contenant un domaine DNase/tRNase, nommé *pys*, a été identifié dans le génome de *P. fluorescens* SF39a, souche isolée de la rhizosphère en Argentine (Godino et al., 2016), ainsi qu'un gène codant pour une protéine d'immunité en aval. La pyocine est impliquée de manière partielle dans l'activité antibactérienne envers différentes souches phytopathogènes des genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas*. De plus, la mutation du gène *ptsP* spécifiant une phosphoénolpyruvate phosphotransférase entraîne une réduction de la production de bactériocines, de la sécrétion de protéases, de la formation de biofilm et de la capacité à coloniser la rhizosphère. Parallèlement, cette mutation conduit à une surproduction de sidérophores.

d) La bactériocine de type Llpa (lectine) ou putidacine A

La bactériocine de type Llpa a été décrite chez *P. aeruginosa* et se lie au D-rhamnose présent dans le lipopolysaccharide (Ghequire et al., 2014). Elle a été identifiée auparavant chez la souche isolée de la rhizosphère *Pseudomonas putida*

BW11M1 (Parret et al., 2003) ainsi que chez la souche *P. protegens* Pf-5 (Parret et al., 2005). L'équipe de Parret a découvert deux gènes, homologues au gène *llpA* de la souche *P. putida* BW11M1, dans le génome de *P. protegens* Pf-5 (Parret et al., 2005). Les protéines codées par ces deux gènes présentent des homologies avec les lectines permettant la liaison au mannose des monocotylédones (MMBL : monocot mannose-binding lectins). Il a été démontré que $LlpA2_{Pf-5}$ et $LlpA2_{Pf-5}$ ont une activité tueuse limitée envers les *Pseudomonas* fluorescentes. Ces deux protéines de 31 kDa ne possèdent ni séquence signal permettant leur sécrétion, ni de protéine d'immunité car $LlpA2_{Pf-5}$ et $LlpA2_{Pf-5}$ peuvent être exprimées chez des bactéries hétérologues (*E. coli* ou d'autres espèces de *Pseudomonas*). La souche *P. protegens* Pf-5 contient également deux gènes *llpA* ainsi que six régions contenant des prophages (Mavrodi et al., 2009). Le cluster des gènes du prophage 01 (F-pyocin-like prophage), ressemblant aux clusters de gènes des bactériophages CTX et Sfv, de la souche *P. protegens* Pf-5 et des souches *P. fluorescens* Pf0-1, SBW25 et Q8r1-96, est encadré par les gènes *mutS* et *recA* (Mavrodi et al., 2009).

6) Et le système de sécrétion de type VI ?

Développé ci-dessus, certaines phytobactéries, dont les *Pseudomonas,* favorisent la croissance et le développement de la plante, par activation des défenses de cette dernière, par la compétition ainsi qu'une activité inhibitrice contre les phytopathogènes. Il existe d'autres mécanismes bactériens de défense, dont le système de sécrétion de type VI (SST6). Un des rôles du SST6 est d'injecter des toxines directement dans la bactérie compétitrice en ciblant le peptidoglycane, les membranes ou bien l'ADN. Un des axes majeurs de ma thèse a été de caractériser l'activité antibactérienne de la souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 et notamment en condition *in planta* contre des phytopathogènes, tels que *Pectobacterium atrosepticum*, agent responsable de la macération du tubercule de pomme de terre. En effet, la présence de MFE01 permet limiter la macération du tubercule *via* l'activité antibactérienne de cette souche. Je développerai d'avantage les activités protectrices du SST6 dans le chapitre portant sur les différents rôles du SST6.

F. Communication des bactéries vers les plantes

1) Production de phytohormones

Plusieurs phytohormones sont produites par les rhizobactéries, dont l'acide abscissique (ABA), les gibbérellines (GA) dont GA_1 et GA_3, l'auxine (IAA : indole-3-acetic acid), les jasmonates (JA) et les cytokinines (Salomon et al., 2014). La biosynthèse bactérienne de l'auxine peut être modulée par des facteurs environnementaux (carbone limitant, pH acide, stress osmotique…) mais aussi par des composés produits par les plantes (flavonoïdes) (Spaepen et al., 2007). La souche *P. fluorescens* Rt6M10, isolée de la rhizosphère de la vigne, produit les phytohormones ABA, IAA et GA_1 (Salomon et al., 2014) et est capable d'induire la résistance systémique induite (ISR) de la vigne. Les souches rhizosphériques du pois et de l'herbe, *P. fluorescens* 6-8 et G20-18, produisent des cytokinines (l'isopentényl adénosine, la zéatine riboside et la dihydroxyzéatine riboside) et de l'IAA (Pallai et al., 2012). Ainsi, la souche 6-8 est capable de coloniser les racines de colza et favorise l'allongement de ses racines. La souche *P. fluorescens* MKB158, isolée de la rhizosphère de l'orge, produit de l'auxine (Smyth et al., 2011), réduisant les symptômes de la fusariose de l'orge par le phytopathogène *Fusarium culmorum* (Petti et al., 2012).

L'éthylène est une phytohormone qui joue un rôle important dans la croissance et le développement de la plante, la sénescence, le mûrissement des fruits *etc.* (Iqbal et al., 2017). Lors de stress, la production d'éthylène par la plante est augmentée et entraine la sénescence prématurée de la plante. L'éthylène est synthétisé à partir du précurseur 1-aminocyclopropane-1-carboxlyate (ACC) par l'ACC oxidase (figure 14). Le gène *acdS*, présent chez des PGPR, code pour l'enzyme ACC désaminase (AcdS) qui convertit l'ACC en α-kétobutyrate et en ammoniaque (Arshad et al., 2007), diminuant ainsi la production d'éthylène de la plante. L'activité de l'ACC désaminase des rhizobactéries stimule l'exsudation de l'ACC, source de carbone et d'azote pour les micro-organismes (Arshad et al., 2007). Ainsi la souche *P. fluorescens* KACC10070, *via* l'activité de l'AcdS, améliore la croissance du chou chinois en condition de stress salin (Soh et al., 2014), en diminuant la production d'éthylène.

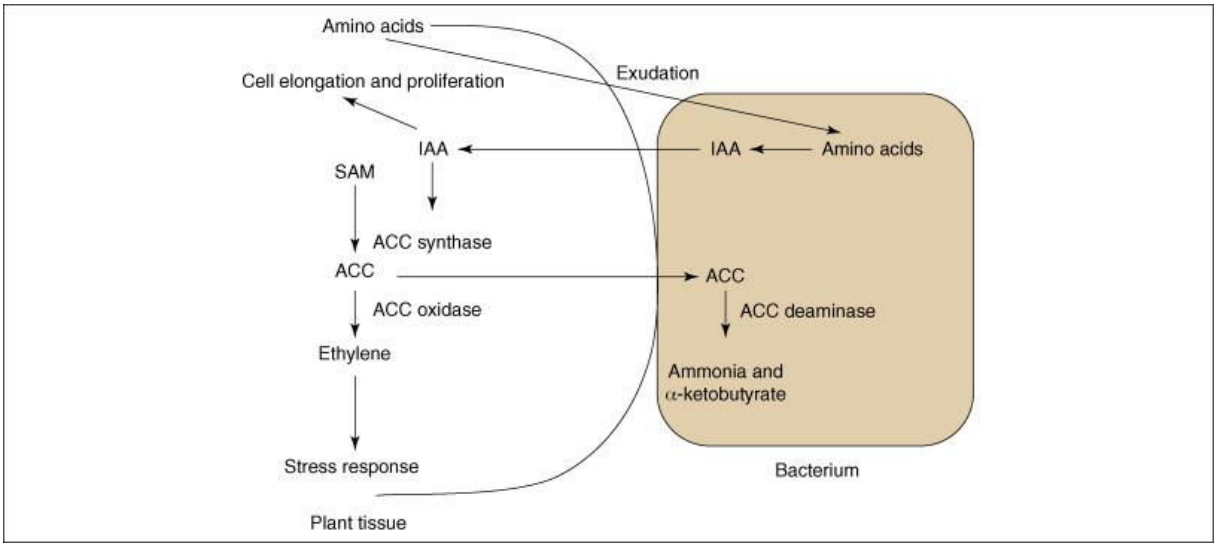


Figure 14: Schéma représentant le rôle de l'enzyme bactérienne ACC désaminase. (Arshad et al., 2007). L'ACC désaminase permet de dégrader l'ACC en α-kétobutyrate et en ammoniaque et de diminuer la production d'éthylène par la plante. IAA : indole acetic acid (auxine), SAM : S-adenosyl-methionine, ACC : 1-Aminocyclopropane-1-carboxlyate.

2) Production de composants organiques volatiles

Décrits en 2003 par Ryu, les composants organiques volatiles (VOC : volatile organic compound), sont des molécules signal libérées par certaines PGPR qui permettent de promouvoir la croissance de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Ryu et al., 2003). Les VOC produits par les bactéries (figure 15), sont des composés à faible poids moléculaire (inférieur à 300 Da) qui, même lors d'une séparation physique entre la bactérie et la plante, interviennent dans l'interaction plante-bactéries mais aussi bactéries-bactéries (Schmidt et al., 2015). Les composés volatiles bactériens sont disponibles sur la base de données « Super Scent » (Dunkel et al., 2009). Les rhizobactéries *Collimonas pratensis* Ter91 et *Serratia plymuthica* PRI-2C produisent des composés volatiles (methanthiosulfonate, S-methyl thioacetate, dimethyldisulfide et benzonitrile) qui stimulent la croissance de *P. fluorescens* Pf0-1 (Garbeva et al., 2014). De plus, ces composés augmentent la production de métabolites secondaires de la souche PF0-1 en induisant également l'expression de nombreux gènes dont celui codant pour la catalase (impliquée dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène) et des gènes du chimiotactisme. Le chimiotactisme est un mouvement dirigé vers une substance chimique attractive (nutriments par exemple) ou permettant de s'éloigner de substances répulsives qui sont souvent des composés toxiques.

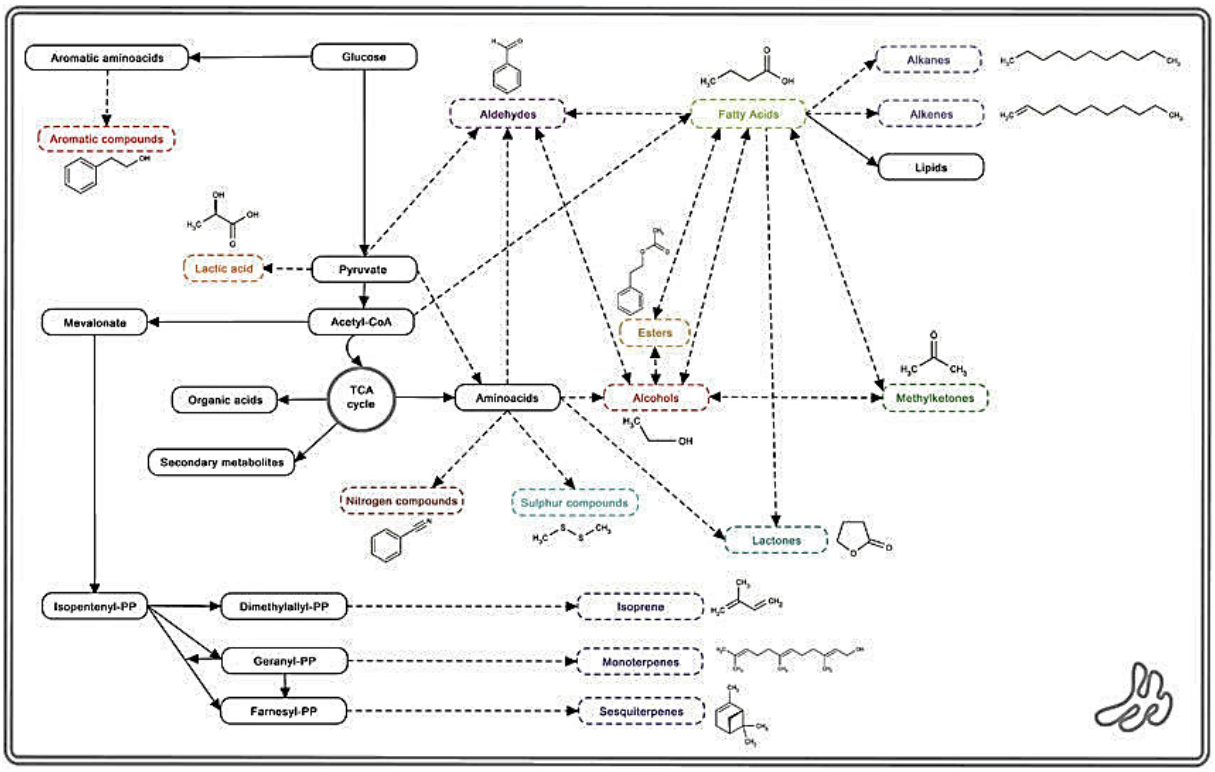


Figure 15: Voies métaboliques bactériennes impliquées dans la production de composants volatiles organiques. (Schmidt et al., 2015).

Les souches *P. fluorescens* B-4117 et Q8r1-96 produisent plusieurs VOC, dont l'hydrocarbone 1-undécène majoritaire, mais aussi de très faible quantité de DMDS (dimethyl disulfide), de MeSH (methanethiol) et de MTA (methylthiol acetate) (Dandurishvili et al., 2011). Ces deux souches répriment sévèrement la croissance des phytopathogènes *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la maladie appelée galle du collet) et *Agrobacterium vitis* (responsable de la maladie du broussin de vigne). La souche rhizosphérique *P. fluorescens* B-4117 produit des VOC et perturbe la communication basée sur le quorum sensing (de type N-acyl homosérine lactone). Ainsi certains VOC empêchent les bactéries de produire des homosérines lactones, et ces composés peuvent être alors considérés comme des molécules interférant avec la communication entre les micro-organismes présents dans la rhizosphère (Chernin et al., 2011). Ce phénomène de perturbation de la communication entre les bactéries, appelé quorum quenching, affecte les phytopathogènes mais peut aussi affecter les souches bénéfiques (Chernin et al., 2011). Le DMDS possède une activité de type quorum quenching à de très faibles concentrations (50-100 µM) contrairement au 1-undécène qui n'a pas d'activité quorum quenching même à de forte concentration (supérieure à 750 µM).

La souche *P. fluorescens* L13-6-12, isolée de la rhizosphère de la pomme de terre, libère des VOC qui inhibent la croissance du mycélium du phytopathogène *Rhizoctonia solani* Kühn (Kai et al., 2007) et d'autres espèces fongiques (Vespermann et al., 2007). Cependant, cette souche inhibe la croissance de la plante *A. thaliana* (Vespermann et al., 2007). Au contraire, la production de trois composants organiques volatiles par *P. fluorescens* SS101 (13-tetradecadien-1-ol, 2-methyl-n-1-tridecene et 2-butanone) permet d'augmenter la croissance et le développement des plants de tabac (Park et al., 2015).

G. La colonisation des plantes : biofilm, flagelle et chimiotactisme

1) Le biofilm bactérien

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie distincts : l'état planctonique, correspondant à la bactérie libre et mobile dans le milieu ; et l'état sessile, caractérisé par la fixation de la cellule sur une surface ou une interface. La majorité des bactéries de l'environnement présente un mode de vie sessile et sont principalement associées sous forme de biofilm. C'est aussi sous une forme de biofilm que la majorité des interactions bactéries-racines sont observées. Le biofilm correspond à une communauté bactérienne adhérée sur un support (ou interface) et entourée d'une matrice extracellulaire (Lee and Yoon, 2017), conférant une résistance face aux stress environnementaux. La formation de biofilm peut être divisée en plusieurs étapes (Lee and Yoon, 2017; Van Houdt and Michiels, 2005) (figure 16) :

- L'adhésion réversible des bactéries planctoniques. Les bactéries à l'état planctoniques peuvent se déplacer sur de nouvelles surfaces à coloniser. Cette adhésion primaire dépend des propriétés physico-chimiques du support et de la surface bactérienne et implique des interactions de faible énergie (interaction hydrophobe, liaison de van der Walls…).
- L'adhésion irréversible. Au cours de cette étape, le flagelle, le pili de type IV, le lipopolysaccharide ainsi que les adhésines jouent un rôle clef. De plus, les bactéries commencent à produire des exopolysaccharides. Il est à noter que

les bactéries peuvent toujours se déplacer par « twitching » par l'intermédiaire du pili de type IV.

- La colonisation de la surface. Durant cette étape, les bactéries ne possèdent plus de flagelle. Les micro-organismes forment des micro-colonies dont la charge bactérienne provient à la fois de division cellulaire des bactéries préalablement adhérées mais également de l'arrivée de bactéries planctoniques non encore adhérées.
- Maturation du biofilm. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, des structures appelées « champignons » peuvent être observées, formant ainsi un biofilm hétérogène. Les exopolysaccharides vont permettre de structurer le biofilm. De plus, la distribution et l'acheminement de l'oxygène, de métabolites et de nutriments est rendue possible *via* l'existence de canaux aqueux (Davey and O'toole, 2000).
- Dispersion. Cette étape correspond au retour à l'état planctonique, permettant la dissémination des bactéries qui peuvent ainsi coloniser une nouvelle surface. De nombreux facteurs dont l'hypoxie, la carence en nutriments et les biosurfactants peuvent être à l'origine de la dispersion du biofilm.

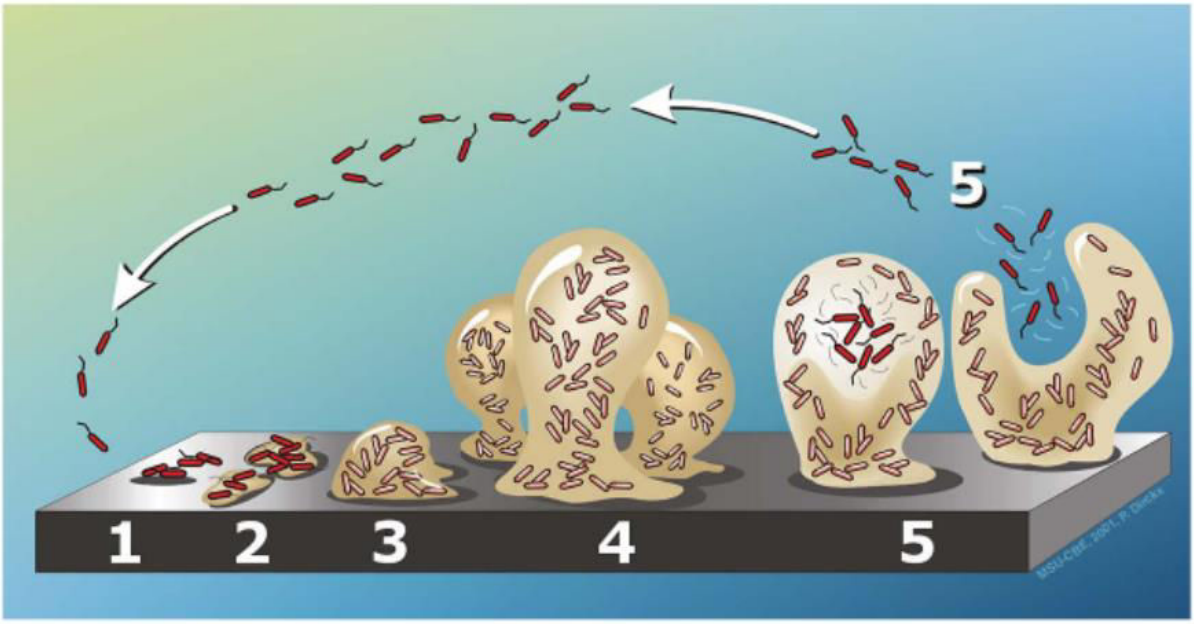


Figure 16: Les différentes étapes de formation de biofilm bactérien. (Van Houdt and Michiels, 2005). 1 : adhésion réversible des bactéries planctoniques. 2 : adhésion irréversibles et début de production de matrice extracellulaire. 3 : formation de micro-colonies et colonisation de la surface. 4 : maturation du biofilm et formation de structures macroscopiques. 5 : dispersion des bactéries et retour à l'état planctonique.

2) Le flagelle

a) Le rôle du flagelle chez les bactéries du genre *Pseudomonas*

Le flagelle est impliqué dans la mobilité, le chimiotactisme, la colonisation mais aussi dans l'adhésion chez *P. aeruginosa* (Dasgupta et al., 2003; Haiko and Westerlund-Wikström, 2013), et est considéré comme un facteur de virulence. Chez certaines souches de *P. fluorescens*, le flagelle est indispensable à la colonisation de la rhizosphère et donc dans l'activité PGPR (Barahona et al., 2016; Capdevila et al., 2004; De Weger et al., 1987; de Weert et al., 2002). Chez *P. aeruginosa* PAO1, les gènes flagellaires sont regroupés en trois clusters (Dasgupta et al., 2003).

Le flagelle est impliqué dans la mobilité mais aussi dans la colonisation de la rhizosphère de plusieurs souches de *Pseudomonas fluorescens*. Par exemple, les flagelles (jusqu'à neuf flagelles polaires) de la souche *P. fluorescens* WCS374 sont indispensables à la colonisation de la racine de pomme de terre (De Weger et al., 1987). Le filament flagellaire de la souche *P. fluorescens* F113, isolée de la rhizosphère de la betterave à sucre, est indispensable dans la colonisation compétitive de la rhizosphère (Capdevila et al., 2004). De plus, cette souche possède un cluster additionnel de 41 kb de 45 ORF (ORF : open reading frame) codant pour un second flagelle (Barahona et al., 2016).

Le gène *kinB*, codant pour une protéine senseur kinase impliquée dans la transduction des signaux, réprime la mobilité de type « swimming » (Barahona et al., 2011). Lorsque le deuxième flagelle est produit, ce qui est induit par des mutations des gènes *kinB* et *algU* (la souche sauvage produisant un seul type de flagelle), la souche est hyper-flagellée (Barahona et al., 2016). La production de ce second flagelle est un élément important pour la colonisation compétitive de la rhizosphère.

La protéine FlgZ, possédant un domaine PilZ, récepteur au c-di-GMP, est localisée au niveau du pôle flagellaire lorsque le taux de c-di-GMP augmente. FlgZ, dont la production est contrôlée par les deux régulateurs FleQ et FliA, interagirait avec le rotor du flagelle et modulerait alors la mobilité (Martínez-Granero et al., 2014).

b) La structure du flagelle

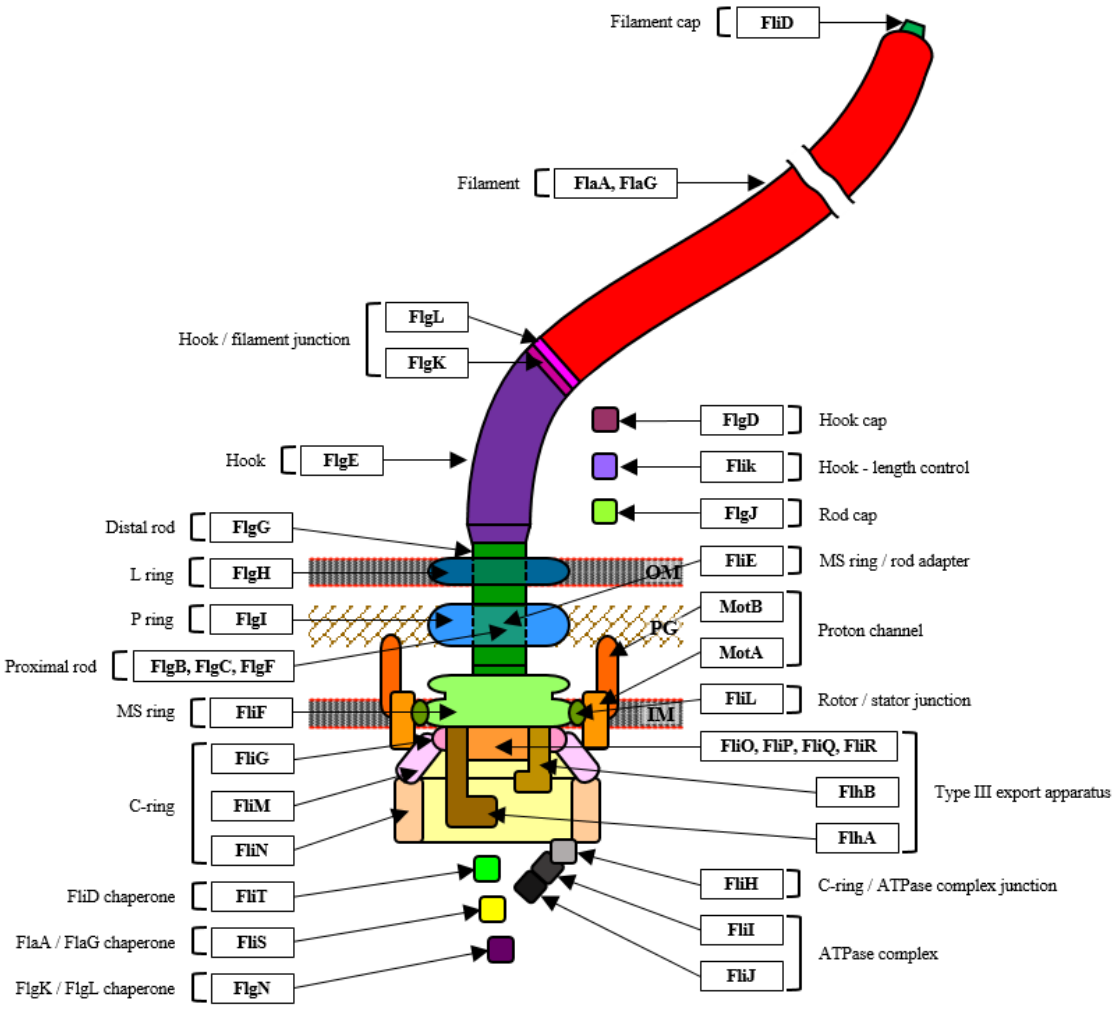


Figure 17: Représentation schématique de la structure du nano-moteur flagellaire. (Gallique et al., en préparation). La tige (rod), le crochet (hook) et le filament forment une construction continue creuse (lumière interne). L'arbre de transmission (drive-shaft rod) est entouré de plusieurs séries d'anneaux, nommés L-ring (pour lipopolysaccharide), P-ring (pour peptidoglycane), MS-ring (pour membrane-supramembrane) et C-ring (pour cytoplasmique) et ces différentes structures forment le corps basal (basal body). Les protéines de jonction FlgK et FlgL permettent d'associer le filament au niveau du crochet flexible. La machinerie d'export de type III, constituée du complexe ATPase, de la « cage d'export » ainsi que de la « porte d'export », permet d'exporter les sous-unités de la tige, du crochet et du filament à travers la lumière interne flagellaire. Le texte descriptif provient de l'article de Evans et collaborateurs (Evans et al., 2014). OM : membrane externe ; IM : membrane interne et PG : peptidoglycane.

Le flagelle est une structure multi-protéique constituée de trois parties (figure 17) : le corps basal (« basal body »), le crochet (« hook ») et le filament (Evans et al., 2014). Le corps basal correspond à la structure basale du flagelle qui est ancrée dans

l'enveloppe bactérienne *via* plusieurs anneaux. L'anneau L (« L-ring ») au niveau de la membrane externe, l'anneau P (« P-ring ») ancré dans le périplasme, l'anneau MS (« MS-ring ») situé au niveau de la membrane interne et l'anneau C (« C-ring ») localisé dans le cytoplasme. Les anneaux entourent la tige de rotation (« rod ») qui relie le moteur au crochet et agit comme un « arbre de transmission ». L'appareil de sécrétion, similaire au système de sécrétion de type III (SST3), qui comprend le complexe ATPase, est localisé dans la cavité délimitée par les anneaux MS et C. Le crochet est à la surface de la cellule et fait la jonction entre le corps basal et le filament. Le filament correspond à une extension extracellulaire, attachée au crochet par l'intermédiaire des protéines de jonction FlgK/FlgL, et est majoritairement composé de la flagelline.

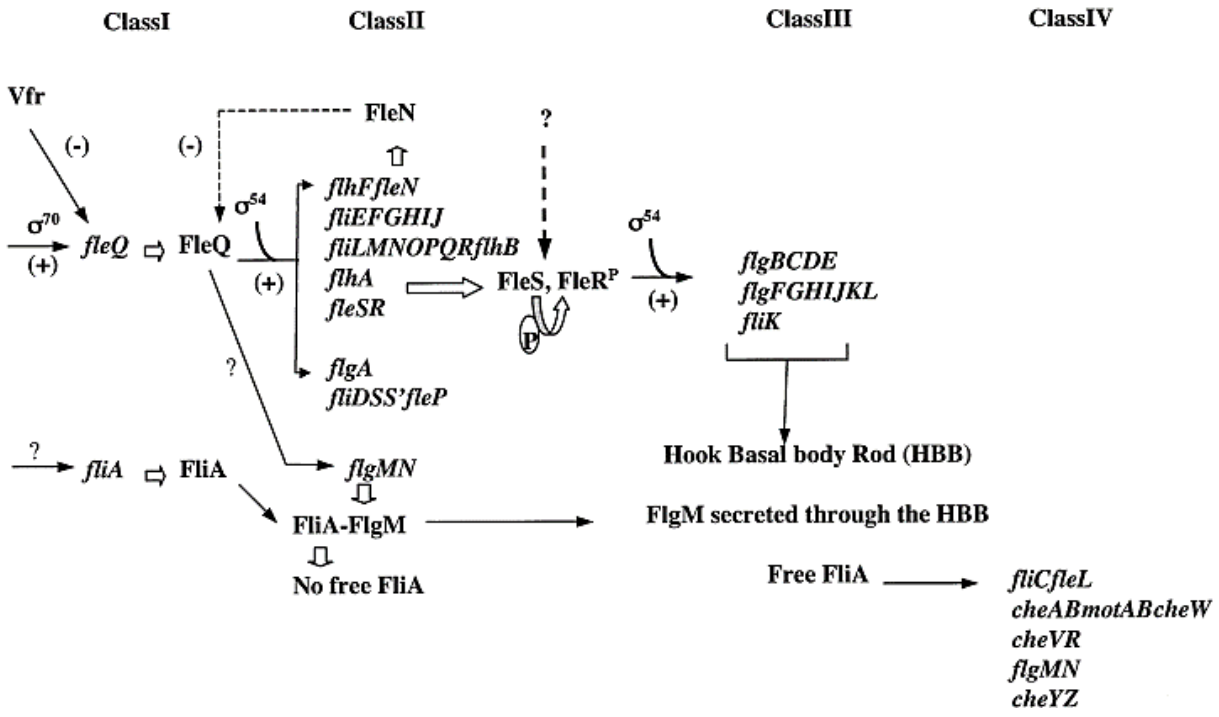


Figure 18: Régulation hiérarchique de l'expression des gènes flagellaires chez *P. aeruginosa*. (Dasgupta et al., 2003). (+) et (-) correspondent à une régulation positive ou négative, respectivement. Le point d'interrogation désigne un facteur inconnu et Ⓟ une phosphorylation.

Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, on distingue quatre grandes classes de gènes flagellaire, notés classe I-IV (figure 18) (Dasgupta et al., 2003). Ces classes correspondent à différentes étapes d'assemblage du flagelle. Pour assurer un assemblage correct, l'expression des différents gènes flagellaires est régulée de manière hiérarchique, sous l'influence de plusieurs régulateurs (FleQ, FleN, FleS,

FleR, RpoN, FliA et FlgM). En effet, le flagelle s'assemble de manière séquentielle en commençant par la formation du complexe basal, du crochet puis du filament. Par exemple, l'achèvement du crochet constitue un « checkpoint » qui permet l'activation de la transcription des gènes de classe IV. Ainsi, le passage de la classe III à la classe IV se fait à un moment précis, c'est-à-dire qu'une fois l'assemblage du crochet (ou « hook ») achevée, l'expression des gènes de classe IV est positivement régulée par le facteur sigma FliA (également appelé σ^{28}). Une fois le crochet correctement assemblé, le facteur FliA peut s'associer au cœur de l'ARN-polymérase ADN-dépendante (sous-unités $\alpha_2\beta\beta'$) et former ainsi l'holoenzyme ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Le facteur sigma peut alors reconnaitre la région promotrice (boîtes -35 et -10) et ceci initie la transcription des gènes flagellaires de classes IV.

c) Assemblage du filament et gènes de classe IV

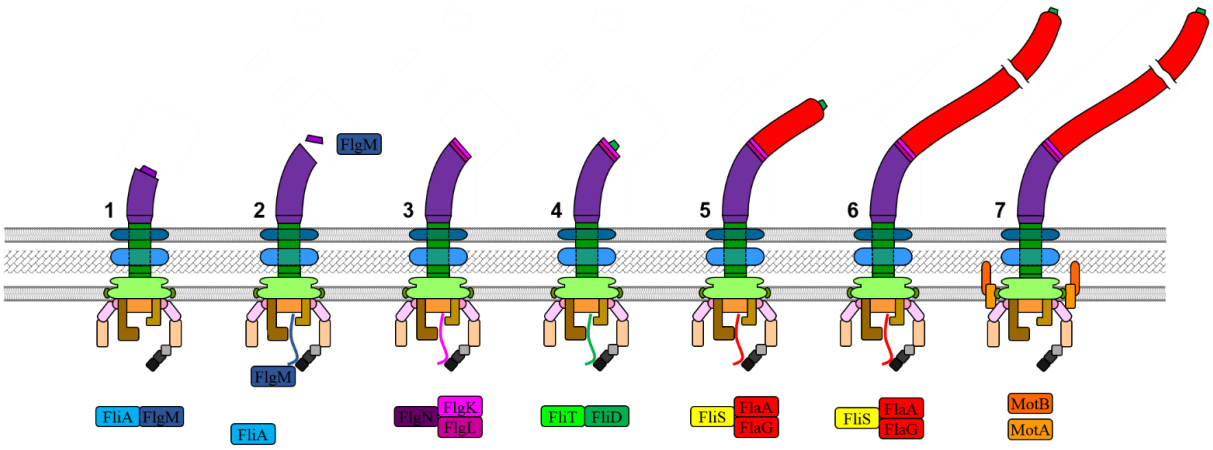


Figure 19: Etapes d'assemblage du flagelle de classe IV. (Gallique et al., en préparation). Les protéines dépliées sont représentées par des lignes courbées et la couleur est propre à chaque protéine. En effet, les protéines sont dépliées avant d'entrer au niveau de la lumière interne flagellaire afin d'être exportées. Les différentes protéines structurales du flagelle sont notées dans la figure 17. 1. Le crochet en cours d'assemblage (nécessite la protéine de cap FlgD) : le facteur antisigma séquestre FliA, empêchant alors la transcription des gènes flagellaires de classe IV. 2. Le crochet est entièrement assemblé (la protéine FliK permet de contrôler la longueur du crochet qui est d'environ 55 nm), la protéine FlgD se décroche et FlgM est sécrétée dans le milieu extracellulaire, libérant ainsi le facteur sigma FliA, ce qui permet de transcrire le régulon de classe IV. 3. La chaperonne FlgN permet la sécrétion des protéines de jonction (crochet-filament) FlgK et FlgL. 4. La protéine de cap FliD, sécrétée à l'aide de sa chaperonne FliT forme un hexamère (chez *Pseudomonas aeruginosa*). 5. Le filament flagellaire, constitué de la flagelline FlaA (ou FliC), est en cours d'assemblage. La chaperonne FliS permet la sécrétion de la flagelline et de FlaG (contrôle de la longueur du filament). 6. Le filament est entièrement assemblé. 7. Les protéines MotA et MotB, permettant l'influx de protons générant la force protomotrice, s'assemblent. Il est à noter que FliA contrôle également la transcription d'autres gènes, comme *flgZ* ou bien ceux du chimiotactisme, qui ne sont pas représentés sur cette figure.

L'assemblage du filament est dépendant de l'expression des gènes de classe IV régulés par le facteur sigma FliA. Les gènes flagellaires de classe IV codent pour les protéines impliquées dans la formation du filament flagellaire (figure 19). Par exemple, chez *P. aeruginosa,* le régulon, c'est-à-dire l'ensemble des gènes sous le contrôle d'un même régulateur, est constitué des gènes codant pour la flagelline (FlaA ou FliC), la chaperonne FlgN, le facteur antisigma FlgM (rétrocontrôle négatif), les protéines du moteur flagellaire MotA et MotB (formant le stator), et les protéines impliquées dans le chimiotactisme (CheA, CheB, CheY, CheW, CheZ…). En revanche, l'expression des gènes codant pour les chaperonnes FliS et FliT (nommée FliS') ainsi que la protéine de cap FliD n'est pas dépendante du facteur sigma FliA chez la souche *P. aeruginosa* PAK (Dasgupta et al., 2003). En effet, l'expression des gènes *fliS*, *fliS'* (*fliT*) et *fliD* est régulée à la fois par le facteur sigma RpoN et le régulateur majeur FleQ (figure 18).

A contrario, chez la souche *Pseudomonas putida* KT2440, la chaperonne FliS et la protéine de cap FliD sont produites sous le contrôle de FliA. De plus, la présence d'une séquence consensus du promoteur FliA a été retrouvée en amont des gènes *fliS* et *fliD* (Rodríguez-Herva et al., 2010). En effet, ces deux gènes sont sous-exprimés chez le mutant *fliA*, soulignant une différence dans la régulation de l'expression de ces deux gènes entre *P. aeruginosa* et *P. putida*.

i. La chaperonne FlgN

FlgN peut interagir avec les deux protéines de jonction (lien entre le crochet et le filament) FlgK et FlgL et protège ces deux protéines de la protéolyse dans le cytoplasme (Minamino et al., 2012).

ii. La flagelline et sa chaperonne FliS

Le filament du flagelle forme un long faisceau accroché au crochet flagellaire (petite structure à la surface bactérienne, fortement courbée) et agit comme une hélice entraînée par le moteur flagellaire. Les monomères de flagelline, FliC (appelée dans certains cas FlaA) s'assemblent pour former cette fine structure pouvant atteindre 15

µm de long (Vonderviszt and Namba, 2013). Les monomères de flagelline voyagent à travers le canal central étroit (environ 2 nm). Des protéines additionnelles (telle que FlaG par exemple) peuvent être présentes et sembleraient influencer la longueur du flagelle et la vitesse de mobilité (Capdevila et al., 2004), par un mécanisme inconnu. En effet, la mutation de *flaG* chez la souche *P. fluorescens* F113 n'entraine pas la perte de mobilité. Au contraire, le flagelle apparaît légèrement plus grand.

La protéine FliS est indispensable à la mobilité puisqu'elle évite la polymérisation prématurée de la flagelline dans le cytoplasme et facilite son export à travers le canal du flagelle (Muskotál et al., 2006). FliS interagit avec un monomère de flagelline dans un ratio stœchiométrique 1:1. Lorsque la flagelline interagit avec sa chaperonne spécifique, ce complexe peut venir se fixer sur le domaine cytoplasmique (C-terminal) de la protéine membranaire FlhA (faisant partie de l'appareil de sécrétion), ce qui permet la sécrétion à travers le canal (Bange et al., 2010) (figure 20). Chez *P. aeruginosa*, la régulation de l'expression du gène *fliS* dépend de RpoN et de FleQ (Dasgupta et al., 2003).

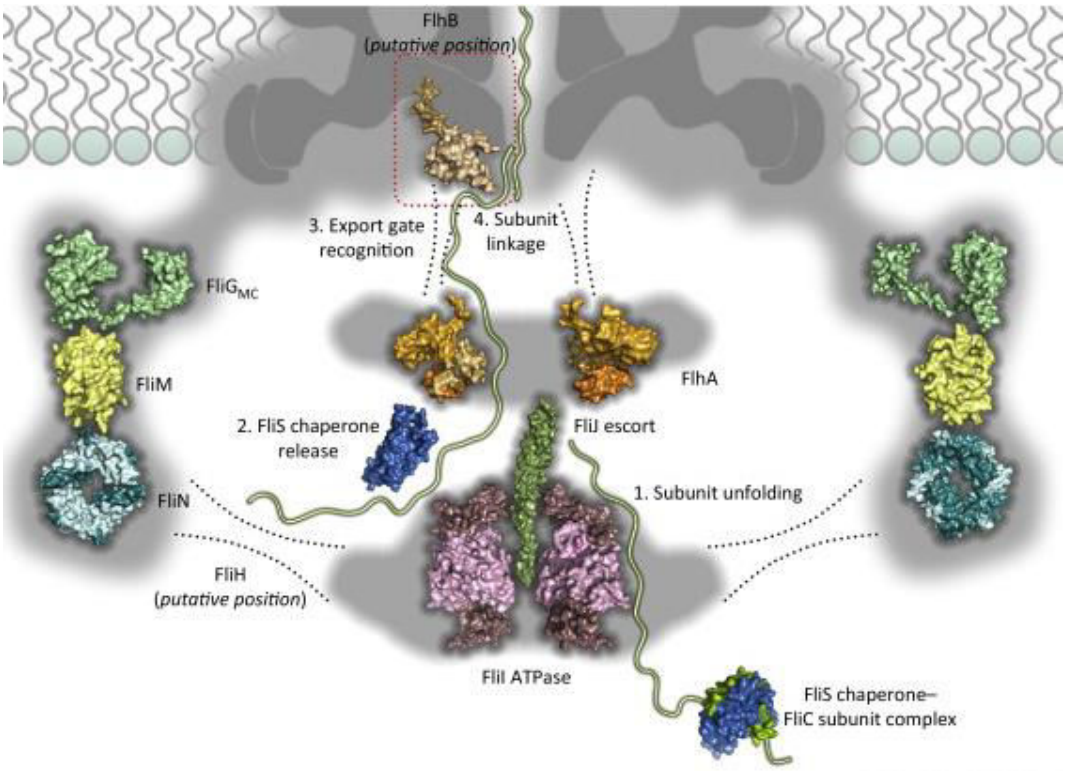


Figure 20: Interaction des sous-unités flagellaires avec l'appareil d'export. (Evans et al., 2014). Le complexe ATPase (composé des protéines FliI et FliJ) est associé avec le complexe C-ring (FliG, FliM et FliN) par l'intermédiaire de la protéine FliH. Le complexe chaperonne-flagelline (FliS-FliC) interagit avec l'ATPase, puis FliC rentre ensuite au niveau de la « cage d'export » (formée par FlhA), puis passe par la « porte d'export » (FlhB) pour être enfin exportée à travers la lumière interne flagellaire.

iii. La protéine de cap FliD et sa chaperonne FliT

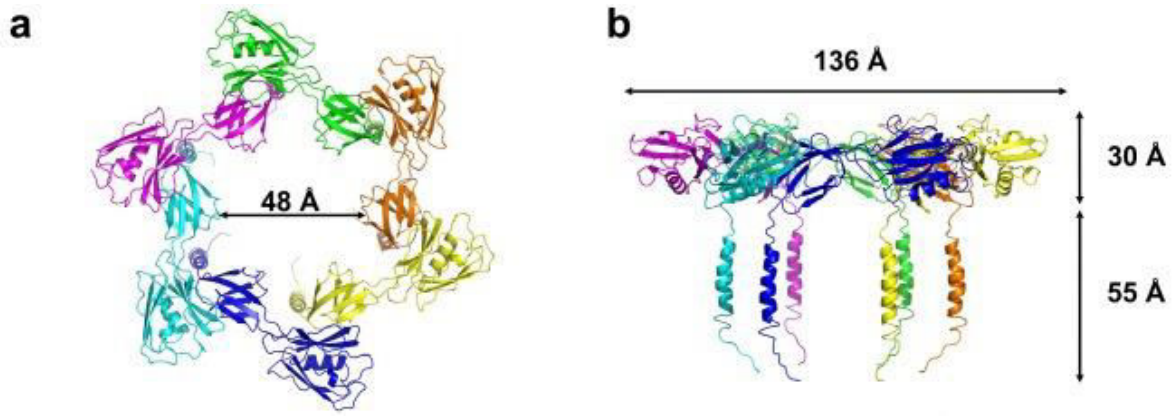


Figure 21: La protéine FliD forme un complexe hexamérique chez *P. aeruginosa*. (Postel et al., 2016). Vue de dessus (a) et vue de côté (b) de la structure tridimensionnelle des protéines FliD formant un hexamère.

Chez *P. aeruginosa*, FliD forme un hexamère (figure 21) qui est localisé sur l'extrémité distale du filament (Postel et al.). Le complexe FliD permet de polymériser un à un les monomères de flagelline passant par le canal interne du flagelle. Il est important de noter que la flagelline traverse cet étroit canal (≈ 2 nm) sous sa forme dépliée. Un mutant *fliD* sécrète toujours de la flagelline mais le filament ne se forme pas (Ikeda et al., 1983). En effet, le complexe FliD, probablement *via* les régions N- et C-terminales fortement flexibles (Postel et al.), insère les monomères de flagelline à l'extrémité grandissante du filament. Le complexe FliD agirait comme une foldase, c'est-à-dire permettrait d'assister au bon repliement de la flagelline au niveau de la pointe du flagelle (Evans et al.) (figure 22). Chez la souche *P. aeruginosa* PAK, la protéine FliD est impliquée dans la fixation sur la mucine présente dans le mucus (Arora et al., 1998).

Les gènes codant pour la protéine de cap FliD et sa chaperonne FliT appartiennent aux gènes de classe II et leur expression est contrôlée par RpoN et FleQ chez *P. aeruginosa* (Dasgupta et al., 2003) (Figure 18). Alors que chez *P. putida* KT2440, l'expression du gène *fliD* est dépendante du facteur FliA. Aucune information concernant la régulation de l'expression du gène *fliT* n'est disponible chez cette souche (Rodríguez-Herva et al., 2010).

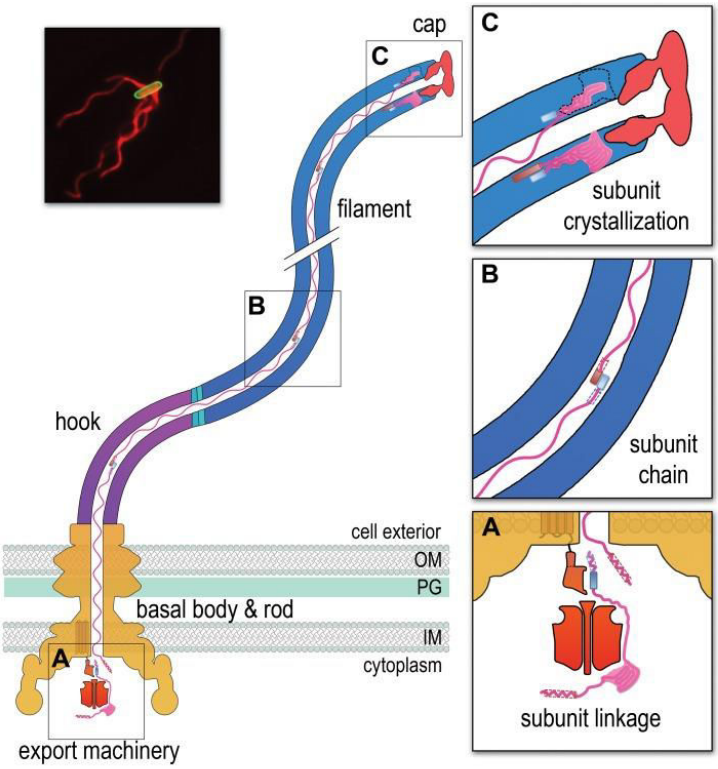


Figure 22: Mécanisme d'assemblage des monomères de flagelline par la protéine de cap FliD. (Evans et al., 2014). A) La machinerie d'export (similaire au système de sécrétion de type III) localisée dans le cytoplasme permet la sécrétion des sous-unités de flagelline, liées de manière « head-to-tail ». L'ATPase, schématisée en rouge, permet de prendre en charge et de déplier les sous-unités qui vont ensuite passer par la lumière interne du flagelle. La protéine FlhB (export gate protein, schématisée en orange) permet d'incorporer ses sous-unités dans le canal interne. B) Les sous-unités de flagelline dépliées sont liées « head-to-tail » à travers le canal interne du flagelle et sont connectées à l'extrémité distale du flagelle. C) La protéine de cap FliD, localisée au niveau de l'extrémité distale du filament, permet de replier les sous-unités de flagelline (activité foldase). Le repliement de la flagelline permet de « tirer » sur le réseau de sous-unités de flagelline dépliée. L'action de la protéine FlhB (export gate protein, schématisée en orange) est également nécessaire à l'incorporation de nouvelles sous-unités.

La chaperonne FliT se lie de manière spécifique avec la protéine FliD afin d'éviter qu'elle s'agrège dans le cytoplasme (Imada et al., 2010). Lorsque la chaperonne FliT interagit avec FliD, ce complexe peut venir se fixer sur le domaine cytoplasmique (C-terminal) de la protéine membranaire FlhA (Bange et al., 2010).

iv. Le facteur antisigma FlgM

L'activité du facteur sigma FliA est modulée par son facteur antisigma FlgM (Frisk et al., 2002). Lors de l'assemblage du flagelle, FlgM interagit directement avec FliA, empêchant ainsi l'expression des gènes de classe IV (Dasgupta et al., 2003). Lorsque

le crochet est correctement assemblé sur le corps basal (HBB : hook basal body, correspond au corps basal prolongé du crochet), la protéine FlgM est sécrétée à travers le crochet et le facteur FliA est alors libre dans le cytoplasme. Chez le mutant *fliA*, la transcription de *flgM* est significativement réduite (Dasgupta et al., 2003), ce qui suggère que la quantité de FlgM est positivement régulée par le facteur sigma FliA. Ceci conduit donc à un rétrocontrôle négatif de FliA sur l'expression de *fliA*.

v. Les complexes MotAB, MotCD, la protéine FlgZ et le chimiotactisme

Les protéines MotA et MotB forment le complexe stator, correspondant à la partie fixe du moteur flagellaire. La force protomotrice résulte de l'influx de protons (et dans certain cas d'ion sodium Na^+) à travers le canal à proton MotAB, fournissant l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle (Hosking et al., 2006). Les deux gènes *motA* et *motB* sont également exprimés sous contrôle du facteur sigma FliA (Dasgupta et al., 2003).

Il est à noter que chez *P. aeruginosa*, il existe deux stators flagellaires MotAB et MotCD (Kuchma et al., 2015), qui ont des rôles distincts dans la mobilité. Par exemple, MotCD promeut la mobilité de type « swarming » contrairement à MotAB. La protéine FlgZ contient un domaine liaison au c-di-GMP, un second messager important dans la régulation de la mobilité. Lors de forte concentration de c-di-GMP, FlgZ interagit avec MotCD (Baker et al., 2016) et pourrait alors empêcher l'interaction de MotCD avec le rotor. En plus de l'expression des gènes codant pour les protéines structurales du flagelle, FliA contrôle positivement l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le chimiotactisme (Dasgupta et al., 2003).

3) Le Chimiotactisme

Le chimiotactisme, impliqué dans la mobilité dirigée des bactéries, est important dans la colonisation de nouveau territoire. Il est contrôlé par le système à deux composants CheA (senseur kinase)/CheY (régulateur de réponse) (de Weert et al., 2002). La production d'exsudats, molécules chimio-attractantes, par les plantes

permet d'attirer les bactéries afin que ces micro-organismes colonisent la partie racinaire. CheA phosphoryle CheY qui va ensuite changer la rotation du flagelle en interagissant avec le rotor du flagelle (Muriel et al., 2015) (figure 23). Le mutant *cheA* de la souche *P. fluorescens* WCS365 est toujours mobile mais cependant moins compétitif dans la colonisation de la racine de tomate que la souche sauvage (de Weert et al., 2002). La souche F113 possède trois systèmes de chimiotactisme fonctionnels et indépendants (notés Che1-3) (Muriel et al., 2015), qui jouent un rôle important dans la colonisation de la rhizosphère. La présence du phytopathogène *Fusarium oxysporum* augmente le taux de succinate, un des composants des exsudats produits par la racine de la tomate (Kamilova et al., 2006). Or la souche *P. fluorescens* Pf0-1 possède un chimiotactisme envers différents acides aminés et acides organiques dont le succinate (Oku et al., 2014). Le chimiotactisme est donc important dans la colonisation de la rhizosphère, suite à un déplacement dirigé vers les exsudats produits par la plante, modulés par la présence de phytopathogène.

H. Reconnaissance des micro-organismes par les plantes

1) La résistance systémique induite et résistance acquise systémique

Les plantes possèdent un « système immunitaire » activé suite à la perception des PAMP (pathogen-associated molecular patterns), les MAMP (microbe-associated molecular patterns, concernant les pathogènes, non pathogènes et saprophytes) et DAMP (damage-associated molecular patterns, dérivés de la plante après action de l'activité enzymatique du pathogène par exemple) *via* les récepteurs membranaires PRR (pattern recognition receptors) (Burketova et al., 2015). Après reconnaissance de ces PAMP/MAMP, les PRR activent les cascades de signalisation et conduisent à la production de ROS (reactive oxygen species), de monoxyde d'azote (NO) ou bien l'induction de la mitose *via* les protéines MAPK (mitogen-activated protein kinases) par exemple. Ces cascades vont permettre à la plante de se défendre contre le pathogène par production de protéines PR (pathogenesis-related protein, comme la chitinase ou la β-1,4-glucanase), de phytoalexines (composants antimicrobiens) ou bien en renforçant sa paroi avec de la callose et de la lignine (figure 24).

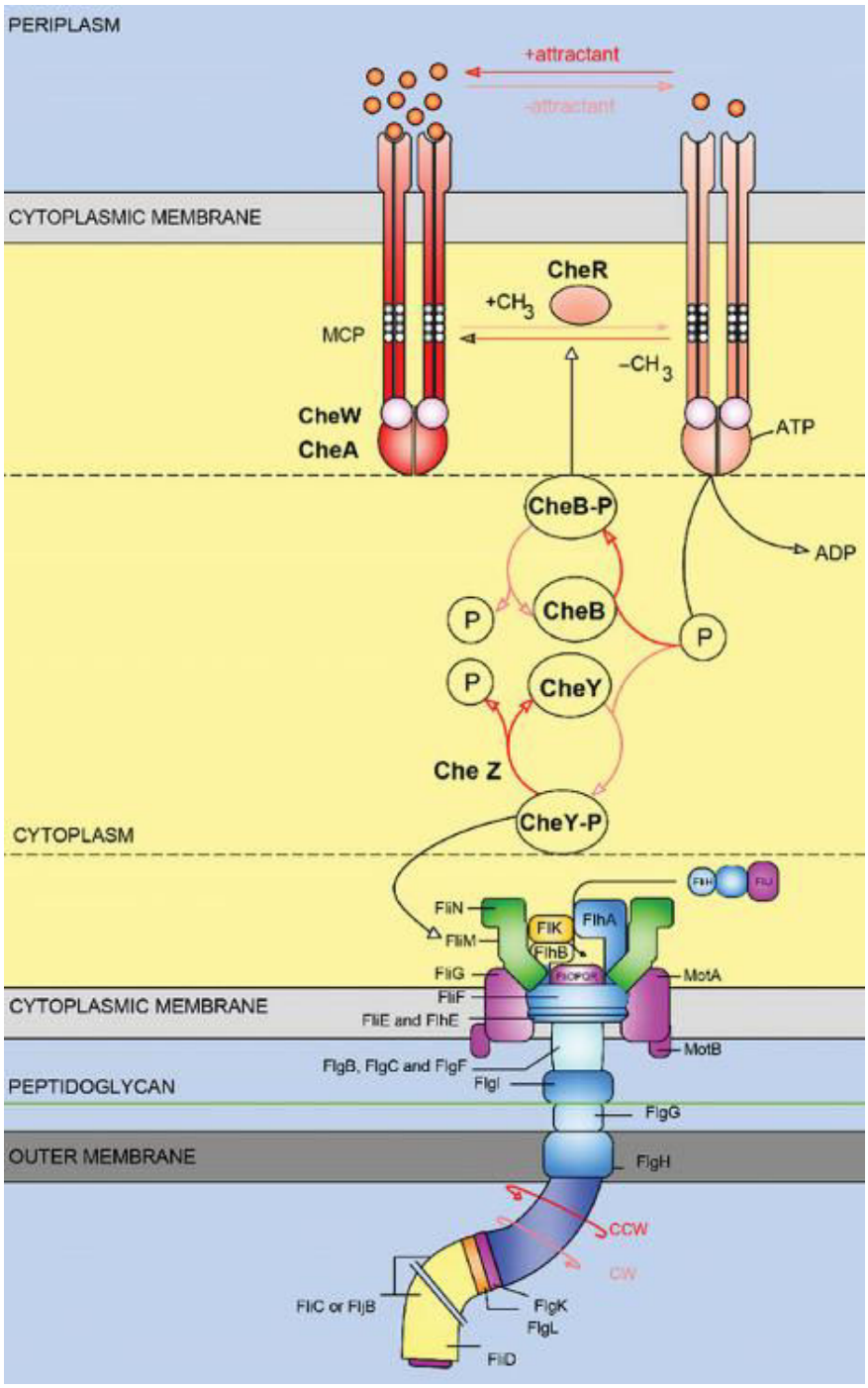


Figure 23: Représentation de la réponse chimiotactique impliquée dans la mobilité chez *P. aeruginosa*. (Sampedro et al., 2015) Les chimio-récepteurs perçoivent les molécules attractives (ligands). L'augmentation de la concentration des molécules attractives inhibe l'autophosphorylation de CheA, empêchant ainsi la phosphorylation du régulateur de réponse CheY, ce qui diminue la fréquence de rotation CW (clockwise, sens des aiguilles d'une montre, représenté par les flèches roses). En revanche, la diminution de molécules attractantes ou l'augmentation de molécules répulsives activent l'autophosphorylation de CheA, augmentant la fréquence de rotation CW. Les rotations flagellaires CW permettent à la bactérie de se réorienter aléatoirement alors que la rotation CCW (counterclockwise, sens opposé des aiguilles d'une montre, représenté par les flèches rouges) permet un déplacement dirigé. La phosphatase CheZ permet de déphosphoryler CheY. La réponse chimiotactique est également régulée par l'intermédiaire de méthylation et déméthylation des chimio-récepteurs *via* CheR et CheB, respectivement. MCP : methyl-accepting chemotaxis proteins.

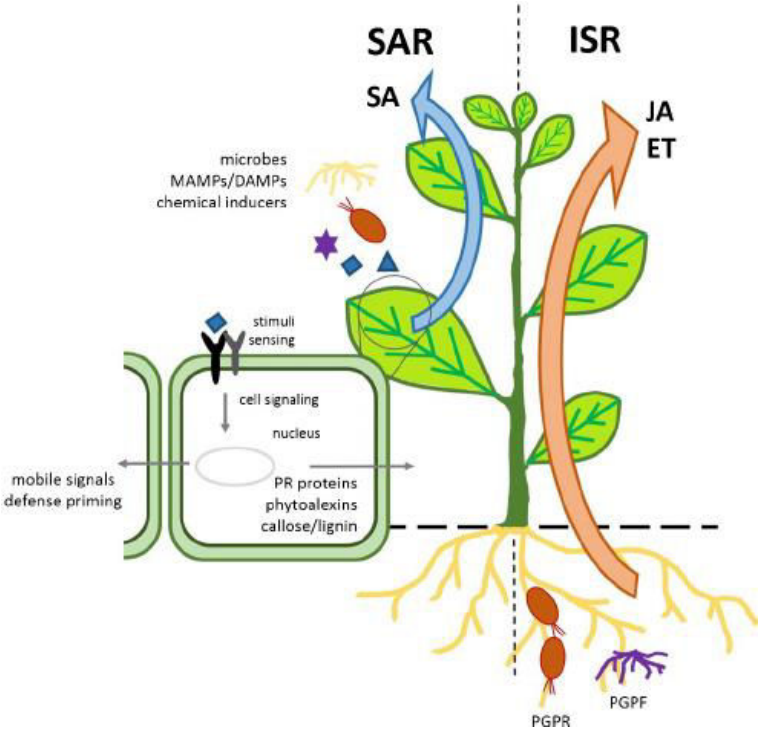


Figure 24: Schéma des différentes résistances systémiques de la plante. (Burketova et al., 2015). A gauche est représentée la résistance systèmique acquise (SAR) induite par l'attaque de pathogènes, par les MAMP et DAMP au niveau de la feuille, les phytohormones ou activateurs chimiques. La perception de ces signaux entraîne la production de protéines PR, des phytoalexines ou la fortification *via* la production de callose ou de lignine. A droite, la colonisation par les PGPR ou PGPF (plant-growth promoting fungi) induit la résistance systèmique induite (ISR) (indépendamement de l'acide salicylique (SA), *via* l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET).

Contrairement aux phytopathogènes qui induisent la résistance acquise systémique (SAR) dépendant de l'acide salicylique (SA), les rhizobactéries non pathogènes induisent le mécanisme de résistance ISR (résistance systémique induite) (van Loon et al., 1998) (figures 24 et 25), généralement indépendant de l'acide salicylique (Hol et al., 2013), excepté pour quelques cas (van de Mortel et al., 2012). L'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont des régulateurs importants de l'ISR. Cependant, les PGPR n'influencent pas l'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante mais « préparent » la défense de la plante. Cette dernière se défendra alors plus rapidement face à une attaque ultérieure d'un pathogène.

Les souches productrices de DAPG *P. fluorescens* Q2-87, Q8r1-96 et HT5-1 ainsi que *P. protegens* Pf-5, induisent la résistance systémique (dépendant de l'acide jasmonique et de l'éthylène), au niveau des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* contre *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Weller et al., 2012). L'induction de l'ISR par des

mutants de la souche Q2-87, ne produisant plus de DAPG (*phlD* ou *phlBC*), est fortement réduite. De plus, du DAPG synthétique ajouté dans le sol, avant l'infection par *P. syringae* pv *tomato*, permet de réduire les symptômes (présence de lésions ou de nécrose), soulignant l'importance du DAPG dans l'induction de résistance d'*A. thaliana.* Quant à la souche *P. fluorescens* SS101, isolée de la rhizosphère du blé, elle induit la résistance systémique d'*A. thaliana* contre *P. syringae* pv *tomato*,*via* la voie de l'acide salicylique (van de Mortel et al., 2012).

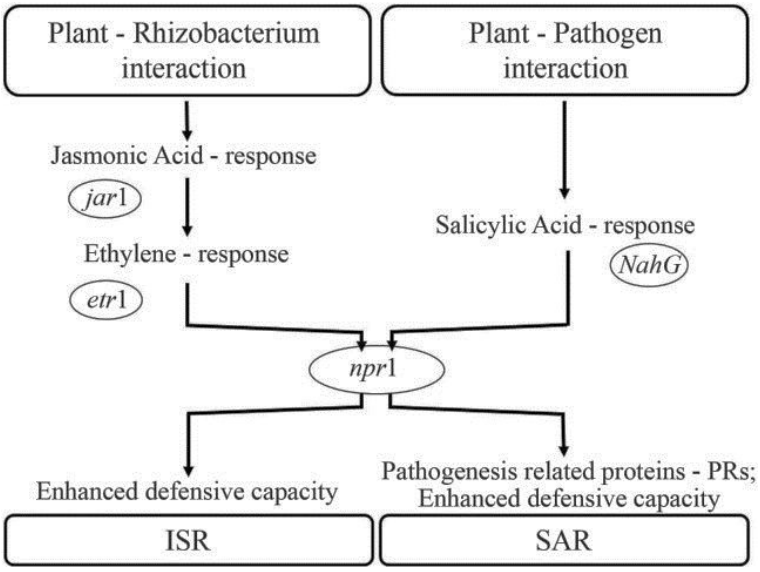


Figure 25: Voie de transduction de signal des diférentes résistances systèmiques d'*Arabidobsis thaliana*. (Beneduzi et al., 2012). Les pathogènes induisent la résistance systèmique acquise (SAR) alors que les rhizobactéries induisent la résistance systèmique induite (ISR).

2) Eliciteurs

Les éliciteurs sont une appellation pour les composants conservés présents chez les micro-organismes, dont des épitopes sont reconnus par les récepteurs PRR des plantes (Burketova et al., 2015; Newman et al., 2013). La perception de ces composants (BDC : bacteria-derived compound) permet d'induire la défense de la plante (MTI : MAMP-triggered immunity). La flagelline, le facteur d'élongation EF-Tu, le peptidoglycane, les exopolysaccharides, le lipopolysaccharide (dont l'antigène O), les sidérophores (pyoverdine, pyochéline…), les rhamnolipides mais aussi le DAPG, peuvent être par exemple reconnus par la plante (Burketova et al., 2015; Newman et

al., 2013). La plante peut également reconnaitre les effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III (SST3) comme HpaG et HrpN, qui représentent un danger pour la plante une fois injectés dans le cytoplasme (Burketova et al., 2015).

Les DAMP correspondent à des produits de dégradation de la plante, résultant d'une activité enzymatique d'un pathogène. La plante est « avertie » d'une agression locale *via* ces DAMP. Par exemple, l'acide galacturonique, qui est issu de la dégradation de la pectine constituant de la paroi végétale, constitue un DAMP. La majorité des structures bactériennes reconnues par les plantes sont des facteurs extracellulaires ou présents à la surface bactérienne. Ces structures sont liées à l'existence chez la bactérie de mécanismes qui permettent le transport de molécules du cytoplasme bactérien vers le milieu extracellulaire ou de la paroi : les systèmes de sécrétion.

II. Les Systèmes de sécrétion

A. Généralités

Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi est constituée d'une membrane interne et d'une membrane externe, séparées par un espace périplasmique contenant du peptidoglycane. Pour s'adapter à l'environnement, entrer en compétition avec d'autres micro-organismes ou bien être virulentes envers un hôte, différentes machineries sont nécessaires pour la sécrétion de protéines à travers la paroi bactérienne. En tout, six systèmes de sécrétion, numérotés de 1 à 6, ont été particulièrement décrits chez les bactéries à Gram négatif (figure 26). Le système de sécrétion de type I (SST1), le système de sécrétion de type III (SST3), le système de sécrétion de type IV (SST4) et le système de sécrétion de type VI (SST6) sont impliqués dans la sécrétion d'exoprotéines qui traversent la double barrière hydrophobe en une seule étape (Bleves et al., 2010; Costa et al., 2015). Contrairement aux précédents, le système de sécrétion de type II (SST2) ainsi que le système de sécrétion de type V (SST5) permettent le passage de protéines à travers l'enveloppe bactérienne en deux étapes : d'abord le passage de la membrane interne vers le périplasme puis la traversée de la membrane externe (Bleves et al., 2010; Costa et al., 2015).

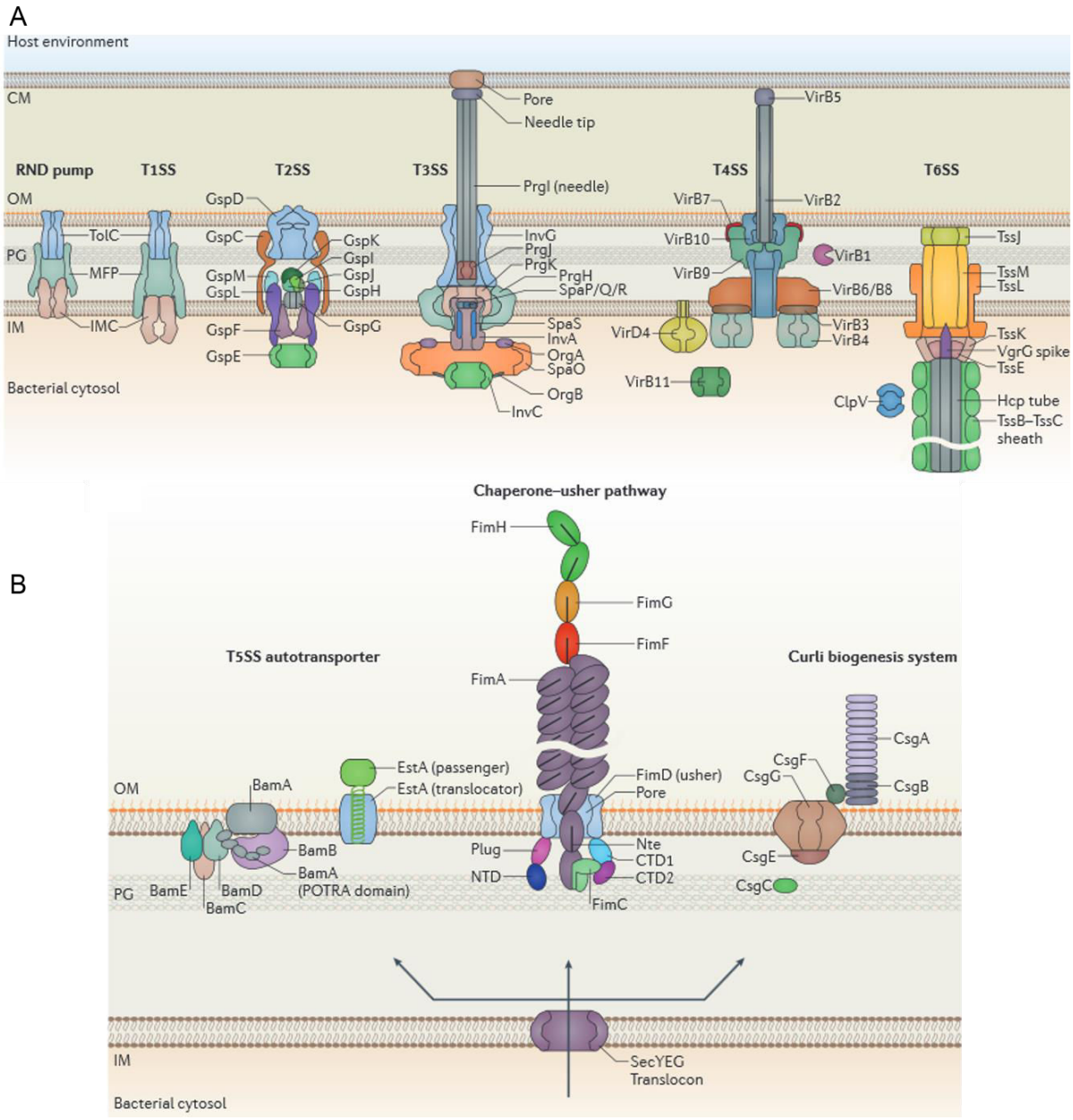


Figure 26: Structures de différents systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif. Adapté de (Costa et al., 2015). Ces structures traversent soit les deux membranes (A) soit uniquement la membrane externe (B). OM : membrane externe ; IM : membrane interne et PG : peptidoglycane.

A ce jour, 3 autres systèmes de sécrétion ont été décrits, numérotés de 7 à 9. La situation la plus ambiguë concerne le système de sécrétion de type VII (SST7) qui peut correspondre, selon les auteurs, soit au système d'export des pili de type I (appelé aussi le « chaperone usher pathway » (Desvaux et al., 2009) soit à un système décrit chez les *Mycobacteria,* appelé également ESAT-6 ou ESX (Abdallah et al., 2007). Le système de sécrétion de type VIII (SST8) est un système uniquement consacré à l'export des curlis. Ces curlis sont des fibres constituées d'agrégats protéiques qui sont

impliqués dans la formation de biofilm (Van Gerven et al., 2015). Enfin, le système de sécrétion de type IX (SST9) ou porSS est un système de sécrétion uniquement retrouvé chez certaines bactéries du phylum *Bacteroitedes.* Il permet la mobilité de type gliding pour certaines souches et l'injection d'effecteurs dans des cellules cibles pour d'autres (Lasica et al., 2017).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, parmi les systèmes de sécrétion de type 1 à 6, des gènes codant des SST1, SST2, SST3, SST5 et SST6 ont été retrouvés mais ceux codant pour le SST4 sont absents (Bleves et al., 2010). Dans la suite de ce chapitre, seul le système de sécrétion de type 6 sera développé.

B. Le système de sécrétion de type VI

1) Historique et généralités

Le système de sécrétion de type VI (SST6) a été décrit pour la première fois par l'équipe de Pukatzki chez la souche de *Vibrio cholerae* V52 comme étant impliqué dans la cytotoxicité envers l'amibe *Dictyostelium discoideum* et les macrophages J774 (Pukatzki et al., 2006). Les auteurs montrent que ce système, codé par les gènes *vas*, permet la sécrétion des protéines Hcp (Haemolysin-coregulated protein), décrites auparavant dans la littérature comme des protéines sécrétées et co-régulées avec l'hémolysine HlyA (Williams et al., 1996). En raison de l'absence de séquence signal reconnaissable, les auteurs suggèrent que cette protéine Hcp traverserait la membrane externe *via* un système de sécrétion encore non identifié (Williams et al., 1996). La sécrétion des protéines Hcp a également été identifiée chez *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste chez les patients atteints de mucoviscidose (Mougous et al., 2006). Les gènes codant pour les protéines structurales du SST6 sont regroupés en cluster et sont largement répandus chez les bactéries à Gram négatif, notamment les γ-proteobactéries pathogènes et non pathogènes (Bingle et al., 2008; Boyer et al., 2009; Cascales, 2008) (figure 27). Le SST6 est structurellement et fonctionnellement homologue au bactériophage T4 (Basler, 2015; Cascales and Cambillau, 2012;

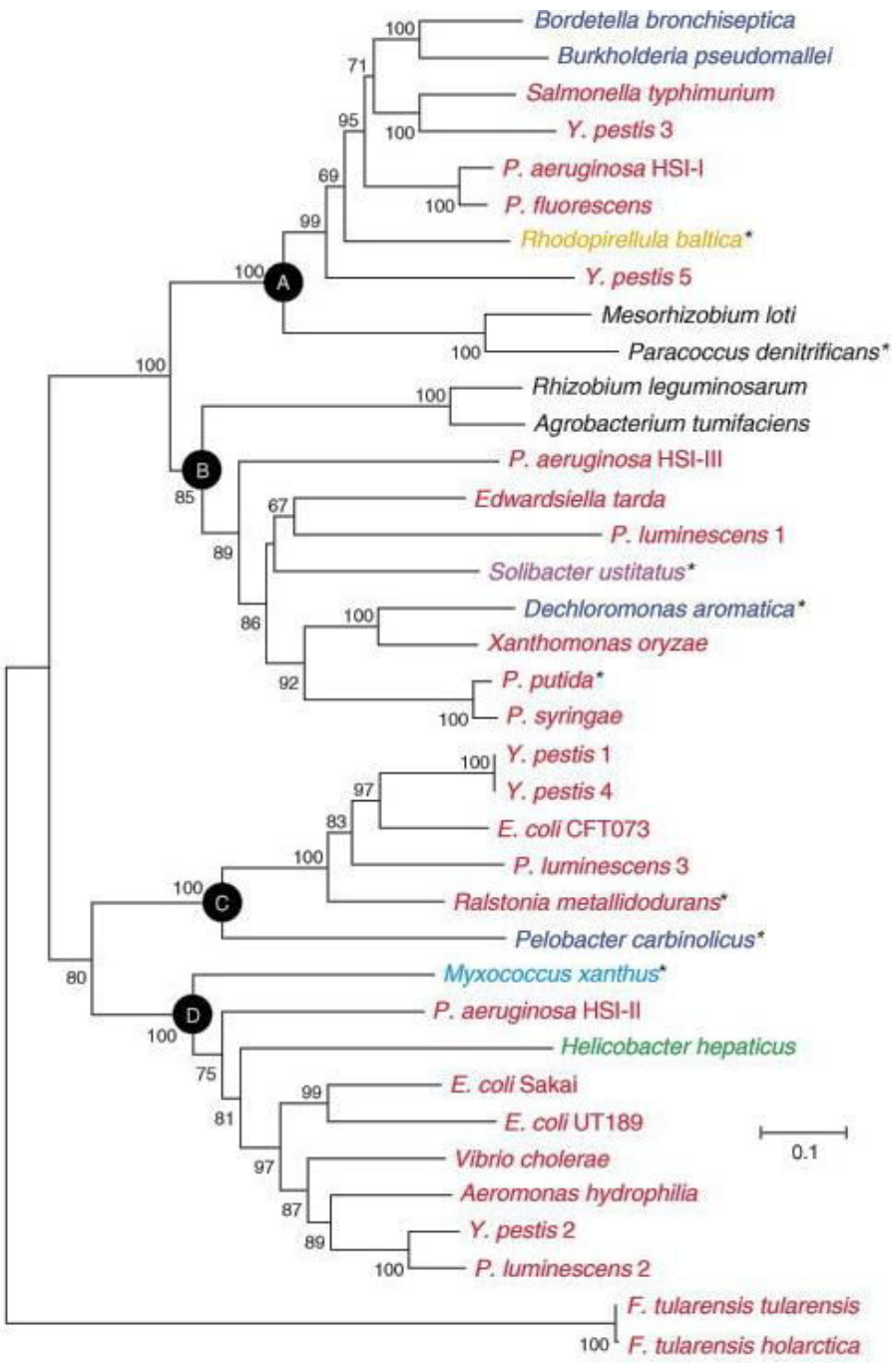


Figure 27: Distribution phylogénétique des SST6. (Bingle et al., 2008). Les couleurs correspondent aux différents taxons : Alpha-protéobactérie (noir), Bêta-protéobactérie (bleu), Gamma-protéobactérie (rouge), Delta-protéobactérie (turquoise), Epsilon-protéobactérie (vert clair), Acidobactérie (pourpre), Planctomycetes (jaune).

Cianfanelli et al., 2016; Cotter, 2011; Coulthurst, 2013; Ho et al., 2014; Planamente et al., 2016; Zoued et al., 2014) mais également avec les pyocines de type R (Ge et al., 2015). Plusieurs protéines du SST6 présentent des homologies de structures avec certains constituants des bactériophages (figure 28).

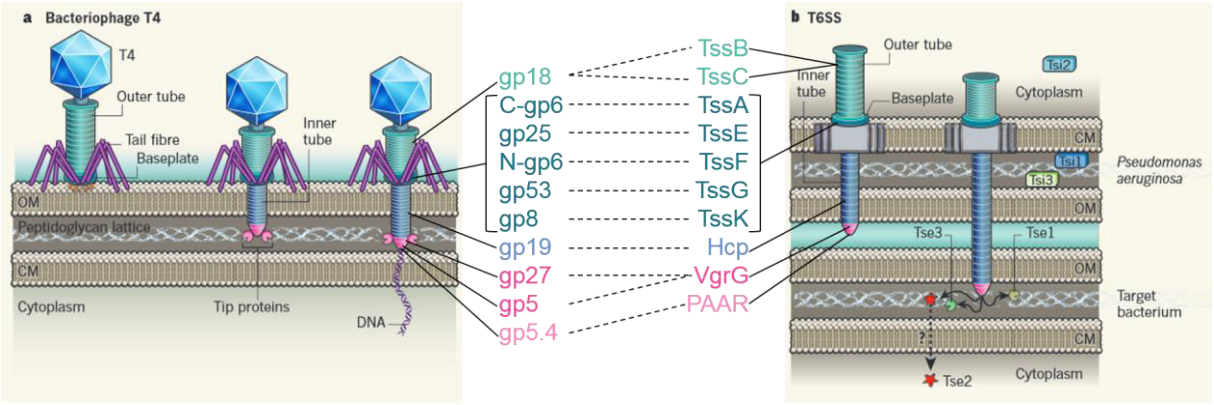


Figure 28: Comparaison des structures du bactériophage et du SST6. Adapté de (Cotter, 2011). Les composants présentant des homologies de structures apparaissent de la même couleur. Alors que le bactériophage s'attache sur la membrane externe de la cellule cible *via* ses fibres caudales, la machinerie du SST6 est ancrée dans l'enveloppe bactérienne (membranes interne et externe ainsi que le périplasme) *via* le complexe membranaire, absent chez les bactériophages. Le SST6 est dépourvu de fibres caudales (excepté chez *Myxococcus xanthus* qui présente des extensions similaires aux fibres caudales, figure 34). Les homologies de structures entre les composants du bactériophage T4 et le SST6 de *Pseudomonas aeruginosa* figurent au centre (traits en pointillée). Certaines protéines du core-component présentent des différences de séquences entre les espèces, par exemple TssA diffère entre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. IM : membrane interne et CM : membrane cytoplasmique.

En tout, il existe 13 gènes, dont l'expression permet la formation du « core-component » (Blondel et al., 2009; Boyer et al., 2009; Zheng and Leung, 2007). Ces gènes sont conservés et essentiels pour un SST6 fonctionnel. Ils sont notés *tssA* à *tssM* (pour type six secretion). A ces gènes du « core-component » peuvent s'ajouter des gènes codant pour des protéines accessoires, notés *tag* (pour type six secretion associated genes) (Shalom et al., 2007). Au sein des génomes bactériens, les clusters des gènes « core-component » peuvent être présents en plusieurs copies. Par exemple, deux clusters sont présents dans le génome de *P. fluorescens* Pf0-1 (Records, 2011) alors que chez *P. aeruginosa* PA01, il existe trois clusters notés H1- à H3-T6SS ou HSI-I à HSI-III (HSI-I ou H1-T6SS pour Hcp secretion island-I-encoded type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*) (Barret et al., 2011; Hood et al., 2010; Lesic et al., 2009; Mougous et al., 2007; Sana et al., 2012, 2015).

La présence des protéines Hcp et VgrG (Valine-glycine repeat protein G) (Pukatzki et al., 2009) dans le milieu extracellulaire prouve la présence d'au moins un SST6 fonctionnel.

2) Le SST6, un assemblage dynamique

Le SST6 est constitué de trois parties : le complexe membranaire, qui permet le système de s'ancrer dans l'enveloppe bactérienne, est formé par les trois protéines TssJ, TssM et TssL. Le complexe basal, constitué des protéines TssE, TssF, TssG et TssK (TssA et VgrG peuvent également être considérées comme composants du complexe basal), est localisé dans le cytoplasme et fait le lien entre le complexe membranaire et la queue contractile. Ce complexe est indispensable pour la polymérisation de la queue contractile et serait impliqué dans l'initiation de la contraction de la gaine. La queue contractile correspond au tube formé d'hexamères d'Hcp, entouré par la gaine formée par les protéines TssB et TssC. Un trimère de protéines VgrG (cell puncturing device) est localisé sur l'extrémité du tube d'Hcp, et peut être également terminé par une protéine à motif PAAR (Proline Alanine Alanine Arginine).

L'assemblage de la machinerie du SST6 se fait dans un ordre précis et TssA joue un rôle essentiel au cours de différentes étapes d'assemblage (Zoued et al., 2016a, 2017) (figure 29). Tout d'abord, le complexe membranaire se forme dans l'enveloppe bactérienne, permettant ainsi le positionnement du complexe basal. Ce complexe sert de plateforme pour l'assemblage de la queue contractile. La gaine, entourant le tube formé des hexamères d'Hcp, se contracte et propulse ainsi les protéines Hcp, VgrG ainsi que les effecteurs dans le milieu extracellulaire ou directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Après contraction, les composants de la gaine sont recyclés par l'ATPase ClpV (Caseinolytic peptidase V) et pourront servir à un nouvel assemblage. ClpV pourrait également recycler d'autres composants comme TssA par exemple (Planamente et al., 2016). Le complexe membranaire, toujours associé aux membranes, peut être utilisé lors d'un nouveau cycle d'assemblage.

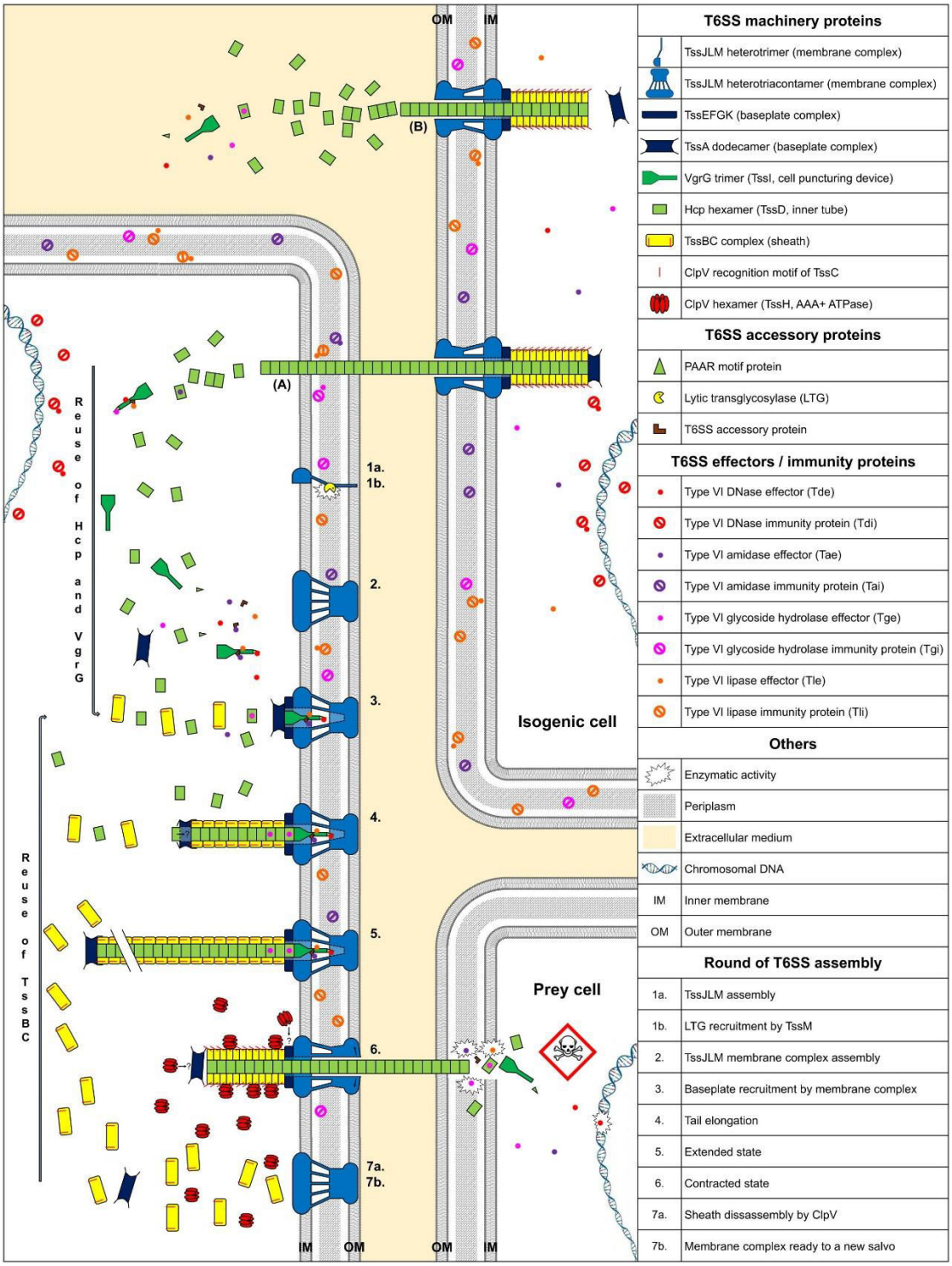


Figure 29: Mode d'assemblage du SST6. (Gallique et al., 2017b). Le complexe membranaire est ancré et s'assemble dans l'enveloppe bactérienne avec l'aide d'une transglycosylase (1a, 1b et 2). Initié par TssA, le complexe basal se positionne à la base du complexe membranaire (3), permettant ainsi l'assemblage du tube interne et de la gaine (4 et 5). La contraction de la gaine permet d'expulser les protéines Hcp, VgrG ainsi que les effecteurs dans le cytoplasme de la bactérie cible (A) ou dans le milieu extracellulaire (B). L'ATPase ClpV permet de recycler les composants de la gaine et peut-être d'autres protéines dont TssA (7a). Le complexe membranaire est toujours associé aux membranes et peut être utilisé lors d'un autre cycle d'assemblage. Les protéines Hcp et VgrG, injectées par une bactérie isogénique peuvent être utilisées pour un nouvel assemblage (A). Le point d'interrogation indique une hypothèse.

a) Le complexe membranaire

i. Structure du complexe membranaire TssJLM

Le complexe membranaire est une structure de 1,7 MDa qui traverse la membrane interne et le périplasme. Il est ancré dans la membrane externe *via* l'extrémité N-terminale de TssJ (Durand et al., 2015). Le complexe membranaire est composé de 10 copies de TssJ, TssM et TssL et présente une symétrie axiale d'ordre 5. Ce complexe sert de station d'accueil au complexe basal et évite les dommages sur l'enveloppe cellulaire lors de l'éjection du tube d'Hcp à travers la membrane. Le complexe TssJLM mesure environ 300 Å de haut avec un diamètre de 205 Å. Cette structure possède 5 arches internes et 5 arches externes, arrangées en anneaux concentriques (Durand et al., 2015), qui relient la base du complexe à la pointe (figure 30).

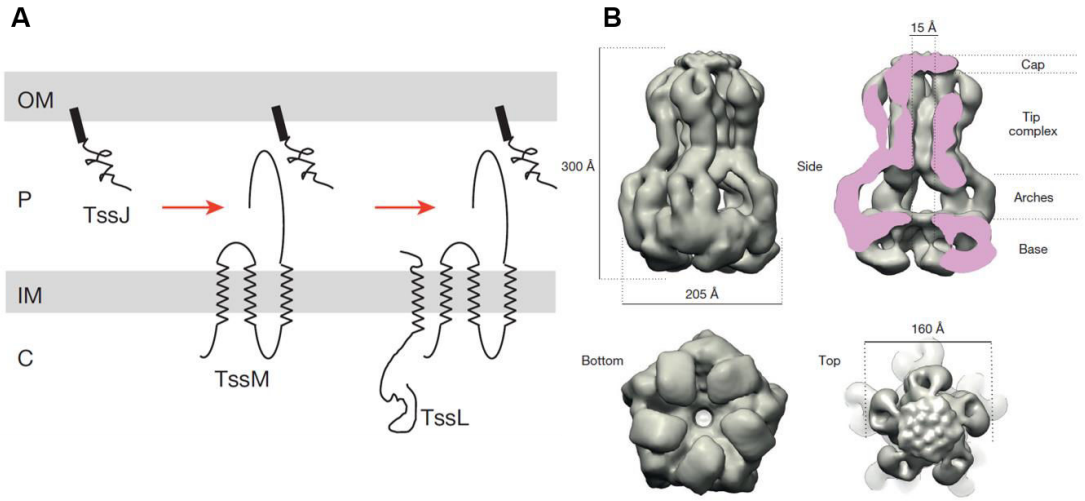


Figure 30: Assemblage et structure du complexe membranaire. Adapté de (Durand et al., 2015). A) Représentation schématique de l'assemblage des protéines TssJ, TssM et TssL dans l'enveloppe bactérienne. La lipoprotéine TssJ, localisée dans la membrane externe, recrute la protéine TssM au niveau du périplasme. TssM recrute à son tour la protéine TssL, localisée dans la membrane interne. B) Le complexe TssJLM : vues de côté, de dessous et de dessus. Les différentes régions du complexe sont indiquées sur la vue en haut à droite. OM : membrane externe, IM : membrane interne, P : périplasme et C : cytoplasme.

Les arches internes définissent un canal de 15 à 20 Å, trop petit par rapport à la largeur du tube d'Hcp (≈ 100 Å). Les auteurs proposent que lorsque le tube d'Hcp est éjecté à travers le complexe membranaire, les arches internes sont repoussées

vers l'extérieur, permettant ainsi le passage du tube (figure 31). La base du complexe est exposée au niveau du cytoplasme et permet d'interagir avec différents composants du complexe basal tel que TssE, TssG et TssK ainsi que la protéine de cap TssA (Logger et al., 2016; Zoued et al., 2016a, 2016b).

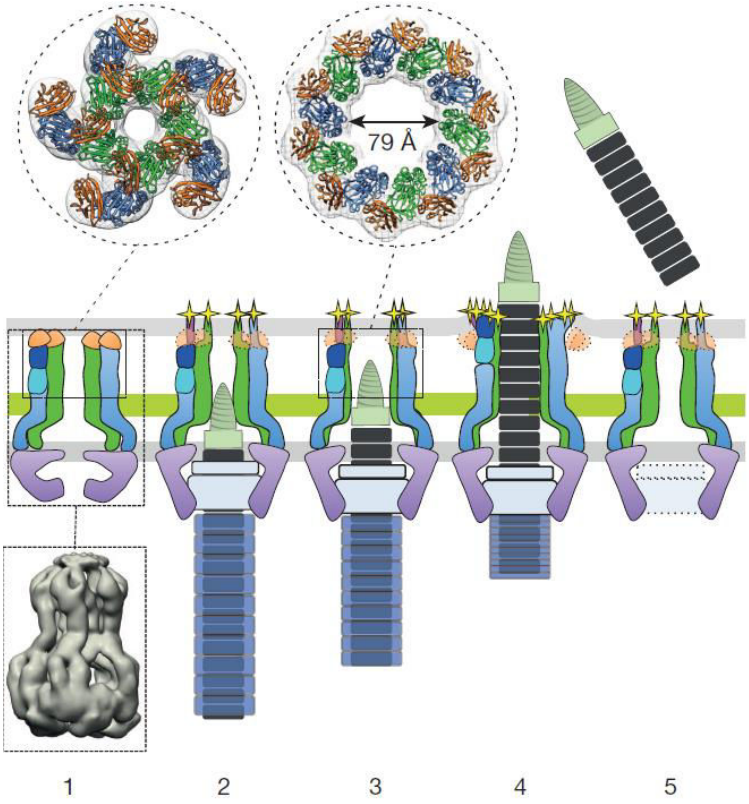


Figure 31: Modèle du complexe membranaire durant la sécrétion de l'aiguille Hcp/VgrG. (Durand et al., 2015). Le complexe membranaire n'est pas entièrement intégré dans la membrane interne (1). Lors de l'assemblage du complexe basal et de la queue contractile, l'extrémité C-terminale de TssM est accessible au niveau de la surface bactérienne (2). La propulsion du tube d'Hcp/VgrG ou la contraction de la gaine provoque un changement conformationnel de TssJLM (3 et 4). Une fois Hcp/VgrG éjecté dans le milieu extracellulaire, TssJLM retourne dans son état de « repos » et est prêt pour un nouveau cycle d'assemblage.

ii. Assemblage du complexe membranaire TssJLM

L'assemblage de ce complexe est initié par l'insertion de la lipoprotéine TssJ (environ 18 kDa) dans la membrane externe (Aschtgen et al., 2008; Zoued et al., 2014). TssJ possède un domaine localisé dans le périplasme qui interagit avec l'extrémité C-terminale de la partie périplasmique de TssM (Felisberto-Rodrigues et al., 2011; Nguyen et al., 2015). Il a été montré, chez *Serratia marcescens,* que les

protéines TssJ (appelées dans cet article SmLip) peuvent interagir entre elles (Rao et al., 2011). Chez des bactéries du genre *Acinetobacter*, certaines espèces sont dépourvues de protéines homologues à TssJ, ce qui suggère la présence d'autres protéines qui « remplaceraient » la fonction indispensable de la lipoprotéine (Weber et al., 2013, 2016).

La protéine TssM présente des homologies avec la protéine IcmF (Intracellular multiplication protein F) du SST4b (Bingle et al., 2008; Cascales, 2008; Ma et al., 2012). TssM possède trois domaines transmembranaires (Logger et al., 2016; Ma et al., 2009b; Nguyen et al., 2015) et un large domaine périplasmique. La protéine TssM est insérée dans la membrane interne. Chez une souche d'*Escherichia coli* entéro-agrégative (EAEC), le domaine cytoplasmique de TssM d'environ 35 kDa est présent entre les hélices transmembranaires TMH2 et TMH3 (Logger et al., 2016). La partie cytoplasmique de TssM est divisée en deux sous-domaines : un domaine NTPase (sans motif d'hydrolyse) qui interagit avec la protéine TssK et une extension C-terminale qui permet l'interaction avec le composant du complexe basal TssG, avec la région cytoplasmique de la protéine de membrane interne TssL et permet également l'oligomérisation de TssM (les domaines cytoplasmiques de TssM interagissent entre eux).

Il existe quelques cas particuliers pour la protéine TssM. Par exemple, chez *Agrobacterium tumefaciens*, TssM (qui possède un domaine NTPase, et des motifs Walker A et B) exercerait une activité ATPase qui serait essentielle pour l'assemblage du complexe TssM-TssL-Hcp ainsi que pour la sécrétion des protéines Hcp (Ma et al., 2009b, 2012). Dans ce cas, il semblerait que l'activité ATPase de TssM ait un rôle dans le recrutement de TssL puis des protéines Hcp, probablement lors de changement de conformation suite à la liaison à l'ATP. Cependant, le rôle de ce motif de liaison aux nucléotides triphosphates reste à éclaircir puisque chez une souche d'*Edwardsiella tarda*, le motif Walker A n'est pas requis pour la sécrétion des substrats du SST6 (Zheng and Leung, 2007). De plus, chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter rodentium* et *Escherichia coli* EAEC, le motif d'hydrolyse au niveau du domaine NTPase est absent (Logger et al., 2016).

Un autre cas particulier existe chez *Citrobacter rodentium*, qui produit deux variants de TssM, une protéine entière d'environ 130 kDa et une protéine tronquée d'environ 88 kDa (Gueguen et al., 2014). Ces deux formes existent selon un ratio fixe (3-4 fois

plus de la forme tronquée par rapport à la forme entière) et ces deux formes sont indispensables pour l'activité du SST6 chez cette souche. Ces deux variants résultent d'un décalage du cadre de lecture au niveau d'une zone riche en adénosines (11 adénosines successives) en amont d'un codon stop. Lors du dérapage de l'ARN-polymérase ADN-dépendante (+1 : l'enzyme « glisse » sur une base : 1 base n'est pas lue), le cadre de lecture est décalé et ceci conduit à la production de la protéine entière, plus longue (figure 32).

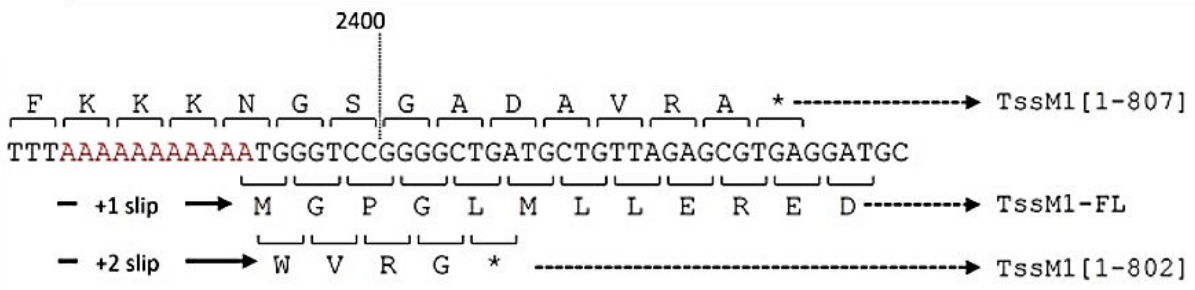


Figure 32: Représentation de la séquence de *tssM* et des traductions correspondantes chez *Citrobacter rodentium*. (Gueguen et al., 2014). Les A en rouges correspondent à la région riche en adénosine et les astérisques représentent les codons stop.

La protéine TssL présente des homologies avec la protéine IcmH (Intracellular multiplication protein F, également appelée DotU) du SST4b (Aschtgen et al., 2010a; Bingle et al., 2008; Cascales, 2008). La protéine TssL est associée à la membrane interne et interagit avec la partie cytoplasmique de TssM (Logger et al., 2016; Zoued et al., 2016b). Il est à noter que la protéine TssA est recrutée par le complexe TssJM, avant le recrutement de TssL (Zoued et al., 2016a, 2017), et pourrait agir comme une chaperonne qui contrôlerait la polymérisation du complexe membranaire (Zoued et al., 2017). Il est envisageable que TssA stabilise le complexe TssJLM avec une symétrie axiale d'ordre 6 plutôt que d'ordre 5 (la symétrie d'ordre 5 du complexe TssJLM a été montrée par Durand et al. en l'absence de TssA).

Le domaine cytoplasmique de TssL interagit avec deux composants du complexe basal TssE et TssK, mais également avec un domaine cytoplasmique d'une autre protéine TssL, permettant une oligomérisation (Durand et al., 2012a; Zoued et al., 2016b). Le domaine C-terminal de la protéine TssL possède un motif de liaison au peptidoglycane, nécessaire à son ancrage au niveau du périplasme (Aschtgen et al., 2010a; Ma et al., 2009b).

Cependant, la protéine TssL de certaines souches ne possède pas ce motif de liaison au peptidoglycane (Aschtgen et al., 2010a, 2010b). Dans ce cas, la protéine accessoire TagL est indispensable pour l'activité du SST6. En effet, TagL possède un motif de liaison au peptidoglycane, amenant à l'ancrage du SST6 dans le périplasme *via* cette protéine accessoire. TagL correspondrait dans ce cas-là à un domaine « ancestral » de TssL.

Récemment, chez *Acinetobacter baumannii* la protéine accessoire TagX a été décrite. Cette protéine est une hydrolase indispensable pour le fonctionnement du SST6 (Weber et al., 2016), localisée dans le peptidoglycane. Par ailleurs, chez les bactéries du genre *Acinetobacter*, aucun gène codant pour la lipoprotéine TssJ n'a été retrouvé (Weber et al., 2013).

Une autre protéine MltE, une transglycosylase lytique (LTG : lytic transglycosylase) nécessaire pour la fonctionnalité du SST6 (Santin and Cascales, 2017) vient d'être mise en évidence. Elle est requise lors de l'assemblage du complexe membranaire (figure 33). MltE interagit avec le domaine périplasmique de TssM, stimulant ainsi l'activité hydrolase qui conduit à l'oligomérisation de TssM et la biogénèse du complexe TssJLM de 1,7 MDa.

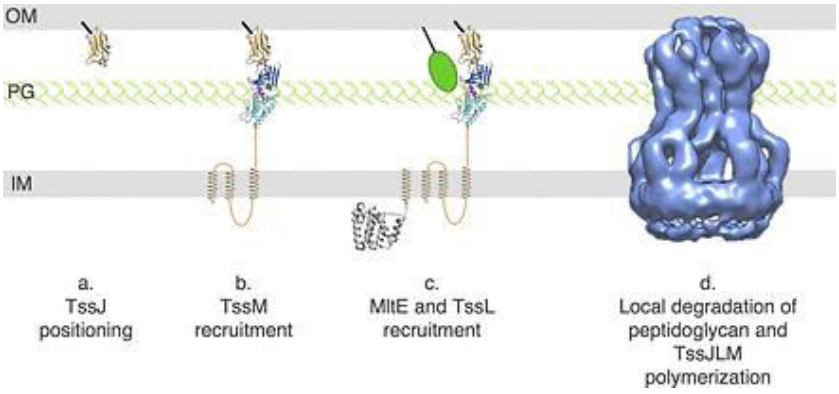


Figure 33: L'assemblage du complexe membranaire nécessite l'activité hydrolase de MltE. (Santin and Cascales, 2017). MltE, qui interagit avec TssM, permet de dégrader le peptidoglycane localement et facilite la polymérisation des trimères TssJLM entre eux.

Récemment, le SST6 de *Myxococcus xanthus* a été observé en microscopie électronique (Chang et al., 2017) (figure 34). Les auteurs ont découvert de nouvelles structures, similaires aux fibres caudales des bactériophages, qui sont des extensions

de la membrane externe vers le milieu extérieur, proches du complexe membranaire. Concernant cette observation, de nombreuses question se posent. Cette forme est-elle typique de *M. xanthus* ? D'autres espèces possèdent-elles ce type de structure, encore non identifiée? Mais surtout, ces antennes permettraient-elles de reconnaitre une cellule cible et de s'y accrocher, comme lors des interactions bactériophage-cellule cible ?

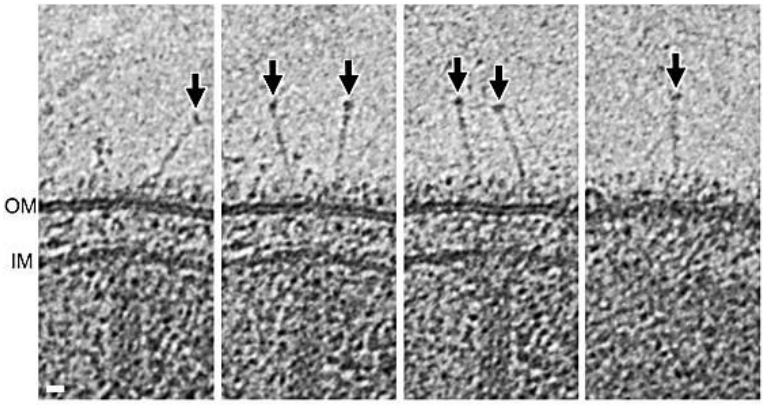


Figure 34: Observation par microscopie électronique des « antennes » du SST6 chez *Myxococcus xanthus*. (Chang et al., 2017). La présence d'antennes est pointée avec les flèches noires. IM : membrane interne et OM : membrane externe.

b) Le complexe basal

i. Structure du complexe basal TssEFGKI et la protéine de cap TssA

Chez le bactériophage, le complexe basal permet un assemblage correct du tube, initie la polymérisation de la gaine et déclenche la contraction de la gaine (Leiman and Shneider, 2012). En ce qui concerne le complexe basal du SST6, il reste encore plusieurs points d'interrogation, notamment sur la chronologie d'assemblage des différents composants et l'implication du complexe dans le déclenchement de la polymérisation de la gaine. Des analyses comparatives d'homologies de structures entre les composants du complexe basal du bactériophage et les protéines du « core-component » du SST6 permettent de prédire les protéines du complexe basal du SST6 (Brunet et al., 2015). L'étude de la structure du complexe basal du bactériophage T4 (Taylor et al., 2016) permet également d'avoir une idée sur l'organisation de ce complexe du SST6 (figure 35).

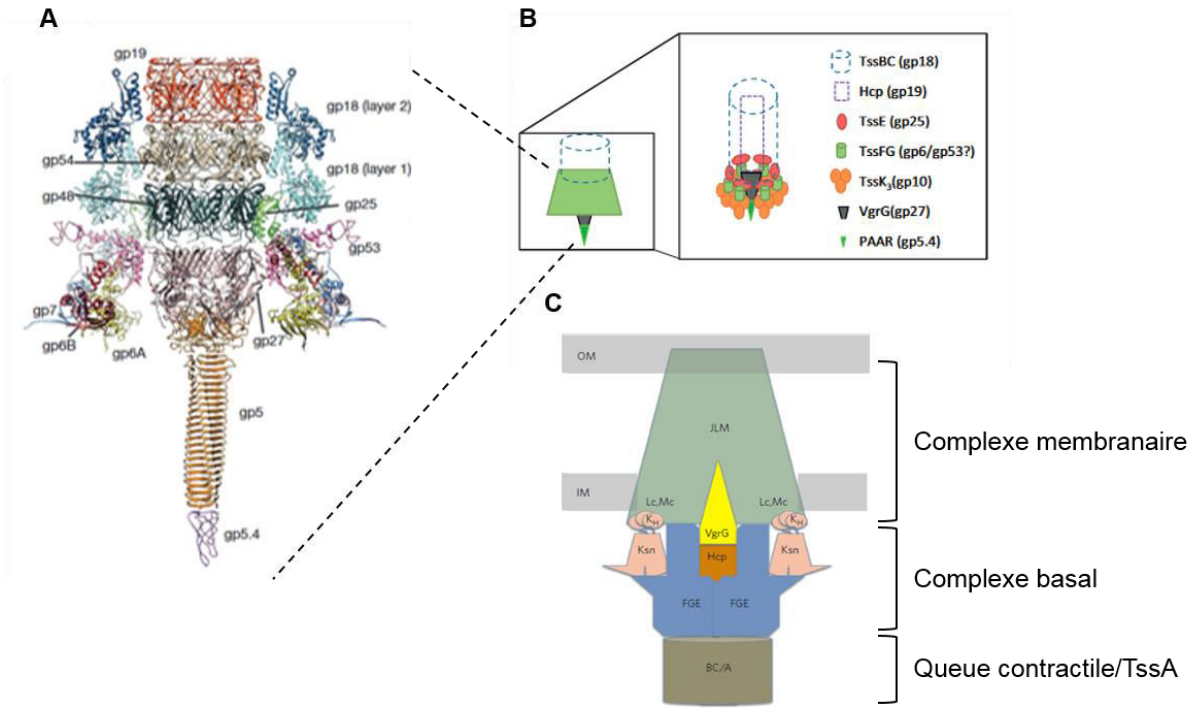


Figure 35: Comparaison entre les structures du complexe basal du bactériophage T4 et celui du SST6. Adapté de (Taylor et al., 2016), (Brackmann et al., 2017) et (Nguyen et al., 2017). A) Organisation et structure tridimensionnelle des différentes protéines du complexe basal du bactériophage T4. B) Selon les homologies de structure avec le bactériophage T4, Brackmann et collaborateurs proposent un modèle de la répartition de TssEFGKI au niveau du complexe basal du SST6. C) Modèle représentatif des interactions entre les différents composants du complexe basal, structure intermédiaire entre le complexe membranaire et la queue contractile Hcp/TssBC.

Cependant, il a été montré que le complexe basal du SST6 est constitué des protéines TssA, TssE , TssF, TssG, TssK et VgrG (Brunet et al., 2015). En effet, ces protéines sont indispensables pour l'assemblage correct des anneaux hexamériques d'Hcp. Les anneaux d'Hcp s'empilent les uns sur les autres et peuvent s'assembler *in vitro* selon différentes orientations : « head-to-tail », « tail-to-tail » et « head-to-head » (figure 36) (Brunet et al., 2014). Cependant, *in vivo* (dans le cytoplasme d'*E. coli* EAEC), les hexamères d'Hcp s'empilent selon la conformation « head-to-tail ». Des mutations des gènes *vgrG*, *tssA*, *tssE*, *tssF*, *tssG* et *tssK* entraînent un empilement des hexamères d'Hcp de manière aléatoire, c'est-à-dire que les trois formes d'assemblage sont retrouvées (head-to-tail, tail-to-tail et head-to-head) (Brunet et al., 2015). Par conséquent, les protéines VgrG, TssA, TssE, TssF, TssG et TssK sont requises pour un assemblage correct des anneaux d'Hcp et pour un SST6 fonctionnel.

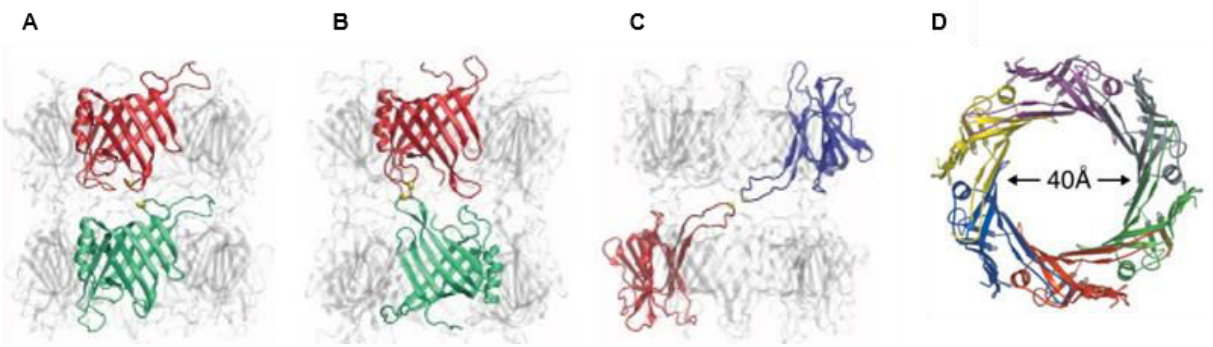


Figure 36: Les différents types d'assemblage des hexamères d'Hcp chez *Escherichia coli* EAEC. Adapté de (Brunet et al., 2014) et (Filloux et al., 2008). A) Head-to-tail. B) Tail-to-tail. C) Head-to-tail. Les points jaunes correspondent à la localisation des cystéines. D) Représentation de la structure tridimensionnelle d'un hexamère d'Hcp vue de dessus.

ii. Assemblage du complexe basal TssEFGKI et importance de TssA

TssA forme un dodecamère (deux hexamères qui s'empilent en conformation head-to-head) qui se fixe en premier lieu sur le complexe membranaire (Zoued et al., 2016a) (figure 37). Une fois accroché au niveau de la base du complexe membranaire, le complexe TssA peut recruter TssE, TssK et VgrG (Planamente et al., 2016; Zoued et al., 2016a) et ainsi initier l'assemblage du complexe basal au niveau du complexe membranaire. Cependant, TssA n'est pas considéré comme un composant du complexe basal en soi, puisqu'il n'est présent que provisoirement au niveau du complexe basal (Zoued et al., 2016a), décrit ci-après. Néanmoins, chez *Pseudomonas aeruginosa*, la protéine TssA serait localisée au niveau du complexe basal et non au niveau de l'extrémité distale de la queue contractile (Planamente et al., 2016).

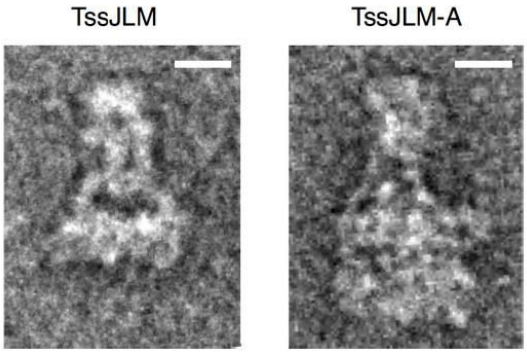


Figure 37: Observation par microscopie électronique de TssA associée au complexe membranaire. (Zoued et al., 2016a). A gauche, le complexe membranaire seul (TssJLM) ou à droite associé avec le complexe TssA (TssJLM-A).

Il a été montré que le TssF et TssG forment un complexe stable *in vitro* (Brunet et al., 2015; English et al., 2014). Le composant TssF interagit avec le tube d'Hcp alors que TssG interagit à la fois avec le tube d'Hcp, avec un des deux composants de la gaine (TssC), avec un autre composant du complexe basal (TssE) (Brunet et al., 2015), mais également avec la région cytoplasmique de TssM. English et collaborateurs mettent en évidence que TssK, TssF et TssG forment un complexe stable selon un ratio 12:6:3 (>670 kDa) mais qui peut exister aussi selon un ratio 4:2:1 d'environ 385 kDa (English et al., 2014).

La protéine TssK, recrutée par TssA (Zoued et al., 2013, 2016a) interagit avec le complexe TssFG (Brunet et al., 2015; English et al., 2014; Nguyen et al., 2017). TssK est présente dans le cytoplasme, pourtant une partie de la protéine TssK est localisée au niveau de la membrane interne (English et al., 2014). TssK est une protéine qui forme un trimère (English et al., 2014; Nguyen et al., 2017; Zoued et al., 2013). TssK possède trois domaines : un domaine N-terminal présentant des homologies avec une protéine de liaison aux récepteurs d'un phage (RBP : receptor-binding protein) noté $TssK_S$ (pour shoulder), une partie intermédiaire appelée $TssK_N$ (pour neck) et une région C-terminale appelée $TssK_H$ (pour head) (Nguyen et al., 2017). Les auteurs ont montré que la région $TssK_N$ (N-terminale) interagissait avec le complexe FG alors que $TssK_H$ (C-terminale) permettait l'interaction avec les domaines cytoplasmiques de TssM et de TssL. La région C-terminale de TssK est flexible et permettrait de maintenir l'ancrage du complexe basal au complexe membranaire. TssK interagit également avec Hcp et TssC (Zoued et al., 2013), soulignant ainsi que TssK est à l'interface entre le complexe membranaire, le complexe basal et la queue contractile.

TssE présente une similarité de séquence (environ 40%) avec la glycoprotéine gp25 du phage T4 et est cruciale pour la sécrétion des protéines Hcp et VgrG (Lossi et al., 2011). Contrairement à la glycoprotéine gp25, TssE ne semble pas posséder d'activité de type lysozyme. TssE interagit avec des protéines du complexe basal (TssA, TssF et TssG) mais également avec TssC, un des deux composants de la gaine (Brunet et al., 2015; Zoued et al., 2016a).

La protéine VgrG est à la fois considérée comme un composant du complexe basal et comme une protéine structurale terminant le tube interne d'Hcp, impliquée dans le transport des toxines. Je détaillerai le trimère VgrG ci-après en tant que « cell-puncturing device ».

Conscient que les interactions décrites ci-dessus sont lourdes, j'ai répertorié les différentes interactions entre les protéines du « core-component » des différents complexes du SST6 afin de simplifier au maximum l'interactomique (figure 38).

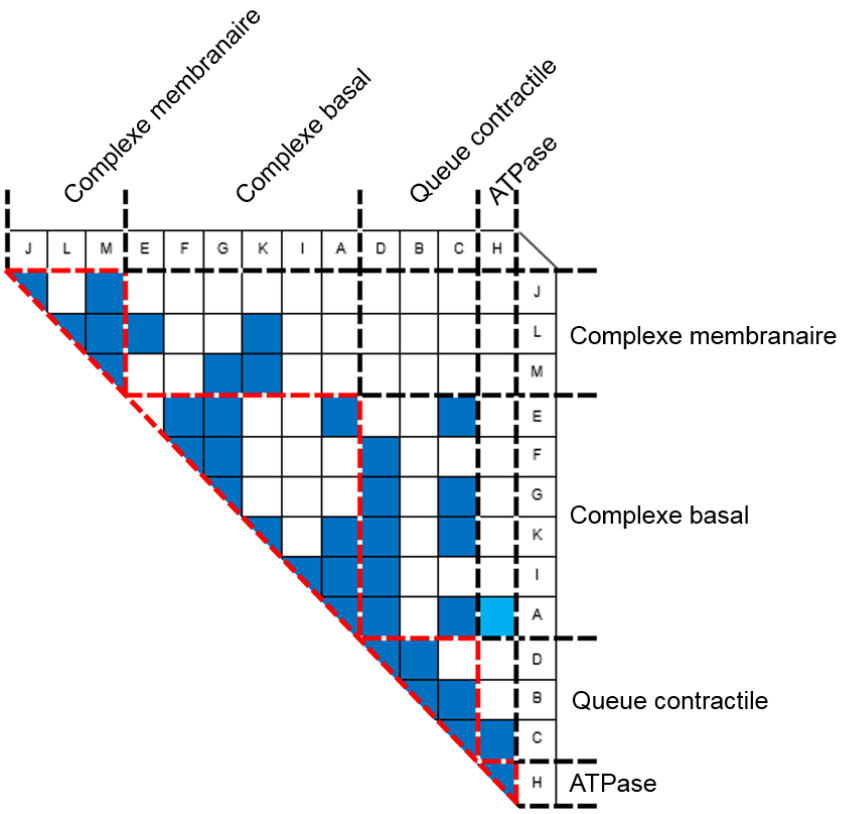


Figure 38: Synthèse des interactions entre les différents composants du SST6 chez *E. coli* EAEC. (non publié). Les traits noirs en pointillés délimitent les complexes entre eux. Les traits rouges en pointillés entourent un réseau d'interactions au sein d'un même complexe. La couleur bleue foncée correspond à une interaction entre les deux protéines (par méthodes BACTH ou par co-immuno-précipitation), la couleur bleue claire décrit une probable interaction et l'absence de couleur montre une non-interaction. Ce tableau ne représente pas l'interaction entre le complexe TssFG et TssK et TssI. Il est à noter que TssA1 de *Pseudomonas aeruginosa* interagit avec TssF1 et TssB1 (Planamente et al., 2016).

c) La queue contractile

i. Structure de la queue contractile TssBCDI et importance de TssA

La queue contractile correspond au tube interne formé des anneaux hexamériques d'Hcp entourés de la gaine formée par les protéines TssB et TssC. Le trimère VgrG termine le tube d'Hcp et serait impliqué dans la perforation de la membrane de la

cellule cible. La formation du long tube d'Hcp est requise pour la polymérisation de la gaine alors que la gaine n'est pas essentielle pour l'assemblage du tube interne (Brunet et al., 2014). Des images de microscopie électroniques montrent de longues structures correspondant à la queue contractile pouvant dépasser 1 µm de longueur (Basler et al., 2012).

Les protéines Hcp (Haemolysin coregulated protein) ont été décrites pour la première fois comme étant des protéines co-régulées avec l'hémolysine HlyA (Williams et al., 1996), et associées au SST6 à partir de 2006 (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Généralement, les gènes *hcp* sont présents en multiples copies au sein du génome bactérien et peuvent être retrouvés en dehors du cluster codant pour la machinerie du SST6 (Barret et al., 2011). Par exemple, chez la souche *P. fluorescens* MFE01, les gènes *hcp1, hcp2* et *hcp3* sont retrouvés en dehors du cluster du SST6 (Decoin et al., 2014, 2015; Gallique et al., 2017a).

Dans l'environnement de ces gènes *hcp*, il n'est pas rare de trouver les gènes codant pour les protéines VgrG, des adaptateurs, ainsi que des gènes codant pour les toxines et antitoxines (Joshi et al., 2017). Les protéines Hcp forment des anneaux hexamériques d'environ 80-85 Å avec une lumière interne d'environ 40 Å (Mougous et al., 2006). Décrits précédemment, les protéines VgrG et les composants du complexe basal sont nécessaires à un assemblage correct du tube interne formé par les protéines Hcp (conformation head-to-tail) (Brunet et al., 2014, 2015). Les anneaux s'empilent sans rotation de type hélicoïdale (Brunet et al., 2014; Douzi et al., 2016). Ge et collaborateurs ont montré que, contrairement aux bactériophages ou aux pyocines, la lumière interne du tube d'Hcp est neutre, ce qui suggère que le transport des toxines au niveau de la lumière d'Hcp est passif (pas de déplacement à l'intérieur du tube interne, les toxines restent fixées) (Ge et al., 2015). Hcp n'est pas seulement une protéine structurale, cette dernière peut également être chaperonne et permettre la sécrétion de toxine ou même posséder une extension C-terminale effectrice (appelé Hcp-ET: Haemolysin coregulated protein with C-terminal extension toxins) (Bleves, 2017; Ma et al., 2017a). Les toxines peuvent directement interagir avec la lumière interne de l'hexamère d'Hcp (Silverman et al., 2013). En prenant en considération la taille de la lumière interne, les protéines Hcp peuvent transporter des effecteurs dont la taille est inférieure à 50 kDa (Silverman et al., 2012). Les Hcp-ET sont largement répandues chez les entérobactéries: 350 Hcp-ET retrouvées chez 17 espèces

d'entérobactéries (Ma et al., 2017a). Par exemple, Hcp-ET1, délivrée par le SST6-2 de la souche *E. coli* STEC004 (STEC : shiga toxin-producing *E. coli*) possède une extension C-terminale HNH-DNase, qui dégrade l'ADN de la cellule cible et est neutralisée par la protéine d'immunité ETI-1 (codée en aval de *hcp-et1*) (Ma et al., 2017a). Chez la souche *E. coli* ETEC (*E. coli* entéro-toxigenique), Hcp-ET2 contient au niveau de la région C-terminale un domaine conservé DUF2235 et une séquence conservée GxSxG caractérisée comme motif catalytique des lipases Tle1 (Type VI lipase effector) (Flaugnatti et al., 2016; Ma et al., 2017a; Russell et al., 2013).

La protéine VgrG (ou TssI) forme un trimère et possède des homologies structurales avec les glycoprotéines gp27 et gp5 du bactériophage T4, qui est nécessaire à la perforation de l'enveloppe de la cellule cible (Bönemann et al., 2010; Leiman et al., 2009; Pukatzki et al., 2007). En effet, la partie N-terminale de VgrG (« head »), qui interagit avec un hexamère d'Hcp, est similaire à la protéine gp27 alors que la partie C-terminale (« spike ») correspond plutôt à la protéine gp5 où le domaine lysozyme est absent (Bondage et al., 2016; Leiman et al., 2009; Pukatzki et al., 2007) (figure 39).

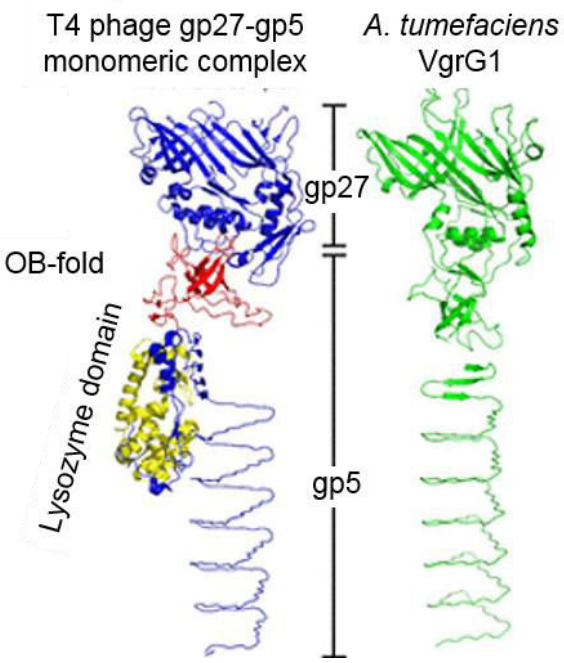


Figure 39: Comparaison entre les structures de la pointe du bactériophage T4 et de VgrG. (Bondage et al., 2016). Le monomère VgrG1 d'*Agrobacterium tumefaciens* présente des homologies structurales avec le complexe gp5-gp27 (monomère) du bactériophage T4 mais ne possède pas le domaine lysozyme.

La base du trimère VgrG compte six domaines tonneaux β (une paire pour chaque VgrG), donc d'une symétrie d'ordre six et interagirait directement avec l'hexamère d'Hcp (Cascales and Cambillau, 2012). Il existe des différences entre les VgrG : par exemple la protéine VgrG de la souche *E. coli* CFT073 possède un domaine OB (oligonucleotide/oligosaccharide-binding) (Cascales and Cambillau, 2012) alors que VgrG-1, VgrG-2 et VgrG-3 de *Vibrio cholerae* V52 ne possèdent pas ce domaine (Pukatzki et al., 2007).

La structure tridimensionnelle du trimère VgrG1 de *P. aeruginosa* a récemment été décrite (Spínola-Amilibia et al., 2016) (figure 40). Chez le bactériophage T4, le complexe gp5-gp27 forme un trimère $(gp5)_3$-$(gp27)_3$ (Leiman et al., 2010) (figure 40). Il existe également des VgrG dits « évolués », c'est-à-dire possédant des extensions au niveau de l'extrémité C-terminale, qui ont une activité enzymatique. Par exemple, le domaine ACD (actin crosslinking domain) permet de remanier le cytosquelette d'actine et inhibe la polymérisation de l'actine lorsque *V. cholerae* est phagocyté (Durand et al., 2012b; Hachani et al., 2016; Ma et al., 2009a; Pukatzki et al., 2007; Satchell, 2009) (figure 41). De même, VgrG1 d'*Aeromonas hydrophila* possède une extension C-terminale ADP-ribosyltransferase (ADPRT) qui entraine une dépolymérisation de l'actine (Suarez et al., 2010).

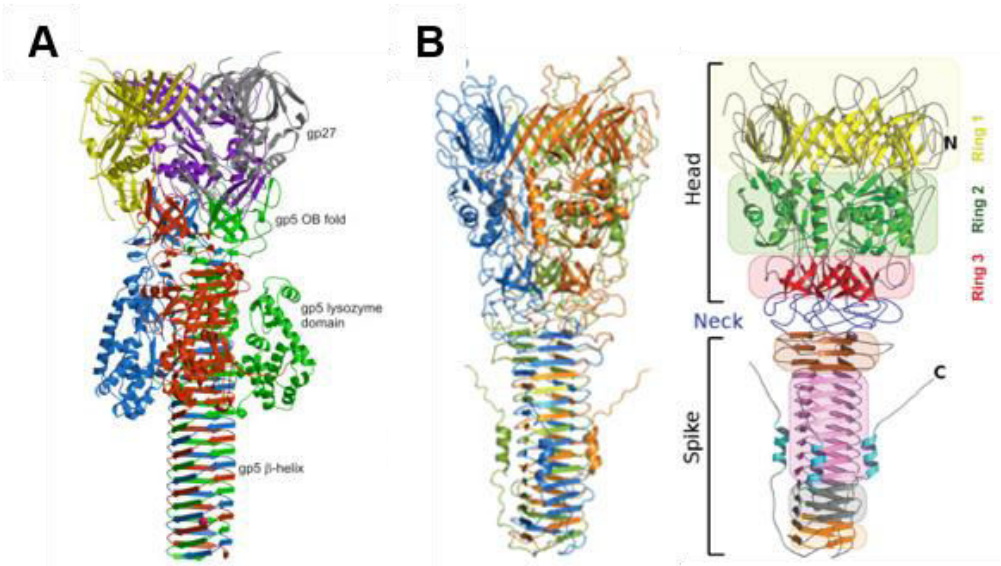


Figure 40: Structure tridimensionnelle du complexe $(gp5)_3$-$(gp27)_3$ et du trimère de VgrG1. Adapté de (Leiman et al., 2010) et (Spínola-Amilibia et al., 2016). A) Structure du trimère $(gp5)_3$-$(gp27)_3$ du bactériophage T4. B) Structure tridimensionnelle du trimère VgrG1 de *P. aeruginosa* constitué de deux parties : la « tête » et la « pointe », reliées entre elles par le « cou ». Le trimère de VgrG ne possède pas les domaines lysozymes, contrairement au bactériophage T4. N correspond à l'extrémité N-terminale et C à l'extrémité C-terminale.

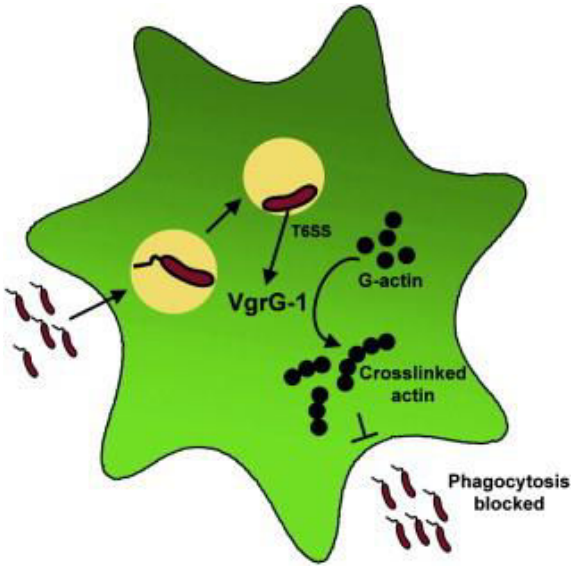


Figure 41: Importance du SST6 de *Vibrio cholerae* lors de la phagocytose. (Satchell, 2009). La phagocytose est un mécanisme d'endocytose dépendant du remaniement du cytosquelette d'actine. Une fois *V. cholerae* phagocytée, son SST6 va être actif. Le transfert de VgrG-1, possèdant un domaine actin-crosslinking (ACD), polymérise ainsi les monomères d'actine. Le SST6 permet alors d'inhiber un nouvel événement d'endocytose, dépendant du remaniement du cytosquelette, et donc empêche la phagocytose d'autres *V. cholerae* par le macrophage, la bactérie reste piégée.

Une protéine accessoire à motif PAAR (Proline-Alanine-Alanine-Arginine, aussi appelées TagD) (Bondage et al., 2016; Cianfanelli et al., 2016; Ma et al., 2016; Shalom et al., 2007) peut être associée sur la pointe du trimère de VgrG et forment une structure conique (Shneider et al., 2013) (figure 42). Le repliement de la protéine à motif PAAR est stabilisée par un atome de zinc localisé au sommet de cette protéine. La protéine à motif PAAR est essentielle pour la sécrétion des protéines Hcp chez *Acinetobacter baylyi*, suggérant que cette protéine est soit impliquée dans l'incorporation du trimère VgrG lors de l'assemblage, soit essentielle au repliement correct du trimère VgrG (Shneider et al., 2013). Les protéines à motif PAAR peuvent avoir une extension de type toxine. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, l'effecteur Tse6 possède un motif PAAR au niveau N-terminal (Whitney et al., 2014) et Tse5 (dont le gène est en aval de *vgrG4*) possède un repliement similaire à celui des protéines PAAR mais ne possède pas le motif PAAR (Whitney et al., 2014). Des analyses informatiques montrent que certaines protéines possèdent un motif PAAR au niveau de la région N-terminale, une région centrale Rhs (Rearrangement hotspot), et un domaine toxine sur la région C-terminale (Ma et al., 2017b; Shneider et al., 2013).

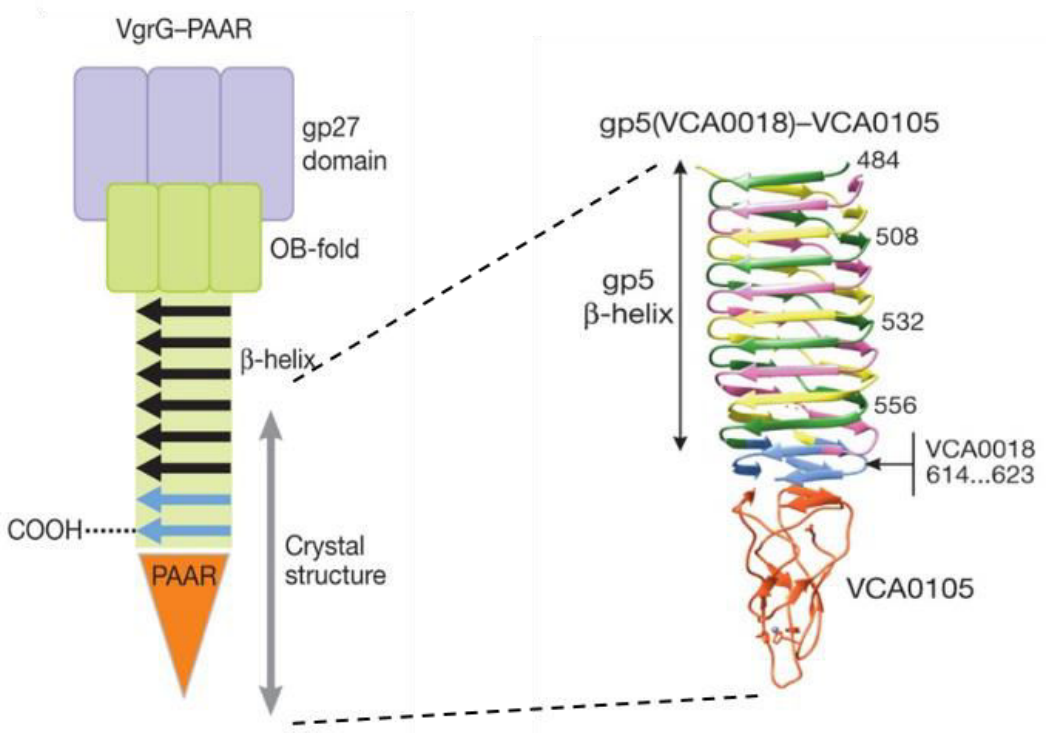


Figure 42: La protéine à motif PAAR s'associe avec le trimère VgrG. Adapté de (Shneider et al., 2013). A gauche, représentation schématique de l'interaction entre le trimère VgrG et la protéine à motif PAAR (VCA0105). A droite, structure tridimensionnelle du complexe gp5-VCA0105.

L'hétérodimère TssBC, formant la gaine, présente des homologies structurales avec la glycoprotéine gp18 du bactériophage T4 (Bönemann et al., 2009; Cascales, 2008; Leiman et al., 2009). Chez *Vibrio cholerae*, la gaine, constituée des protéines VipA (TssB) et VipB (TssC) (Vip: ClpV interacting protein), forme une structure en roue dentée avec 12 renflements (Bönemann et al., 2009) et entoure le tube interne d'Hcp. Pour le bactériophage T4 et la pyocine de type R, la longueur de la gaine est contrôlée par une protéine (Abuladze et al., 1994; Ghequire et al., 2015), alors que la gaine du SST6 semble s'assembler sans régulation apparente (Basler and Mekalanos, 2012; Basler et al., 2012). Chez *E. coli* EAEC, TssB interagit à la fois avec Hcp (Zoued et al., 2016a) et avec l'extrémité N-terminale de TssC, *via* l'hélice α localisée au niveau de l'extrémité C-terminale de TssB (Zhang et al., 2013). Le diamètre interne de la gaine (qui entoure le tube interne formé des protéines Hcp) coïncide avec le diamètre de l'hexamère d'Hcp (figure 43).

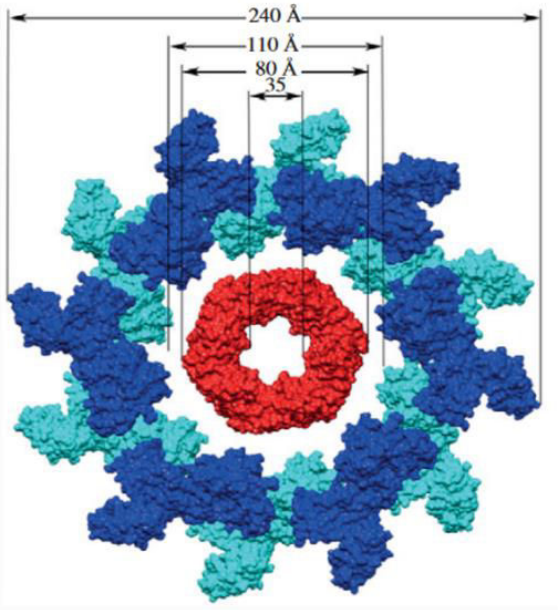


Figure 43: La gaine TssBC entourant le tube interne d'Hcp. (Cascales and Cambillau, 2012). La surface moléculaire de l'hexamère d'Hcp est représentée en rouge et l'hétérodimère TssBC est représenté en bleu (TssB en bleu clair et TssC en bleu foncé).

ii. L'élongation de la queue contractile

Il a été montré que 1 µm de gaine s'assemble en 20-30 secondes chez *Vibrio cholerae* (Basler et al., 2012). Le dodecamère TssAc correspondant à deux hexamères superposés en conformation « head-to-head », présenterait six extrémités flexibles de chaque côté (Zoued et al., 2016a) (figure 44).

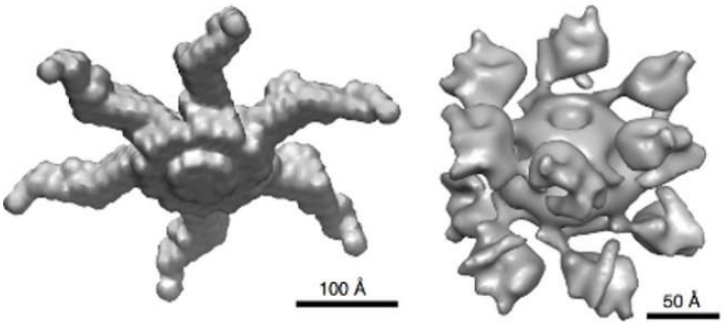


Figure 44: Structure du complexe TssA d'*E. coli* EAEC. Adapté de (Zoued et al., 2016a). A gauche, représentation en position inclinée du complexe TssA par méthode SAXS. Ce modèle montre des extensions non identifiées par microscopie électronique (droite). A droite, représentation en position inclinée du complexe dodécamérique de TssA obtenue à l'aide des images effectuées par microscopie électronique. Cette méthode ne révèle pas les extensions observées par le modèle obtenue par SAXS, probablement à cause de la flexibilité de ces extensions.

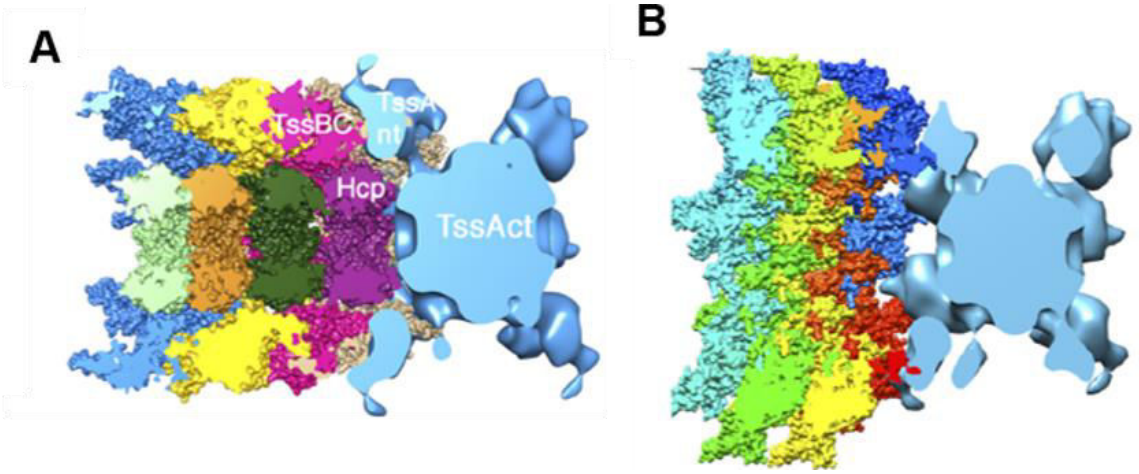


Figure 45: Superposition du complexe TssA sur l'extrémité distale de la gaine. (Zoued et al., 2016a). Le complexe TssA se superpose parfaitement avec la gaine à l'état détendu (A), mais pas avec la gaine contractée (B). Une fois la gaine contractée, le complexe TssA se libérerait suite à cette contrainte physique.

Le dodecamère TssA, localisé sur l'extrémité distale de la queue contractile chez *E. coli* (figure 45), pourrait, *via* ses extensions flexibles incorporer les hexamères d'Hcp un par un sur la structure en pleine expansion (Zoued et al., 2016a). Plusieurs modèles d'action de TssA au niveau de l'extrémité de la queue contractile ont été envisagés (Zoued et al., 2017) (figure 46). Chez *P. aeruginosa*, TssA ne serait pas localisée sur l'extrémité distale de la queue contractile (Planamente et al., 2016), mais serait localisée au niveau du complexe basal (figure 47).

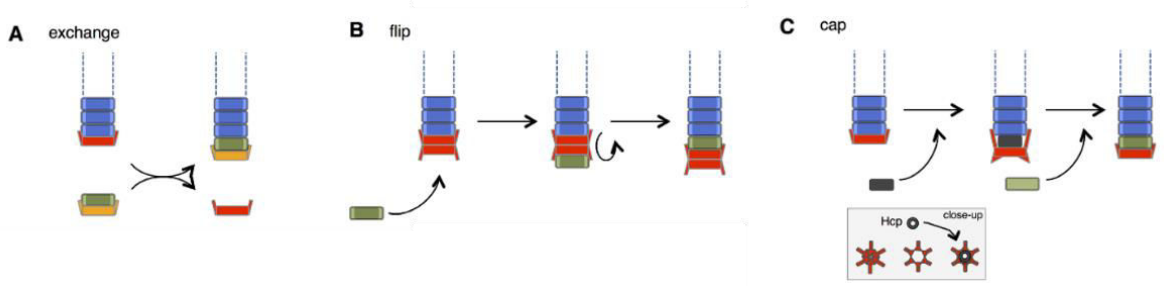


Figure 46: Les différents modèles possibles d'assemblage de la queue contractile par TssA. (Zoued et al., 2017). A) le modèle « exchange »: le « nouveau » complexe TssA chargé avec Hcp-TssBC remplace « l'ancien » complexe TssA localisé au niveau de l'extrémité de la queue contractile. A chaque échange s'ajoute une à une des nouvelles sous-unités Hcp-TssBC. B) le modèle « Flip » : TssA forme un dodecamère, dont la partie opposée au complexe membranaire est libre et peut « agripper » de nouvelles sous-unités Hcp-TssBC. Une fois ces dernières accrochées, le complexe TssA se retourne, incorporant ainsi Hcp-TssBC sur l'extrémité de la queue contractile. C) le modèle « cap » : l'hexamère d'Hcp passerait à travers la lumière interne du complexe TssA alors que les bras flexibles de TssA, orientés vers le complexe membranaire, recrutent, positionnent et polymérisent les sous-unités TssBC. Le dernier modèle (C) est le plus probable parmi les trois proposés.

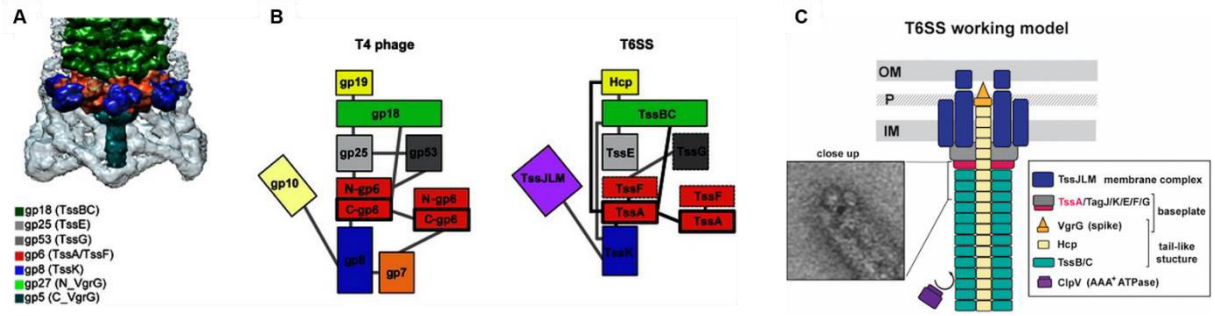


Figure 47: La protéine TssA1 de *P. aeruginosa* serait localisée au niveau du complexe basal. Adapté de (Planamente et al., 2016). A) Structure tridimensionnelle et organisation du complexe basal du bactériophage T4. Les homologues du SST6 avec les protéines du bactériophage sont mis entre parenthèses. B) Selon l'interactomique des différents constituants du bactériophage T4, TssA (homologue à la protéine gp6) serait associée avec TssF et interagirait avec différentes protéines du complexe basal (TssF, TssK) mais également avec Hcp et les constituants de la gaine. C) Modèle proposé : TssA serait localisée au niveau de l'extrémité proximale de la gaine, au niveau du complexe basal.

Le canal central de TssA d'environ 100 Å, coïncide avec le diamètre externe des hexamères d'Hcp (80-85 Å) (Cascales and Cambillau, 2012). Comme mentionné précédemment, la taille de la queue contractile ne dépend pas d'une protéine régulatrice mais plutôt de la contrainte physique de la membrane opposée (Basler and Mekalanos, 2012; Basler et al., 2012; Vettiger et al., 2017). Lorsque *Vibrio cholerae* est sous forme de sphéroplastes (cellules arrondies dont la division cellulaire est atténuée), la longueur du SST6 est corrélée au diamètre des cellules et atteint en moyenne 2.63 µm (au lieu de 0.85 µm) et peut atteindre jusqu'à 8.4 µm de longueur. La longueur du SST6 coïncide avec la largeur de la cellule et sa taille n'est pas constante contrairement à celle du bactériophage T4 et la pyocine de type R (Abuladze et al., 1994; Ghequire et al., 2015).

Les protéines Hcp, VgrG ainsi que les effecteurs provenant d'une attaque d'une bactérie isogénique peuvent être réutilisées lors de l'assemblage d'un nouveau SST6 fonctionnel chez *Vibrio cholerae* (Vettiger and Basler, 2016). Très récemment, Vettiger et collaborateurs ont démontré chez *V. cholerae* que les sous-unités de la gaine s'ajoutent sur l'extrémité distale de la queue du SST6 (Vettiger et al., 2017). On peut envisager que le complexe TssA ajouterait, *via* ses extensions flexibles, les hexamères d'Hcp (passant par la lumière interne d'Hcp) sur l'extrémité distale de la queue contractile. Le tube interne d'Hcp servirait d'échafaudage pour l'ajout de nouveaux hétérodimères TssBC, probablement ajoutés par les bras flexibles du complexe TssA.

iii. La contraction : expulsion du tube interne

Chez *V. cholerae*, la gaine se contracte en moins de 5 millisecondes (Basler et al., 2012). L'initiation de la contraction de la gaine reste encore inconnue, mais il est fort probable que le complexe basal soit à l'origine de ce déclenchement, reposant sur les connaissances acquises sur le fonctionnement du bactériophage T4 (Leiman and Shneider, 2012). Selon la forme hélicoïdale de la gaine du SST6 et les similitudes avec le bactériophage T4, il semblerait que la gaine tourne sur elle-même lors de la contraction (Basler, 2015; Ge et al., 2015; Kube et al., 2014; Kudryashev et al., 2015). De plus, il est estimé que pour un SST6 long de 100 nm, la gaine se contracterait en moins de 5 ms en faisant 10 rotations, soit une vitesse d'environ 120 000 rpm (Basler, 2015). Dans le cas des sphéroplastes de *V. cholerae*, la vitesse de la contraction de la gaine semble supérieure à 800 nm/ms (c'est-à-dire qu'une gaine longue de 0,8 µm se contracte en moins d'une milliseconde) (Vettiger et al., 2017). Après contraction, la gaine devient plus petite et plus large (Basler et al., 2012) (figure 48), ce qui pourrait être à l'origine du détachement du complexe TssA de l'extrémité distale de la queue contractile (Zoued et al., 2016a).

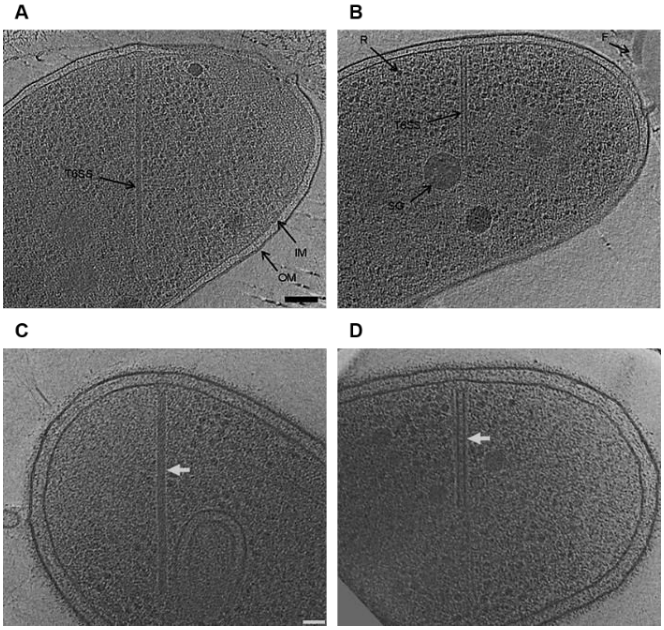


Figure 48: Observation par microscopie électronique du SST6 à l'état détendu et contracté. Adapté de (Basler et al., 2012) et (Chang et al., 2017). Observation en microscopie électronique de la queue contractile du SST6 à l'état contracté ainsi qu'à l'état détendu chez la souche *Vibrio cholerae* (A et B, respectivement, la barre d'échelle noire représente 100 nm) et *Myxococcus xanthus* (C et D, respectivement, la barre d'échelle blanche représente 50 nm). IM : membrane interne ; OM : membrane externe ; F : flagelle ; R : putatif ribosome.

En ce qui concerne le bactériophage A511, la gaine se contracte en partant du complexe basal et se déplace par « vague » jusqu'à l'extrémité distale (figure 49). En revanche, le mode de contraction de la gaine du SST6 n'est pas encore connu : se contracte-t-il de manière continue ou de manière similaire au bactériophage A511 ?

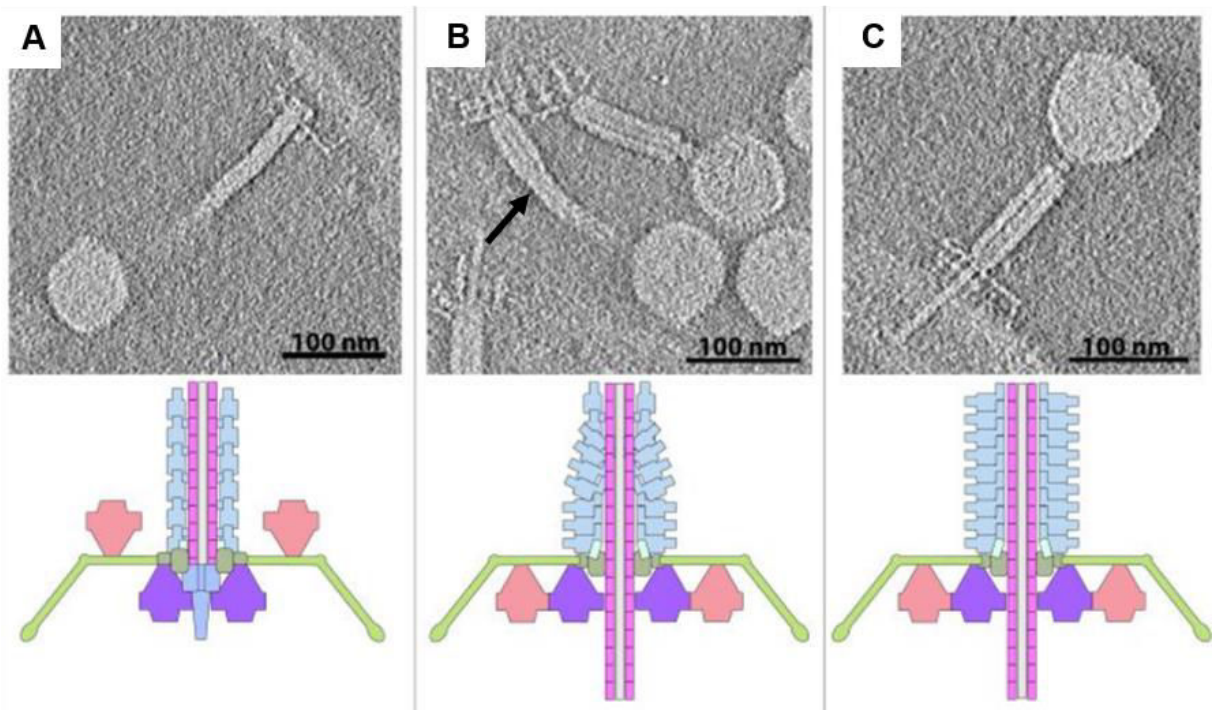


Figure 49: Mode de contraction du bactériophage A511. Adapté de (Guerrero-Ferreira et al., 2015). A) Observation par microscopie électronique d'un bactériophage A511 à l'état non contracté. B) Etat de contraction intermédiaire : la gaine se contracte en partant du complexe basal (la propagation de la contraction est pointée par la flèche noire). C) bactériophage A511 à l'état contracté.

iv. Le désassemblage : implication de l'ATPase ClpV

Le gène *clpV* (Caseinolytic peptidase V) code pour une ATPase de la famille Hsp100/Clp AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) (Records, 2011). ClpV s'associe en hexamère et permet le désassemblage de la gaine en environ 30 secondes (Basler et al., 2012). Lors de la polymérisation de la gaine ou du SST6 dans l'état détendu, ClpV est présente dans le cytoplasme mais n'interagit pas avec la gaine TssBC (Basler and Mekalanos, 2012). Après contraction de la gaine, l'ATPase ClpV est co-localisée avec la gaine. Le site reconnu par ClpV, situé sur la région N-terminale de TssC, est rendu accessible suite aux changements de conformation de TssBC après la contraction (Bönemann et al., 2009; Douzi et al., 2016; Förster et al., 2014; Kube et al., 2014) (figure 50).

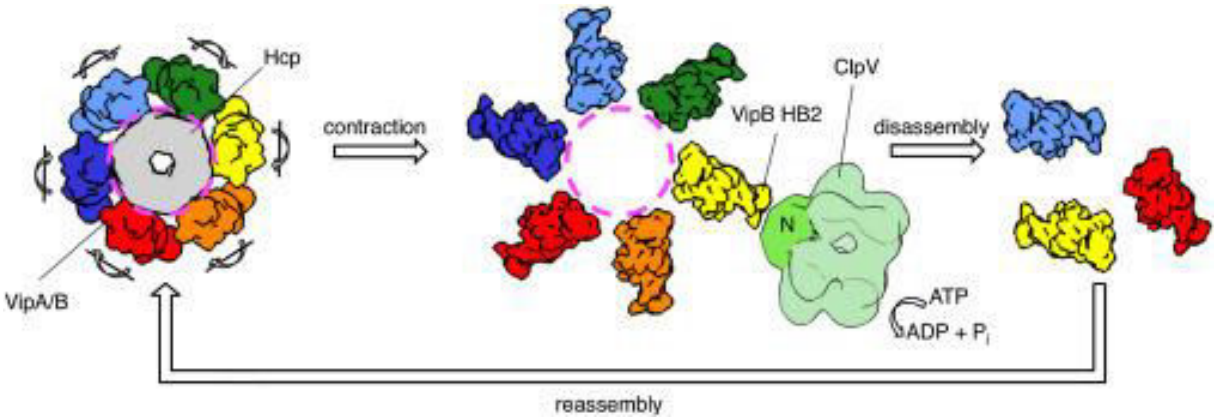


Figure 50: Modèle du recyclage de la gaine. (Kube et al., 2014). Le domaine N-terminal de TssC reconnu par ClpV n'est accessible que lorsque la gaine est à l'état contracté. Dans l'état détendu, ce site de reconnaissance est caché, évitant ainsi un recyclage prématuré.

Les protéines AAA+ possèdent un domaine conservé qui permet de fixer l'ATP et forment des structures oligomériques (Bönemann et al., 2009; Hanson and Whiteheart, 2005). Le domaine ATPase sert à la conversion d'énergie, fournie par l'hydrolyse de l'ATP, en force mécanique. Ceci permet de dissocier les composants de la gaine et ainsi son recyclage. Chez *P. aeruginosa*, la protéine accessoire TagJ est essentielle au recrutement de l'ATPase (Förster et al., 2014) en se fixant sur la région N-terminale de TssB (figure 51) et peut ainsi interagir avec TssC et initier le désassemblage de la gaine. ClpV permettrait également de recycler d'autres composants du SST6, comme TssA par exemple (Planamente et al., 2016).

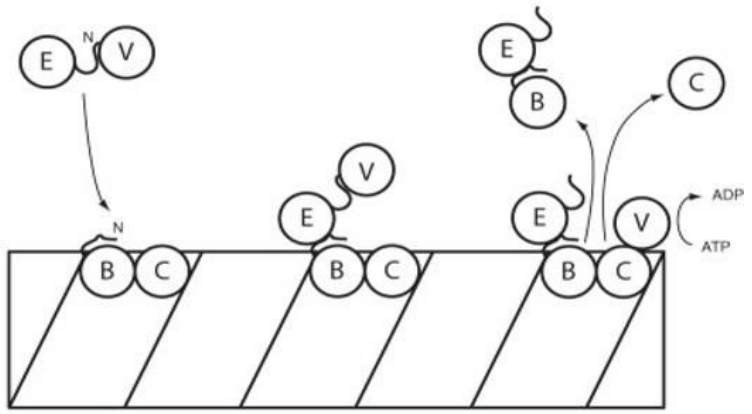


Figure 51: Modèle du recrutement de ClpV par le domaine N-terminale de TssB chez *P. aeruginosa*. (Förster et al., 2014). (E) représente TagJ, (V) l'ATPase ClpV, (B) TssB et (C) TssC.

Pour résumer, le SST6 fait intervenir plusieurs protéines structurales (« core-component ») qui s'assemblent de manière très ordonnée, mais nécessite également que les effecteurs soient pris en charge par ce mécanisme de sécrétion. Par conséquent, lorsque la bactérie active son système de sécrétion de type VI à un moment opportun, l'assemblage du SST6 doit être très coordonné. Le SST6 doit alors être finement régulé afin d'assurer un assemblage correct lors d'un moment propice.

3) Régulation du SST6 chez *Pseudomonas aeruginosa*

De nombreuses études ont permis d'élucider la régulation du SST6 chez différentes espèces pathogènes mais je ne développerai ici que la régulation chez *Pseudomonas aeruginosa*. La souche PAO1 possède trois clusters du SST6 (noté H1- à H3-T6SS ou HSI-I à III) (figure 52). Le cluster H2-T6SS de la souche *P. aeruginosa* PA14 présente quatre gènes additionnels absents chez *P. aeruginosa* PAO1 (ces quatre gènes sont conservés chez d'autres souches) (Jones et al., 2014a). Il est à noter que le cluster H3-T6SS est séparé en deux opérons, appelés opéron gauche et droit. Les clusters sont régulés différemment et par plusieurs régulateurs, suggérant que chaque SST6 est activé de manière complexe et selon le contexte de l'environnement de la bactérie.

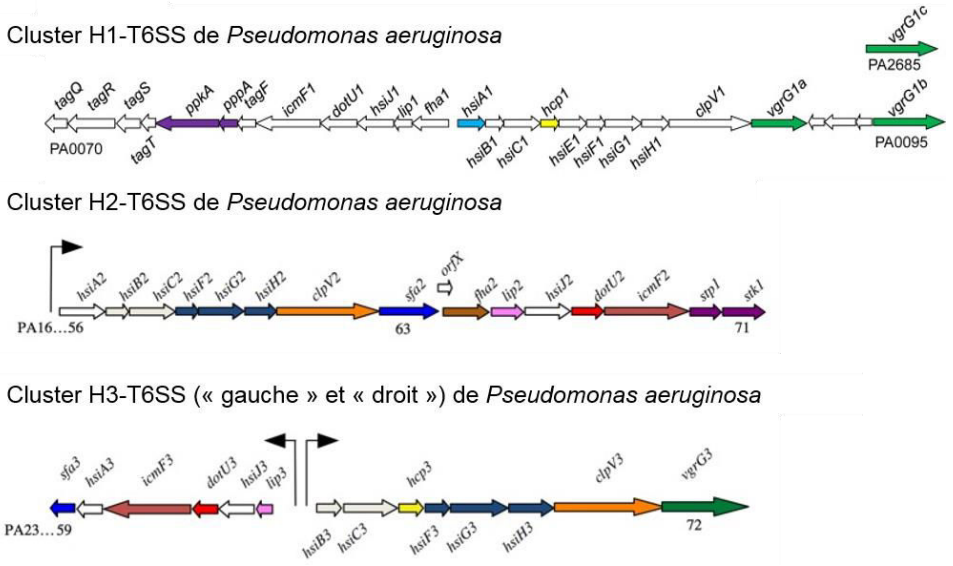


Figure 52: Organisation génomique des différents clusters de SST6 chez *P. aeruginosa*. Adapté de (Jones et al., 2014a) et (Sana et al., 2013).

a) Régulation transcriptionnelle

i. Régulation *via* le facteur sigma 54

Les facteurs sigma peuvent se fixer au core de l'ARN-polymérase ADN-dépendante (appelée alors holoenzyme) et ainsi se fixer sur une région promotrice spécifique à chaque facteur sigma. Le facteur sigma 54, ou RpoN, reconnait les séquences -24 (TGGCA) et -12 (TGCA) par rapport au site de transcription et nécessite la protéine EBP (enhancer binding protein) (Dixon and Kahn, 2004) (figure 53). Des séquences consensus du facteur RpoN ainsi que les gènes codant pour la protéine EBP putative, nommée Sfa (sigma factor activation) ont été retrouvés au niveau des clusters H2- et H3-T6SS (Bernard et al., 2011). Sana et collaborateurs ont montré que le facteur sigma 54 permet d'activer l'expression des gènes du cluster droit du H3-T6SS et réprime l'expression des gènes du cluster H2-T6SS et du cluster gauche du H3-T6SS (Sana et al., 2013). De plus, les auteurs ont montré que l'expression des gènes du cluster H2-T6SS était dépendante de la protéine Sfa2 (protéine EBP putative) alors que le H3-T6SS ne nécessite pas la présence de Sfa3. En effet, Sfa2 contribue à la répression du H2-T6SS par RpoN (Sana et al., 2013).

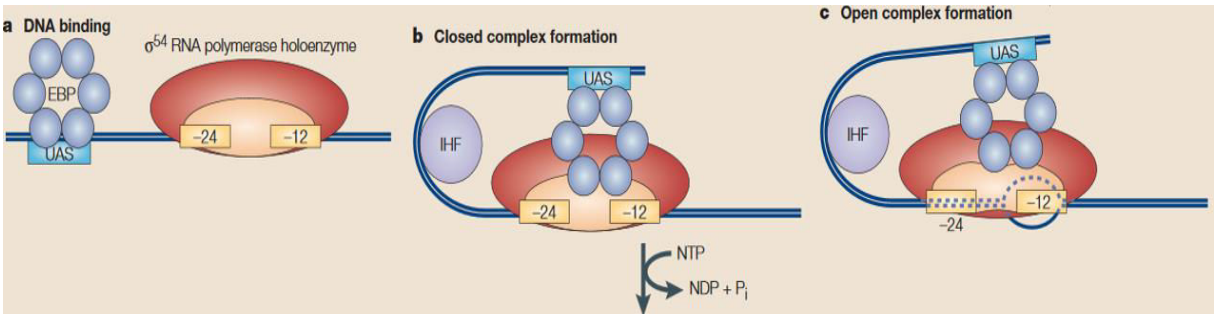


Figure 53: Schéma représentant la régulation des gènes par le facteur sigma RpoN. (Dixon and Kahn, 2004). A) Le facteur à fonction extracytoplasmique RpoN (en orange) se fixe sur l'ARN-polymérase ADN-dépendante (en rouge), permettant ainsi une fixation spécifique sur la région promotrice (le site consensus -24 et -12 est représenté par les rectangles jaunes). B) L'initiation de la transcription nécessite la protéine EBP, qui une fois phosphorylée, va se fixer sur le site UAS (upstream activating sequence) et va interagir avec l'holoenzyme (formant alors une boucle). La protéine de liaison à l'ADN IHF (integration host factor) facilite également la formation de cette boucle. C) Initiation de la transcription suite à la formation de l'œil de transcription.

Cependant, le système Gac/Rsm (développé ci-après) est impliqué dans l'activation de l'expression des gènes du H3-T6SS. Le facteur RpoN inhibe également l'expression du gène *gacA* (Heurlier et al., 2003), et donc par conséquent l'expression du H3-T6SS (Sana et al., 2013).

ii. Régulation *via* le facteur transcriptionnel Amrz

Le facteur transcriptionnel AmrZ (alginate and motility regulator Z) est un régulateur global qui active notamment la transcription des gènes dont l'expression conduit à la production des alginates et de gènes dont l'expression permet la mobilité de type « twitching ». AmrZ réprime aussi la transcription des gènes flagellaires (*flgG*, *fleQ*…) et la production de c-di-GMP (Jones et al., 2014b). AmrZ réprime la transcription des gènes du H2-T6SS mais active l'expression des gènes du H1- et H3-T6SS (Allsopp et al., 2017).

iii. Régulation *via* le système Fur

Le régulateur Fur (ferric uptake regulator) est impliqué dans l'expression de nombreux gènes et est activé lors d'une carence en fer, élément indispensable aux bactéries. En présence de fer, ces ions se complexent avec le répresseur Fur, ce complexe se fixe au niveau du site consensus -35 et -10, empêchant ainsi la fixation de l'ARN-polymérase ADN-dépendante et la transcription des gènes du régulon Fur (ensemble de gènes dont l'expression est contrôlée par le régulateur Fur) (figure 54) (Troxell and Hassan, 2013). En cas de carence de fer, le répresseur Fur ne fixe pas sur le site consensus, laissant le libre accès à l'ARN-polymérase, autorisant alors la transcription du ou des gènes (comme par exemple ceux dont l'expression permet la synthèse des sidérophores impliqués dans l'acquisition du fer). En condition limitante en fer, l'expression des gènes du cluster H2-T6SS est activée de manière Fur-dépendante (Sana et al., 2012). De plus, le H3-T6SS est impliqué dans l'acquisition d'ion Fe^{3+} par l'intermédiaire de l'effecteur TseF (Lin et al., 2017) (développé ci-après dans le chapitre rôle du SST6).

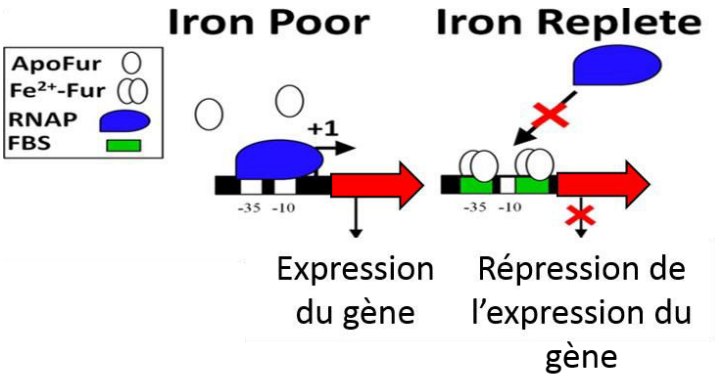


Figure 54: Modèle d'action du répresseur Fur. Adapté de (Troxell and Hassan, 2013). Lors d'une carence en fer (condition « iron poor »), la molécule ApoFur (représentée par les rectangles blancs) non complexée aux ions Fe^{2+} ne se fixe pas sur la séquence consensus -35 et -10. L'ARN polymérase (en bleu) peut alors se fixer sur la région promotrice, permettant la transcription du régulon. En condition non carencée (condition « iron replete »), les ions Fe^{2+} se complexent avec Fur et se fixent au niveau du FBS (Fur binding site, en vert) empêchant ainsi l'ARN-polymérase de se fixer sur la région promotrice (boîtes -35 et -10, en blanc) et donc l'expression du régulon.

iv. Régulation par un régulateur transcriptionnel de type LysR

Le facteur transcriptionnel de type LysR PA3225 de *P. aeruginosa* PA14 interagit avec la région promotrice de l'opéron *tssABC1* (H1-T6SS) (Hall et al., 2017). Cependant, la délétion du gène *PA3225* induit une faible diminution de l'expression du gène *tssA1* des bactéries à l'état planctonique (et non significatif en condition de biofilm). Ceci peut être expliqué par les régulations multiples auxquelles le cluster H1-T6SS est soumis. Le mécanisme fin de régulation reste encore non élucidé. PA3225 agit également comme un répresseur transcriptionnel des gènes dont l'expression intervient dans le mécanisme de résistance aux antibiotiques.

v. Régulation par le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un moyen de communication qui contrôle l'expression de gènes de manière coordonnée au sein d'une population bactérienne. La quantité de ces molécules est proportionnelle à la population bactérienne. Au-delà d'un seuil critique, les bactéries peuvent synchroniser leur métabolisme et ainsi coordonner la

production de facteurs de virulence. Les facteurs transcriptionnels LasR et PqsR (PqsR a été par le passé appelé MvfR pour Multiple virulence factor regulator) augmentent l'expression des gènes des clusters H2- et H3-T6SS (Lesic et al., 2009). A l'inverse, LasR et MvfR répriment l'expression des gènes du H1-T6SS. Il semblerait également que les systèmes du quorum Las et Rhl contrôlent directement l'expression des gènes du H2-T6SS (Sana et al., 2012).

b) Régulation post-transcriptionnelle

Cette régulation est dépendante du système à deux composants (TCST) GacS/GacA (Gac : global activation of antibiotic and cyanide synthesis) (figure 55). Les TCST sont essentiels dans l'adaptation, puisqu'ils sont impliqués dans la perception et l'internalisation de signaux extérieurs vers le cytoplasme. En effet, le senseur GacS perçoit un signal de l'environnement et va phosphoryler le régulateur (« response regulator ») par phototransfert (phosphate transféré du senseur au régulateur de réponse) (Lapouge et al., 2008). Une fois phosphorylé, GacA va activer la transcription des gènes codant pour des petits ARNs régulateurs RsmY et RsmZ, qui vont séquestrer la protéine RsmA (Rsm : Regulator of secondary metabolite). RsmA est un répresseur traductionnel qui se fixe sur les ARNm cibles, empêchant ainsi l'accès aux ribosomes. RsmY et RsmZ en se liant à RsmA vont « libérer » les ARNm qui vont pouvoir être traduits en protéine. Mais ce système est plus complexe, puisqu'il est également contrôlé par deux senseurs hybrides kinases : RetS (regulator of exopolysaccharide and type III secretion) et LadS (lost adherence) (Bernard et al., 2010; Chen et al., 2015; Goodman et al., 2004; Mougous et al., 2006). L'hybride senseur kinase RetS diminue la transcription des ARNs RsmY et RsmZ en inhibant la cascade phosphorelay GacS/GacA (Goodman et al., 2004) ; *a contrario* LadS augmente la phosphorylation de GacA (augmentant ainsi le taux de RsmY et RsmZ) (Chen et al., 2015). C'est d'ailleurs pour cette raison que les études portant sur le H1-T6SS chez *P. aeruginosa* s'effectuent majoritairement sur un mutant *retS* et non pas sur la souche sauvage, afin d'améliorer l'activation du SST6 (Hood et al., 2010; Mougous et al., 2006).

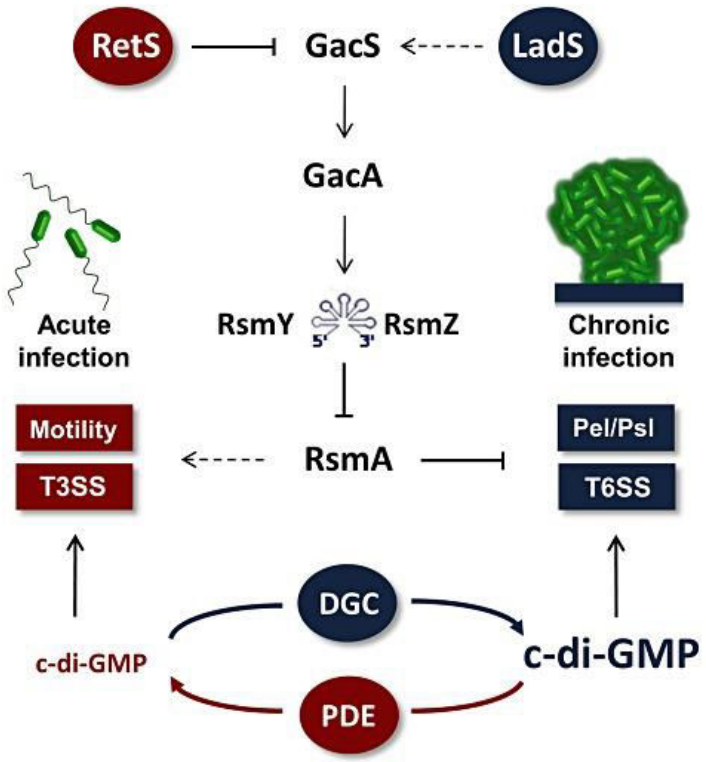


Figure 55: Régulation de la transition entre les modes de vies de *P. aeruginosa*. (Moscoso et al., 2011). Les deux modes de vies de type infection aigüe ou chronique de P. aeruginosa sont contrôlés à la fois par RetS et le c-di-GMP. Une augmentation artificielle de c-di-GMP suite à la surproduction de la diguanylate cyclase (ou diminution par la phosphodiestérase) favorise la formation de biofilm et l'activation du SST6. Les flèches en pointillés indiquent un mécanisme d'action inconnu.

La voie de signalisation HptB (histidine phototransfert) influence également le taux de RsmY (Bordi et al., 2010; Valentini et al., 2016) (figure 56). En effet, lorsque HptR n'est pas phosphorylée, cette protéine possède une activité kinase, qui va phosphoryler HptA (Valentini et al., 2016). Une fois phosphorylée, HptA va interagir avec la diguanylate cyclase HsbD, augmentant ainsi le taux de c-di-GMP et de RsmY. La protéine HptB peut être phosphorylée par trois senseurs kinase : PA1611, SagS ou EcrS', et va transférer le groupement phosphate sur le domaine receveur de HptR. Cependant, lorsque HptR est phosphorylée, cette protéine possède une activité phosphatase qui par conséquent empêche la phosphorylation de HptA. Par ailleurs, HptR non phosphorylée va déphosphoryler l'anti-antisigma HptA qui sera ainsi libéré et pourra séquestrer l'antisigma FlgM. Cette séquestration de FlgM aboutira à la libération du facteur sigma FliA, activant ainsi la mobilité de type « swimming » et « swarming ».

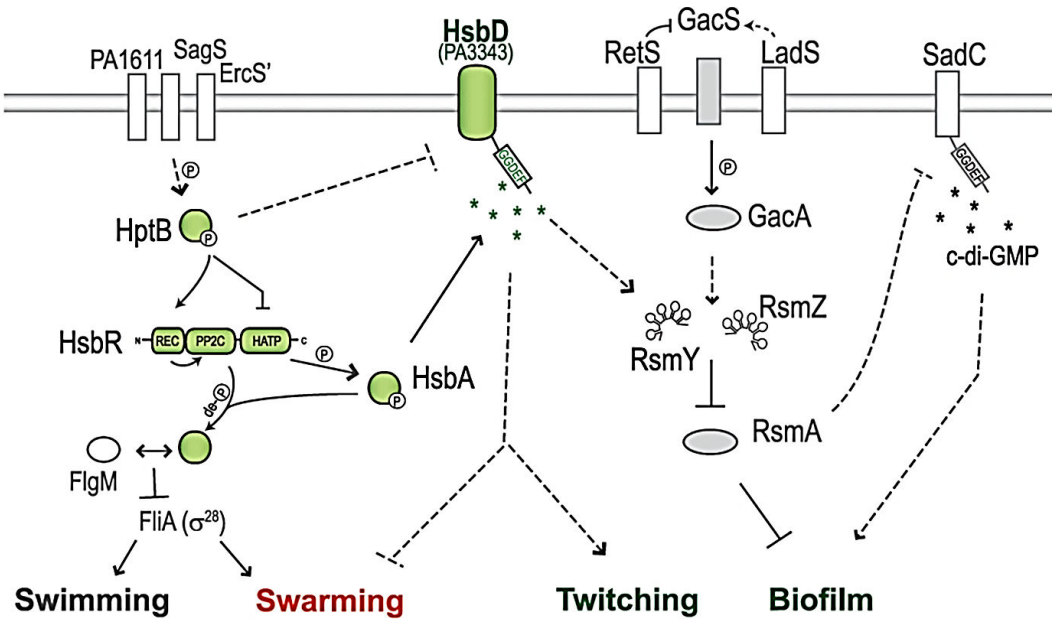


Figure 56: Modèle représentant la voie de signalisation HptB chez *P. aeruginosa*. (Valentini et al., 2016). Les trois senseurs kinase PA1611, SagS ou ErcS' vont phosphoryler et activer HptB qui va à son tour transférer le phosphate sur le domaine receveur de HsbR (HptR-P). La phosphorylation de HsbR va réprimer son activité kinase et activer sa fonction phosphatase, déphosphorylant ainsi l'anti-anti-sigma HsbA. La protéine HsbA phosphorylée interagit avec HsbD, augmentant ainsi le taux du second messager c-di-GMP et de l'ARN de régulation RsmY. Ⓟ : phosporylation et de-Ⓟ : déphosphorylation.

Il a été montré que la présence d'autres bactéries compétitrices permettent l'activation du H1-T6SS de *P. aeruginosa*, et ce phénomène est appelé PARA (*Pseudomonas aeruginosa* response to antagonism) (LeRoux et al., 2015). Cette réponse est indépendante de la voie de phosphorylation des thréonines (TPP : threonine phosphorylation pathway, développé ci-après) et ce mécanisme de défense requiert la voie de signalisation Gac/Rsm. Ainsi, les lysats provenant de *P. aeruginosa*, ayant subi une lyse suite à l'agression d'une bactérie compétitrice, servent de signal pour la stimulation du H1-T6SS *via* la voie Gac/Rsm (LeRoux et al., 2015). Ce mécanisme serait un mécanisme de défense, capable de percevoir un danger (lyse de bactérie isogénique) et d'activer le SST6 afin de tuer l'antagonisme (figure 57). Ce modèle montre l'adaptation des *Pseudomonas* dans l'environnement : la bactérie n'active son SST6 que lors de la présence d'un agent compétiteur, suite à la perception des dommages d'une bactérie isogénique.

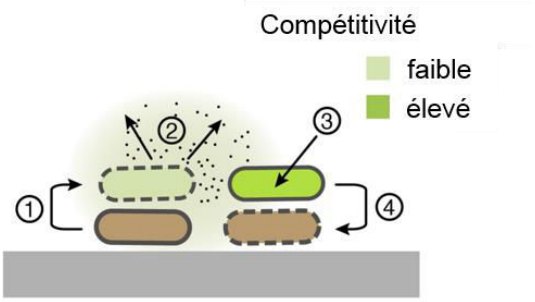


Figure 57: Modèle du mécanisme PARA (*Pseudomonas aeruginosa* response to antagonism). Adapté de (LeRoux et al., 2015). 1) Une bactérie compétitrice (figurant en marron) lyse *P. aeruginosa* (représentée en vert), 2) libérant ainsi le contenu cytoplasmique (lysat) de *P. aeruginosa*. 3) Les signaux de danger présents dans le milieu extracellulaire activent la voie de signalisation Gac/Rsm, activant ainsi les facteurs de compétition de *P. aeruginosa* (H1-T6SS, cyanure d'hydrogène…). 4) *Pseudomonas aeruginosa* tue alors la bactérie compétitrice suite à l'agression d'une cellule soeur.

Le répresseur traductionnel RsmA contrôle de manière négative l'assemblage des trois SST6 chez *P. aeruginosa* (H1-, H2- et H3-T6SS), en empêchant la traduction des ARNm (Allsopp et al., 2017). Des sites de liaisons putatifs ont été identifiés en amont du codon start des ARNm correspondant à l'expression de *tssA1* (H1-T6SS), *tssA2* (H2-T6SS) et *tssB3* (H3-T6SS) (figure 58). En activant l'expression des ARNs RsmY et RsmZ, la voie Gac/Rsm permet de lever la répression de la traduction des ARNm du SST6 exercée par la protéine RsmA.

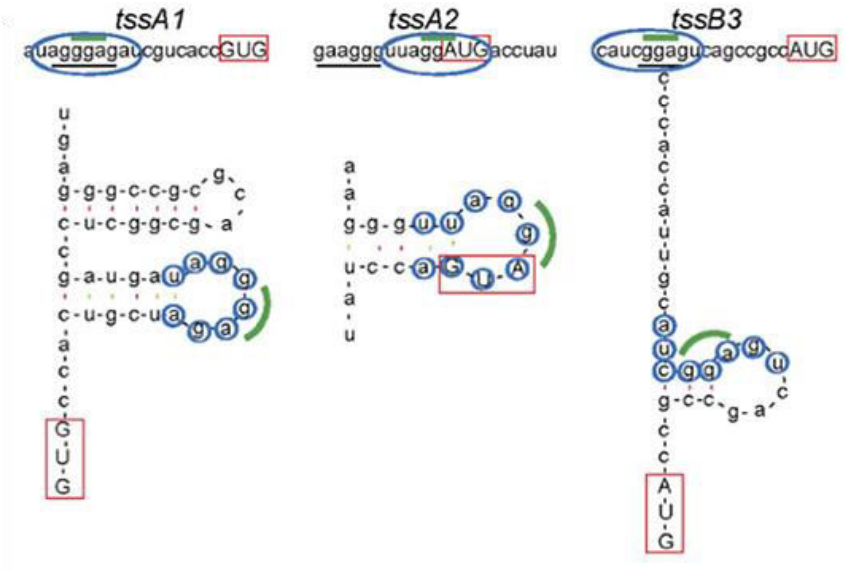


Figure 58: Prédiction des sites de liaison de RsmA sur les ARNm. (Allsopp et al., 2017). Les cercles bleus correspondent au site de liaison putatif, la ligne verte au motif GGA, les lettres encadrées en rouge représentent le codon start et les sites de liaison des ribosomes (RBS : ribosome binding site) sont soulignés en noir.

c) Régulation par le second messager c-di-GMP

Le di-GMP cyclique (c-di-GMP) est un second messager qui contrôle le comportement et coordonne le mode de vie bactérien, dont le biofilm (Valentini and Filloux, 2016) (figure 59). La concentration intracellulaire en c-di-GMP est contrôlée par l'activité des diguanylate cyclases (DGC, qui augmentent le taux de c-di-GMP) et par les phosphodiestérases (PDE, qui dégradent le c-di-GMP). Le taux de c-di-GMP est faible lorsque la bactérie est à l'état planctonique. L'augmentation de c-di-GMP permet la transition du mode planctonique au mode sessile (bactérie attachée sur une surface, non libre), en inhibant la formation du flagelle et favorise la formation de biofilm.

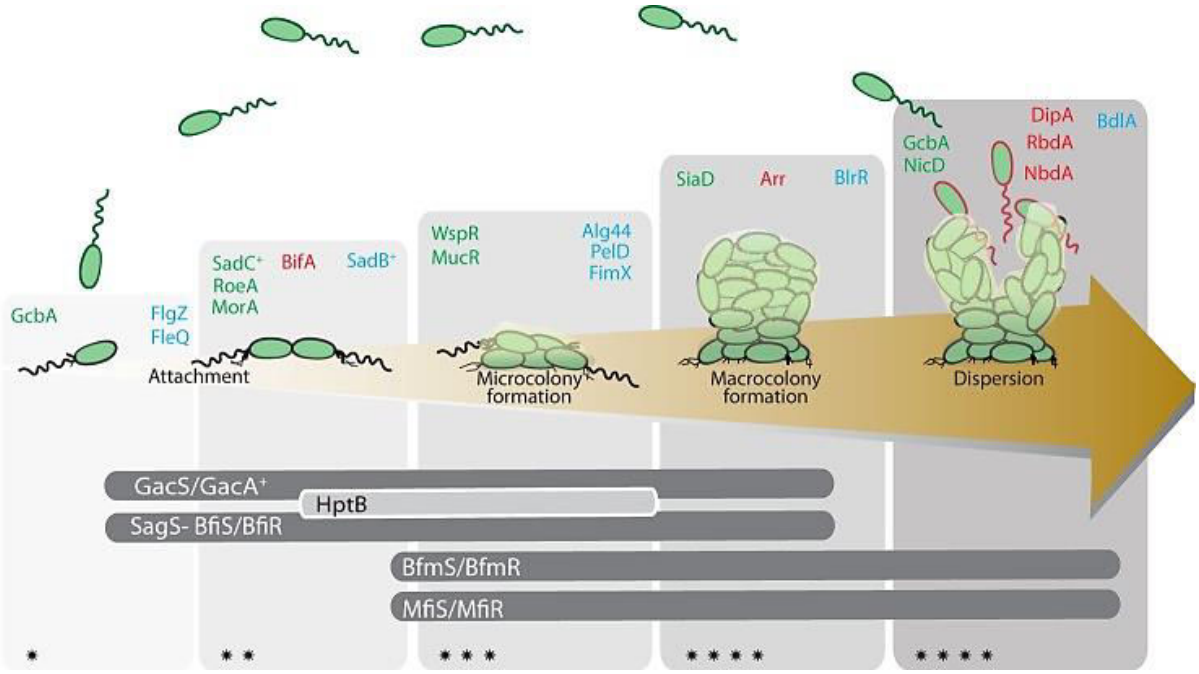


Figure 59: Systèmes à deux composants et c-di-GMP dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. (Valentini and Filloux, 2016). Les différents états physiologiques de la bactérie sont représentés : contour vert de la bactérie : état planctonique, contour noir : formation de biofilm et contour rouge : bactérie dispersive. Les étapes de formation de biofilm (attachement de la bactérie sur une surface, formation de micro-colonie, maturation du biofilm en structure de type « mushroom » et dispersion) et le gradient de c-di-GMP intracellulaire sont représentés (du moins au plus concentré : * à ****). Les diguanylate cyclases (DGC) figurent en vert, les phosphodiestérases (PDE) en rouge et les récepteurs/effecteurs du c-di-GMP sont représentés en bleu.

Une surexpression du gène codant pour la diguanylate cyclase WspR (augmentation artificielle de c-di-GMP) favorise la formation de biofilm et l'activation de SST6 (Moscoso et al., 2011). A l'inverse, la surproduction de la phosphodiestérase

PA2133 (dégradation du taux de c-di-GMP) entraîne l'activation du SST3 et favorise la mobilité. Chez *P. aeruginosa*, le taux de c-di-GMP contrôle le SST3 (actif à faible concentration de c-di-GMP lors d'infection aigue) et le SST6 (actif lors d'une concentration plus élevée en c-di-GMP lors d'infection chronique) (figure 55). Le taux de c-di-GMP est corrélé au type d'infection de *P. aeruginosa* : un faible taux intracellulaire de ce second messager favorise l'infection aigüe et *a contrario*, un taux plus élevé favorise l'infection chronique.

d) Régulation post-traductionnelle

La régulation est dépendante de la voie de phosphorylation des thréonines (TPP : threonin phosphorylation pathway) sous contrôle de la cascade TagQRST et des protéines PpkA, Fha1 et PppA (figure 60). La cascade de signalisation TagQRST permet de percevoir l'attaque suite à une perturbation de la paroi bactérienne (Basler et al., 2013; Casabona et al., 2013; Ho et al., 2013). En effet, l'altération de la membrane bactérienne, induite par la polymyxine B, provoque l'activation du SST6 (Ho et al., 2013). Cette cascade de phosphorylation est liée à la présence d'un complexe ABC transporteur ancré dans la membrane interne (TagS et TagT), de la lipoprotéine de membrane externe TagQ et de la protéine associée à la membrane externe TagR (Casabona et al., 2013). La lipoprotéine TagQ est indispensable au recrutement et à la localisation de la protéine TagR au niveau de la membrane externe (Casabona et al., 2013). La protéine TagR est ensuite requise pour l'activation de la protéine kinase PpkA, en induisant probablement la dimérisation de PpkA, entraînant ainsi l'autophosphorylation de cette protéine kinase (Hsu et al., 2009).

Une fois phosphorylée, la protéine Ppka, qui est associée à la membrane interne, va transférer le groupement phosphate sur la protéine cytoplasmique Fha1 (forkhead-associated protein) (Hsu et al., 2009). Lorsque Fha1 est phosphorylée, cette dernière va pouvoir activer l'assemblage du H1-T6SS. L'action de la phosphatase PppA permet de déphosphoryler Fha1, empêchant alors l'assemblage du H1-T6SS. Dans ce cas, le H1-T6SS est contrôlé au niveau post-traductionnel par l'intermédiaire de la protéine kinase Ppka, de la protéine Fha1, de la protéine phosphatase PppA et de la cascade de phosphorylation TagQRST.

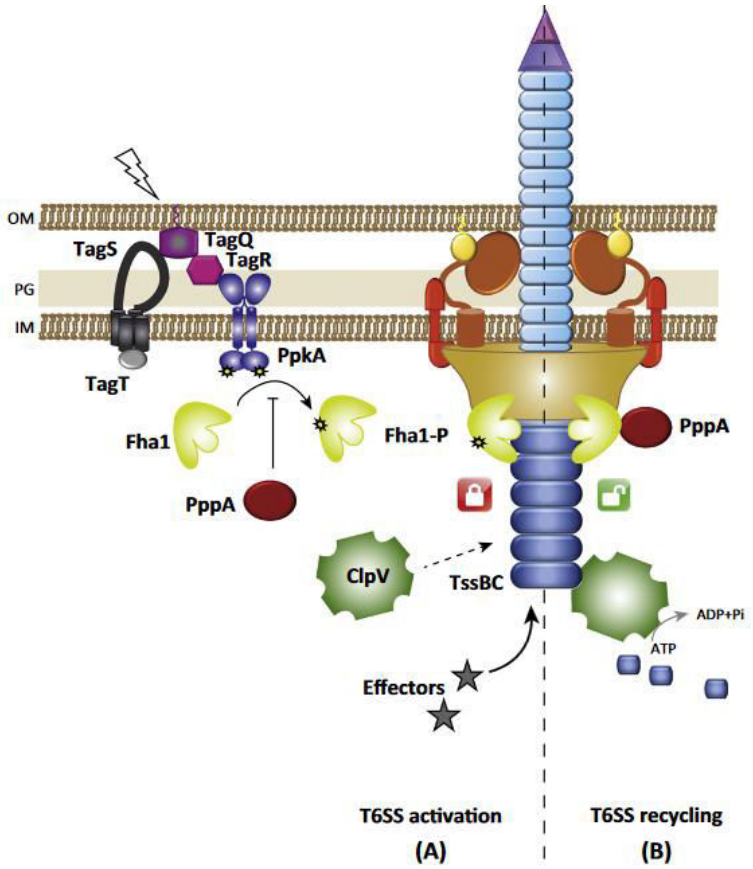


Figure 60: Régulation post-traductionnelle du H1-T6SS par la voie de phosphorylation des thréonines. (Cianfanelli et al., 2016). L'activation de la cascade TagQRST (éclair blanc), entraînant l'autophosphorylation de la protéine kinase PpkA permet de phosphoryler Fha1. La protéine Fha1 phosphorylée va ensuite interagir avec les composants du H1-T6SS et permettre d'activer ce SST6. IM : membrane interne ; OM : membrane externe ; PG ; peptidoglycane ; Pi : phosphate inorganique ; P : groupement phosphate.

Cette cascade de régulation intervient suite à la perception d'une agression (*via* un SST6) d'une souche antagoniste et permet d'assembler le SST6 à l'endroit même de l'attaque (Basler et al., 2013). Je développerai cet aspect dans le chapitre portant sur la réponse bactérienne de type « Tit-for-Tat ».

La régulation des différents clusters de *P.aeruginosa* est complexe et fait intervenir de nombreux régulateurs, modulant l'activité du SST6 notamment par des régulations au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Ce niveau de complexité suggère différents rôles du SST6 qui est régulé selon l'environnement de la bactérie, permettant ainsi de s'adapter, de coloniser et de persister au sein d'une niche écologique.

4) Rôles du SST6

Le SST6 n'est pas uniquement associé à l'activité antibactérienne et à la virulence envers les cellules eucaryotes. A l'heure actuelle, il a été montré que de nombreuses bactéries possèdent une activité antibactérienne (Hood et al., 2017) (figure 61). Dans cette partie, je citerai de nombreuses fonctions attribuées au SST6, à la fois dans la compétition interbactérienne et la pathogénie mais également dans son implication dans l'acquisition d'ions dans l'environnement, le comportement social et la formation de biofilm (figure 62). Bien sûr, cette liste n'est pas exhaustive mais donne un aperçu général des rôles du SST6. Le SST6 de *Pseudomonas fluorescens* MFE01 étant fortement impliqué dans l'activité bactéricide et non dans la virulence envers des cellules eucaryotes, je développerai d'avantage le rôle du SST6 dans la compétition bactérienne.

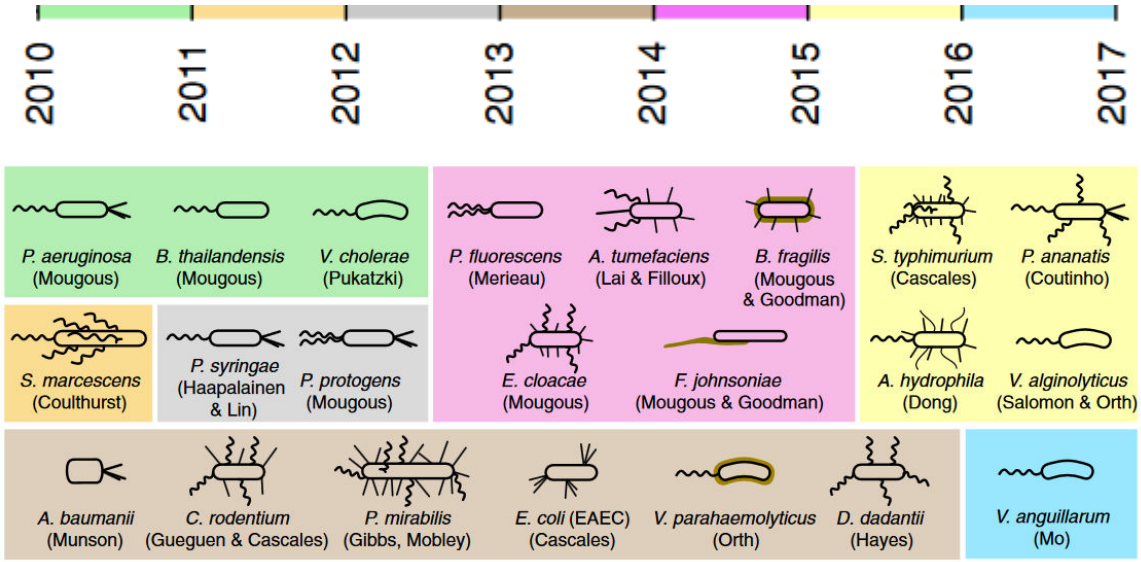


Figure 61: Découvertes chronologiques des diverses espèces bactériennes possédant une activité bactéricide *via* le SST6. Adapté de (Hood et al., 2017).

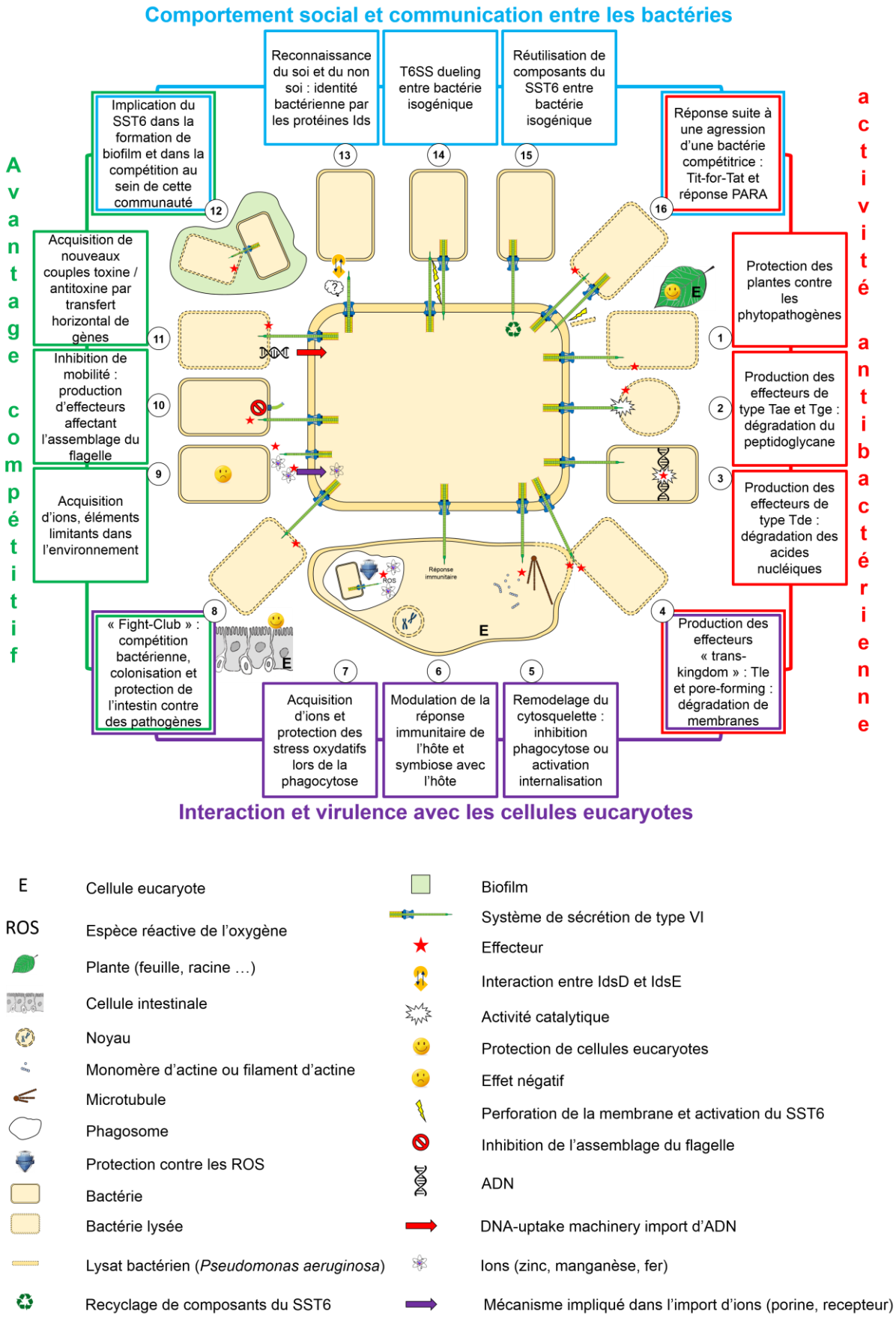


Figure 62: Les principaux rôles du SST6. (non publié).

1 : L'activité antibactérienne exercée par le SST6 (*Pseudomonas fluorescens* MFE01 et *Pseudomonas putida* KT2440) permet de protéger la plante contre des phytopathogènes (Bernal et al., 2017; Decoin et al., 2014).

2 : Les toxines de type Tae (Type VI amidase effector) et Tge (Type VI glycoside hydrolase effector) permettent de cliver certaines liaisons du peptidoglycane et induisent la mort cellulaire suite à une déformation de la bactérie cible. Ces toxines ont tout d'abord été découvertes chez *Pseudomonas aeruginosa* puis mises en évidence chez d'autres bactéries (Decoin et al., 2014; Durand et al., 2014; English et al., 2012; Hood et al., 2010; Russell et al., 2011, 2012; Whitney et al., 2013).

3 : Les toxines de type Tde (Type VI DNAse effector) dégradent les acides nucléiques, induisant la mort cellulaire. Ces effecteurs ont été découverts chez *Agrobacterium tumefaciens* mais aussi chez *Dickeya dadantii* (Koskiniemi et al., 2013; Ma et al., 2014).

4 : Les toxines de type Tle (Type VI lipase effector) dégradent les lipides des cellules eucaryotes et procaryotes (« trans-kingdom ») (Bleves et al., 2014; Jiang et al., 2014, 2016; Russell et al., 2013). Les phospholipases PldA et PldB interagissent avec la voie PI_3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt pathway *et* sont impliquées dans l'internalisation de *Pseudomonas aeruginosa* (Sana et al., 2016a).

5 : Des protéines VgrG possèdent des extensions C-terminales avec un domaine actin-crosslinking (ACD) ou un domaine ADP-ribosyltransferase (ADPRT) et sont impliquées dans le remodelage de l'actine. Ces effecteurs sont notamment impliqués dans l'inhibition de la phagocytose chez *Vibrio cholerae* (Ma et al., 2009a; Satchell, 2009). Le remodelage du cytosquelette permet entre autre l'internalisation. D'autres effecteurs peuvent interagir avec le centre de nucléation des microtubules γTuRC et permettre l'internalisation de *Pseudomonas aeruginosa* (Sana et al., 2015, 2016a).

6 : Le SST6 d'*Helicobacter hepaticus* créerait un environnement immunitaire « tolérant » et entrainerait une symbiose entre la bactérie et l'hôte (Chow and Mazmanian, 2010).

7 : Le stress oxydatif active le SST6 de *Burkholderia thailandensis* et *Yersinia pseudotuberculosis* permettant ainsi l'acquisition des ions Mn^{2+} et Zn^{2+}, respectivement. Ces ions interviennent dans la résistance au stress oxydatif lors de la phagocytose (Wang et al., 2015; Si et al., 2017a).

8 : Le SST6 des souches non toxigéniques de *Bacteroides fragilis* a un rôle dans la compétition vis-à-vis des souches de *B. fragilis* entéro-toxigéniques et offre alors une protection de l'intestin contre la colonisation de souches pathogènes (Sana et al., 2017;Hecht et al., 2016).

9 : Certains effecteurs du SST6 sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et sont liés à l'acquisition d'ions (Fe^{3+} et Zn^{2+}), éléments indispensables à la croissance bactérienne (Si et al., 2017b).

10 : Le SST6 de *Pseudomonas fluorescens* MFE01 assure la sécrétion, par l'intermédiaire de la protéine Hcp1, de un ou plusieurs effecteurs qui inhiberaient l'assemblage du flagelle. (Decoin et al., 2015).

11 : Le SST6 intervient dans la lyse de bactérie compétitrice, libérant ainsi de l'ADN chromosomique qui sera assimilé par la « DNA-uptake machinery » chez *Vibrio cholerae* compétente (Blokesch, 2015; Borgeaud et al., 2015; Thomas et al., 2017).

12 : Le SST6 joue un rôle dans la formation (de Pace et al., 2011; Tian et al., 2015; Weber et al., 2016; Zhang et al., 2014) et dans la maturation de biofilm (Gallique et al., 2017a) mais également dans la compétition au sein d'un biofilm (Gallique et al., 2017a).

13 : La protéine IdsD, sécrétée par le SST6 de *Proteus mirabilis*, interagit avec IdsE d'une autre souche et l'interaction spécifique entre ces deux protéines permet de reconnaitre une souche de même parenté (Alteri et al., 2013; Cardarelli et al., 2015; Wenren et al., 2013).

14 : *Pseudomonas aeruginosa* peut percevoir la perforation d'une autre *P. aeruginosa* et activer à son tour son SST6. Cette activation locale est appelée « T6SS dueling » (Basler and Mekalanos, 2012).

15 : Certains composants du SST6, tels que les protéines Hcp, VgrG ou bien les effecteurs, peuvent être recyclés entre les bactéries isogéniques (Vettiger and Basler, 2016).

16 : *Pseudomonas aeruginosa* peut percevoir la présence d'un agresseur *via* la réponse PARA (libération de débris cellulaire d'une bactérie isogénique) ou suite à une perforation par un SST6 d'une souche compétitrice (« Tit-for-Tat »). Suite à la perception de cette agression, *P. aeruginosa* active son SST6 afin d'éliminer la bactérie compétitrice (Basler et al., 2013; LeRoux et al., 2015).

a) La compétition interbactérienne

Beaucoup d'études portent sur les systèmes de sécrétion de type VI du pathogène opportuniste *P. aeruginosa*. Chez ce pathogène opportuniste, pour rappel, il existe trois clusters du SST6 (notés H1- à H3-T6SS) codant pour trois appareils de SST6. Alors que le H1-T6SS est impliqué dans l'activité antibactérienne (Hood et al., 2010), le H2- et H3-T6SS sont impliqués à la fois dans la virulence envers les cellules eucaryotes et l'activité antibactérienne (Lesic et al., 2009; Sana et al., 2012, 2015).

i. Implication des toxines ciblant le peptidoglycane dans l'activité antibactérienne

Découvert pour la première fois chez *P. aeruginosa*, les toxines Tse1 (ou Tae1^{PA}) et Tse3 (ou Tge1^{PA}), délivrées par le H1-T6SS exercent des activités hydrolytiques de type amidase et muramidase sur le peptidoglycane, respectivement (Russell et al., 2011) (figure 63) (Tse : Type VI secretion exported). Les toxines sont classées selon la nature de leur activité enzymatique.

Les Tae (Type VI secretion amidase effector) qui clivent les liaisons peptidiques sont classées en quatre sous-catégories notées Tae1-4 (Durand et al., 2014; Russell et al., 2012) alors que les Tge (Type VI secretion glycoside hydrolase effector) clivent les liaisons osidiques β1-4 entre le résidu N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et l'acide N-acétyl-muramique (MurNAc) et sont classées en trois sous-catégories notées Tge1-3 (Durand et al., 2014; Whitney et al., 2013). Les protéines d'immunité permettent d'inhiber l'activité toxique par interaction directe et sont appelées Tai et Tgi, respectivement à la catégorie de la toxine correspondante (Tae ou Tge). Les protéines d'immunité ont un rôle essentiel, puisque ces protéines évitent l'auto-intoxication, c'est-à-dire l'action toxique de l'effecteur entre les cellules sœurs (isogénique). Par exemple, les bactéries isogéniques peuvent s'affronter, mécanisme appelé « dueling », comme c'est le cas chez *P. aeruginosa* (Basler and Mekalanos, 2012) et résister à l'injection des toxines injectées par leur cellules soeurs. C'est d'ailleurs sur ce principe que repose l'identification de protéines d'immunité par les méthodes de mutagénèse aléatoire Tn-Seq (Transposon mutagenesis and deep sequencing) (Dong et al., 2013).

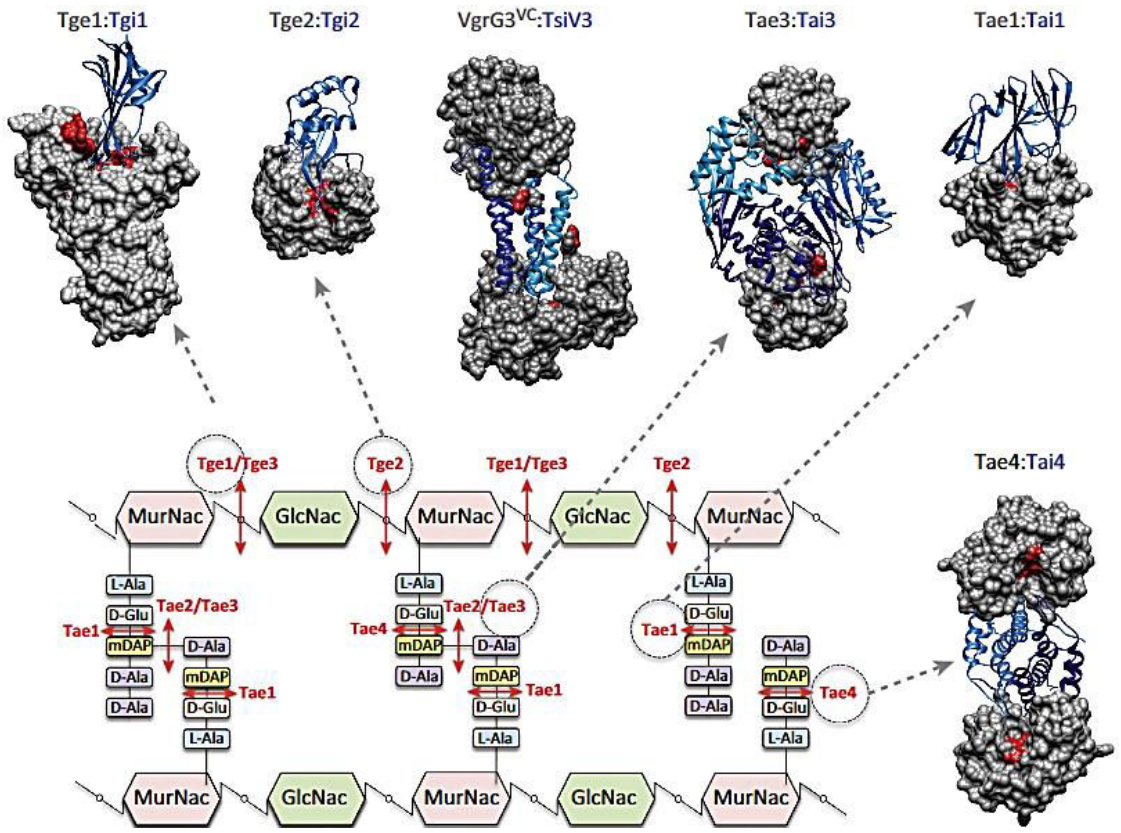


Figure 63: Structure et fonction des toxines délivrées par le SST6 ciblant le peptidoglycane. (Durand et al., 2014). Représentation schématique des liaisons cibles (flèches rouges) des toxines de type Tae et Tge sur les chaines peptidiques et osidiques du peptidoglycane. Les structures par cristallographie des couples toxines/antitoxines sont affichées en haut et à droite. Les toxines sont représentées en gris et leur site catalytique en rouge alors que leurs protéines d'immunité respectives figurent en bleu. GlcNac : acide N-acétyl-D-glucosamine ; MurNAc : acide N-acétyl-muramique ; mDAP : acide méso-diaminopimélique ; Tge : Type VI secretion glycoside hydrolase effector et Tae : Type VI secretion amidase effector.

Il est important de noter que la région périplasmique est très fine (environ 10-25 nm) (Van Wielink and Duine, 1990). Par conséquent, les toxines devraient être plus facilement délivrées dans le cytoplasme que dans le périplasme (Ho et al., 2017). Ainsi on peut poser la question suivante: comment une toxine ciblant le périplasme, délivrée dans le mauvais compartiment cellulaire de la bactérie cible, arrive-t-elle à atteindre le périplasme? On peut postuler que le peptidoglycane est bien trop rigide pour que le SST6 puisse entièrement perforer la paroi bactérienne (le trimère VgrG serait stoppé au niveau du peptidoglycane) et donc les toxines seraient bien délivrées directement dans le bon compartiment. Mais il est envisageable que le SST6 injecte la toxine dans le cytoplasme et que cet effecteur puisse atteindre la région périplasmique suite à la perforation de la membrane provoquée par le SST6. Très récemment, Ho et collaborateurs ont montré que l'effecteur VgrG3 de *Vibrio cholerae,* qui dégrade le

peptidoglycane, possède une région de liaison (linker) similaire (mais légèrement différente) au peptide signal TAT (twin-arginine translocation pathway). Ce domaine est localisé entre le « core » de la protéine VgrG (région N-terminale correspondant à la partie gp27-gp5) et le domaine C-terminal toxique (Ho et al., 2017). Malgré l'injection de l'effecteur VgrG3 dans le cytoplasme de la bactérie cible, cette toxine, *via* cette région « linker », peut alors atteindre le périplasme. Cependant, l'inactivation du système de translocation TAT n'empêche pas la cytotoxicité de VgrG3, suggérant que cet effecteur atteint le périplasme indépendamment du système TAT. Il est probable que ce domaine « linker » posséderait une activité permettant la pénétration de la membrane interne et puisse donc « s'auto-transporter » à travers la membrane, c'est-à-dire indépendamment de tout système de translocation bactérien.

De même, il s'avère que la région N-terminale de TseL (effecteur de type lipase de *V. cholerae*) joue un rôle essentiel dans l'arrivée de la toxine dans le périplasme car les lipases dégradent les lipides aux interfaces périplasme-membranes (Durand et al., 2014; Russell et al., 2013). En ce qui concerne l'antitoxine de TseL, cette protéine d'immunité serait transportée à travers la membrane interne *via* le système Sec (prédiction d'un signal de sécrétion), permettant ainsi à l'antitoxine d'atteindre le périplasme (Ho et al., 2017).

Chez *P. aeruginosa*, les effecteurs Tse1, Tse3, Tse4 et Tse5 ciblent le périplasme (Russell et al., 2011; Whitney et al., 2014). Chez *Vibrio cholerae*, VgrG3 possède un domaine à activité muramidase qui dégrade le peptidoglycane et la protéine d'immunité TsiV3 permet de neutraliser cette activité hydrolytique sur la souche productrice (Yang et al., 2014b). Chez *Serratia marcescens*, les effecteurs de type amidase Ssp1 (Tae4.1^{SM}) et Ssp2 (Tae4.2^{SM}) sont sécrétées par le SST6 et neutralisés par les protéines d'immunité Rap1a (Tai4.1a^{SM}) et Rap2a (Tai4.2a^{SM}) (English et al., 2012). La protéine Hcp2 de la souche *P. fluorescens* MFE01 permettrait également de sécréter une ou des toxines de type amidase. En effet, la production des protéines d'immunité Rap1a et Rap1b (de *Serratia marcescens*) permet de protéger la souche d'*Escherichia coli* de l'activité antibactérienne de MFE01 exercée *via* la protéine Hcp2 (Decoin et al., 2014; English et al., 2012). La protéine Hcp3 de la souche MFE01 est impliquée dans l'activité antibactérienne, et l'étude *in silico* révèle l'existence de gènes codant pour des putatives toxines de type NUDIX hydrolase et amidase (Gallique et al., 2017a).

Certains effecteurs appelés Tde (Type VI secretion DNase effector) ciblent les acides nucléiques et sont impliqués dans l'activité antibactérienne. Le phytopathogène *Dickeya dadantii* délivre par l'intermédiaire de protéines VgrG, les effecteurs RhsA et RhsB (de type Rhs) qui dégradent l'ADN (Koskiniemi et al., 2013). *Agrobacterium tumefaciens* produit deux toxines Tde1 (Atu4350) et Tde2 (Atu3640) présentant une activité nucléase et impliquées dans l'activité antibactérienne qui donne un avantage compétitif dans la colonisation de la plante de tabac *Nicotiana benthamiana* (Ma et al., 2014). La souche *Pseudomonas putida* KT2440 possède une multitude d'effecteurs dont Tke2 et Tke4 qui présentent au niveau de leur extrémité C-terminale un domaine cytotoxique appartenant à la famille des HNH nucléases (Bernal et al., 2017).

ii. Implication du SST6 dans la protection des plantes

Pectobacterium atrosepticum est un phytopathogène responsable de la pourriture molle du tubercule de pomme de terre. En 2014, Decoin et collaborateurs ont montrés que la souche *P. fluorescens* MFE01 exerce une activité antibactérienne *via* un SST6 fonctionnel contre un large spectre bactérien, dont *P. atrosepticum* et *P. aeruginosa* H103 (Decoin et al., 2014). La souche non pathogène MFE01 permet de protéger le tubercule de pomme de terre (rhizosphère) du phytopathogène *P. atrosepticum* en compétition *in planta via* l'activité antibactérienne associée à la protéine Hcp2 en relation avec le SST6. La protéine Hcp2 permettrait la sécrétion d'une toxine qui ciblerait le peptidoglycane. De plus, MFE01 protège également la feuille d'endive (phyllosphère) de la macération provoquée par *P. aeruginosa* H103. Pour la première fois, les auteurs ont mis en évidence l'importance du SST6 dans la protection d'une plante contre un phytopathogène et donc le potentiel rôle du SST6 dans l'activité PGPR (plant growth promoting rhizobacterium). La souche de biocontrôle *Pseudomonas putida* KT2440 possède trois clusters codant pour la machinerie de SST6 (notés K1-, K2- et K3-T6SS) ainsi que 10 couples toxines-protéines d'immunité (notés Tke-Tki, pour Type six KT2440 effector and immunity) (Bernal et al., 2017). Le K1-T6SS est fonctionnel et impliqué dans l'activité antibactérienne contre plusieurs phytopathogènes tels que *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum* et *Agrobacterium tumefaciens.* La souche KT2440

permet de protéger la feuille de tabac *Nicotiana benthamiana* contre le phytopathogène *Xanthomonas campestris* en compétition *in planta.*

Ryu en 2015 a souligné l'implication du SST6 de bactéries symbiotiques et la nodulation des racines de pois en mettant en relation deux publications datant de 1997 et 2003 (Bladergroen et al., 2003; Roest et al., 1997) avec le SST6 (découvert en 2006) (Ryu, 2015). Par exemple, chez la souche *Rhizobium leguminosarum* RBL5523, l'effecteur RbsB transporté *via* le SST6 (cluster de gènes appelé *imp* pour impaired in nitrogen fixation) est impliqué dans la fixation d'azote (Bladergroen et al., 2003). Cependant, le rôle de RbsB reste à élucider (Ryu, 2015). Le SST6 à la fois impliqué dans la colonisation de la plante (décrit chez le phytopathogène *A. tumafaciens*, Ma et al., 2014), la protection de plante par compétition avec des phytopathogènes *in planta* (Bernal et al., 2017; Decoin et al., 2014) et dans la fixation d'azote, exercerait donc un rôle important dans l'activité PGPR (Ryu, 2015).

Alors que le système de sécrétion de type III (SST3) est impliqué dans la virulence envers les végétaux, le SST6 au contraire ne semble pas participer directement à cette cytotoxicité. En effet, bien que certains phytopathogènes possèdent un SST6, ce dernier n'a pas été montré comme impliqué dans la phyto-toxicité. Par exemple, *Pseudomonas syringae* sécrète la protéine Hcp2 qui n'est ni impliquée dans la colonisation ni dans la virulence envers la plante (Haapalainen et al., 2012). Chez *Pectobacterium atrosepticum*, l'expression des gènes *hcp*, *vgrG* et ceux du cluster du SST6 est augmentée lors de la présence d'extraits de pommes de terre (Mattinen et al., 2008) mais ne participe pas à la virulence envers le tubercule de pomme de terre. Les phytopathogènes *Agrobacterium tumefaciens* et *Dickeya dadantii* possèdent aussi un SST6 mais il n'est impliqué que dans l'activité antibactérienne *via* des effecteurs de type nucléase (Koskiniemi et al., 2013; Ma et al., 2014). De même, l'inactivation du SST6 de *Xanthomonas euvesicatoria* n'affecte pas la virulence envers les feuilles de plante de tomate et de piment (Abendroth et al., 2017). Ces exemples illustrent plutôt que si un phytopathogène possède un ou des SST6, ce dernier est impliqué dans la compétition bactérienne et non dans la virulence envers les végétaux.

Cependant, le SST6 de ces phytopathogènes peut être considéré comme un facteur indirect dans cette phyto-pathogénicité puisqu'il est impliqué dans l'activité antibactérienne. Ainsi en tuant les bactéries protectrices, le phytopathogène peut coloniser la plante et ainsi déployer un arsenal (par exemple le SST3) induisant une

pathologie chez le végétal. Une bactérie PGPR possédant un SST6 joue alors un rôle clef dans la protection de la plante puisque cette bactérie, *via* ses toxines, peut également rentrer en compétition avec les phytopathogènes mais aussi résister aux autres bactéries *via* ses antitoxines.

iii. Implication du SST6 dans la compétition interbactérienne au sein d'un biofilm

Le biofilm est une communauté microbienne englobée dans une matrice protectrice. Les bactéries dans l'environnement sont très souvent retrouvées dans ce type de structure, et notamment les PGPR, dont *Bacillus subtilis,* au niveau des racines de plantes (Rudrappa et al., 2007). Ces biofilms sont souvent multi-espèces (Yang et al., 2011). Au sein même d'un biofilm, il existe des interactions entre les micro-organismes qui entretiennent un remodelage dynamique de la communauté microbienne (communication, coopération et compétition) (Flemming et al., 2016). Dans l'environnement, les bactéries sont majoritairement retrouvées au sein d'un biofilm et très rarement sous forme planctonique (Giaouris et al., 2015). En effet, le biofilm offre de nombreux avantages comme, par exemple, une protection contre le dessèchement mais aussi dans la capture de nutriments (Flemming et al., 2016). Pourtant, la plupart des études mettent en évidence l'implication du SST6 dans l'activité antibactérienne entre des bactéries planctoniques, forme de vie bactérienne minoritaire dans l'environnement. L'implication du SST6 au sein d'un biofilm mixte a été mis en évidence (Gallique et al., 2017a). La souche *P. fluorescens* MFE01 inhibe, *via* le SST6, la croissance et la prolifération de MFP05, une autre souche de *Pseudomonas fluorescens*, au sein d'un biofilm. Cette étude souligne le rôle du SST6 dans la compétition interbactérienne au sein d'un biofilm et permettrait ainsi un remodelage dynamique de la communauté bactérienne dans ce microenvironnement.

iv. Inhibition de mobilité par le SST6

Certaines études ont mis en relation le SST6 et la mobilité (Decoin et al., 2015; Liu et al., 2015; de Pace et al., 2011). En 2011, la mutation du gène *icmF* (intracellular multiplication factor, codant pour la protéine TssM) chez la souche *d'E. coli* APEC

(avian pathogenic *Escherichia coli*) SEPT362 entraîne la perte de mobilité (de Pace et al., 2011). En effet, chez ce mutant *icmF*, des gènes flagellaires sont sous-exprimés notamment *flhC*, *flhD*, *flgM* et *fliA*. Les auteurs associent la protéine IcmF à plusieurs phénotypes tels que l'adhésion, l'invasion des cellules épithéliales, la survie et prolifération au sein d'un macrophage, la formation de biofilm et la mobilité. Liu et collaborateurs en 2015 ont démontré que le SST6 d'une souche de *Citrobacter freundii* CF74 intervient dans la sécrétion de la flagelline FliC et que la mutation du SST6 diminue significativement la transcription de gènes flagellaires (*fliC*, *fliD*, *flgK*, *flgL*, *flgM* et *fliT*) (Liu et al., 2015). Les mutations des gènes *clpV*, *vgrG* et *hcp2* diminuent également la transcription certains de ces gènes. Ces deux publications mettent en évidence l'implication du SST6 dans la mobilité chez des entérobactéries, chez lesquelles la régulation du flagelle est différente de celle décrite pour les *Pseudomonas* (classe I-III pour les entérobactéries alors que pour les *Pseudomonas* : classe I-IV). Ces deux articles mettent en évidence que le SST6 est impliqué dans la régulation du flagelle et dans la colonisation de ces pathogènes.

En 2015, nous avons mis en évidence que le SST6 chez *Pseudomonas fluorescens* MFE01 est impliqué dans l'inhibition de mobilité de type « swarming » d'une autre souche de *P. fluorescens* MFN1032 (Decoin et al., 2015). Cette immobilisation est spécifique à la protéine Hcp1 alors que les protéines Hcp2 et Hcp3 sont impliquées dans l'activité antibactérienne (Decoin et al., 2014; Gallique et al., 2017a). La mutation du gène *hcp1* entraîne la perte de mobilité de la souche, probablement par l'accumulation de la ou des toxine(s) associée(s) à Hcp1. La délétion d'un gène codant pour la machinerie du SST6 (MFE01Δ*tssC*) entraîne également la perte de la capacité de la souche à se déplacer. Au cours de cette étude, nous avons suggéré que la perte de mobilité de la souche cible est associée au SST6 et plus particulièrement à un ou des effecteurs qui ciblerai(en)t le flagelle. Même si les auteurs n'ont pas émis cette hypothèse, il est envisageable que la mutation du SST6 chez *E. coli* EAEC et chez *Citrobacter freundii* entraîne la perte de mobilité suite à l'accumulation d'une toxine « anti-flagelle ». Le flagelle est essentiel à la colonisation d'une niche environnementale (Capdevila et al., 2004; De Weger et al., 1987; Liu et al., 2015; de Pace et al., 2011). Il est envisageable que l'inhibition de mobilité d'une bactérie cible donne un avantage à la bactérie productrice en empêchant la colonisation (implication du flagelle) d'un nouveau compétiteur au sein d'un territoire.

v. Implication des toxines ciblant les membranes

Les effecteurs transportés par le SST6 ciblent également les membranes. Les enzymes appartenant à la famille des phospholipases/lipases, délivrées par le SST6 sont appelées Tle (Type VI secretion lipase effector) et sont classées en 5 familles (Russell et al., 2013). Les lipases Tle1 à Tle4 possèdent un domaine conservé GxSxG (motif retrouvé pour la plupart des estérases et lipases) alors que les Tle5 possèdent un double motif HxKxxxxD (caractéristique des phospholipases D). La capacité des effecteurs de type Tle à cibler une structure conservée chez les cellules eucaryotes et les bactéries suggère que ces effecteurs sont à la fois impliqués dans la pathogénie et l'activité antibactérienne. Les effecteurs de type Tle peuvent être alors considérés comme des « trans-kingdom toxins » (Jiang et al., 2014, 2016). La phospholipase D (nommée PldA ou Tle5), sécrétée *via* le H2-T6SS de *P. aeruginosa* (impliquée dans la virulence des cellules eucaryotes), participe à l'activité antibactérienne par la dégradation d'un des composants majoritaires de la membrane bactérienne, le phosphatidyléthanolamine (Russell et al., 2013). Les auteurs décrivent également d'autres phospholipases présentes chez *Vibrio cholerae* (de type phospholipase A_1, nommé PLA_1 ou $Tle2^{VC}$) et chez *Burkholderia thailandensis* (de type phospholipase A_2, nommé PLA_2 ou $Tle1^{BT}$) et leur mode d'action (figure 64). Les protéines d'immunité Tli (Tli1 à Tli5 selon la famille de l'effecteur) sont potentiellement localisées au niveau du peptidoglycane car les gènes *tli* codent pour des putatives protéines périplasmiques ou des lipoprotéines. Il existe d'autres effecteurs ciblant les membranes chez *Pseudomonas aeruginosa*, notamment TplE qui est une toxine possédant une activité lipase de type phospholipase A1 (hydrolyse des fonctions esters) et lipolytique (dégradation des acides gras). La toxine TplE dégrade les lipides une fois délivrée dans le périplasme bactérien et cible également le réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes de l'hôte (Jiang et al., 2016). PldB, dépendant du H3-T6SS, qui est impliqué dans l'activité antibactérienne facilite aussi l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales humaines (Jiang et al., 2014).

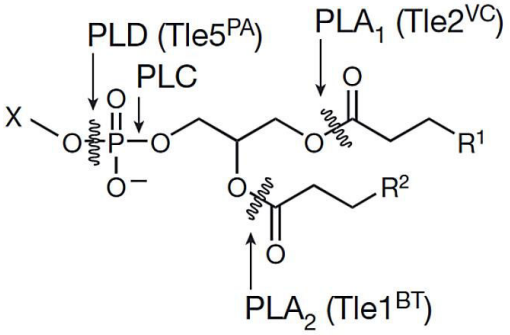


Figure 64: Activité des effecteurs de type lipase sur les phospholipides. (Russell et al., 2013) Schéma des sites cibles des lipides par les lipases PldA de *P. aeruginosa* (Tle5^{PA}), PLA_1 de *Vibrio cholerae* (Tle2^{VC}) et PLA_2 de *Burkholderia thailandensis* (Tle1^{BT}).

vi. Le SST6, un outil important dans la protection de l'intestin de l'hôte

Le microbiote de l'intestin est en ensemble dynamique, dépendant des capacités colonisatrices et compétitrices des micro-organismes. Les bactéries commensales doivent non seulement coloniser l'intestin mais également persister à l'arrivée d'organismes compétiteurs, dont des pathogènes.

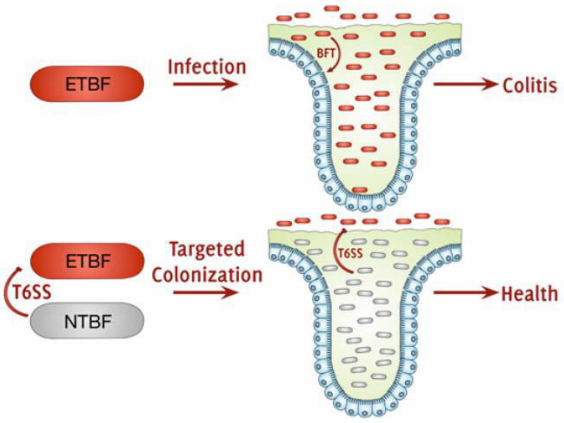


Figure 65: Importance du SST6 dans la protection de l'intestin de la souris contre la colonisation d'agents pathogènes. (Hecht et al., 2016) ETBF : Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* ; NTBF : non-toxigenic *Bacteroides fragilis* et BFT : *Bacteroides fragilis* toxin.

Le SST6 permet l'interaction entre les bactéries du microbiote et les pathogènes invasifs (Sana et al., 2017) et procure également un avantage dans la persistance dans l'intestin en minimisant la compétition nutritionnelle (Wexler et al.,

2016). Les auteurs montrent que le SST6 permet l'interaction et une sélection entre les micro-organismes du microbiote : *Bacteroides fragilis* est capable *in vitro* et *in vivo* de cibler d'autres espèces de *Bacteroides*. Il est estimé une fréquence de 10^9 évènements de transmission d'effecteurs par gramme de contenu du colon (Wexler et al., 2016). De plus, des analyses génomiques montrent la présence de 130 locus de SST6 dans une population de 205 *Bacteroidales* humains (Coyne et al., 2016) et des éléments du SST6 sont transférés entre les *Bacteroidales* (Coyne et al., 2014). Ces données suggèrent une importance capitale du SST6 dans la colonisation et la persistance dans l'intestin. Le SST6 joue en rôle important dans la protection de l'hôte par les bactéries commensales de l'intestin (Hecht et al., 2016) (figure 65). En effet, les souches non toxigéniques *Bacteroides fragilis* forment une barrière protectrice contre la colonisation des souches de *B. fragilis* entérotoxigénique responsables de colites. La compétition entre la souche entérotoxigénique de *B. fragilis* avec une souche non toxigénique, *via* les effecteurs du SST6, empêche la colonisation et la maladie chez un hôte murin.

b) Rôle du SST6 dans la virulence eucaryote

i. Cytotoxicité suite aux remaniements du cytosquelette d'actine

Certaines protéines VgrG possèdent une extension C-terminale comportant un domaine effecteur. Par exemple, VgrG-1, sécrétée par *Vibrio cholerae* V52, possède un domaine ACD (actin cross-linking domain) (Ma and Mekalanos, 2010; Pukatzki et al., 2007). Le domaine effecteur de VgrG-1 est similaire au domaine ACD de la toxine RtxA de *V. cholerae* (Pukatzki et al., 2007). Le domaine ACD permet de réticuler de manière covalente les monomères d'actines entre eux et ainsi de former un filament d'actine. VgrG contenant le domaine ACD est sécrétée lorsque la bactérie est phagocytée par un macrophage ou par l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Ma and Mekalanos, 2010; Ma et al., 2009a) et permet de remodeler le cytosquelette d'actine, empêchant le macrophage de phagocyter d'autres bactéries. La bactérie « sacrifiée » dans la lumière endosomale empêche ainsi la phagocytose d'autres souches de *V. cholerae*. Dans le cas de *Aeromonas hydrophila*, la protéine VgrG1 possède un domaine ADP-ribosyltransferase (ADPRT) au niveau de l'extension C-terminale

(Suarez et al., 2010). L'ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle permettant d'ajouter une molécule d'ADP-ribose au niveau de la chaine latérale de l'actine. La protéine VgrG, une fois injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote, perturbe le cytosquelette d'actine en modifiant la morphologie des cellules épithéliales HeLa (phénotype cellulaire arrondit). VgrG1 déclenche probablement la dépolymérisation des filaments d'actine au niveau de la barrière intestinale et permettrait l'entrée d'autres facteurs de virulence d'*A. hydrophila* (Suarez et al., 2010).

ii. Importance du SST6 dans l'internalisation dans les cellules épithéliales

Les effecteurs PldA et PldB possèdent une activité de type phospholipase D (possèdent deux domaines catalytiques HxKxxxxD) et sont délivrées *via* le H2-T6SS et le H3-T6SS de *P. aeruginosa*, respectivement (Jiang et al., 2014; Sana et al., 2012, 2015).

En plus de cibler le périplasme bactérien, ces effecteurs facilitent l'invasion intracellulaire des cellules eucaryotes de l'hôte en activant la voie PI3K/Akt (voie de signalisation intracellulaire) (Jiang et al., 2014; Sana et al., 2012). L'activité enzymatique de type phospholipase D de PldA et PldB, génére ainsi de l'acide phosphatique et contribue au phénotype invasive de *P. aeruginosa*. Ces deux effecteurs interagissent avec Akt1 et Akt2 (figure 66), deux protéines impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine. Par conséquent, PldA et PldB induisent la formation de protrusions, facilitant ainsi l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules de l'hôte suite à un remaniement du cytosquelette d'actine.

Le H2-T6SS est impliqué dans l'invasion des cellules épithéliales durant la phase exponentionnelle (Sana et al., 2012) alors que le H3-T6SS n'est pas actif durant cette phase. La protéine VgrG2, dont la sécrétion dépend de l'activité du H2-T6SS, interagit avec le centre de nucléation des microtubules γ-TuRC (gamma-tubulin ring complex components) (Kollman et al., 2011) et est impliquée dans l'internalisation de *P. aeruginosa* (Sana et al., 2015, 2016a).

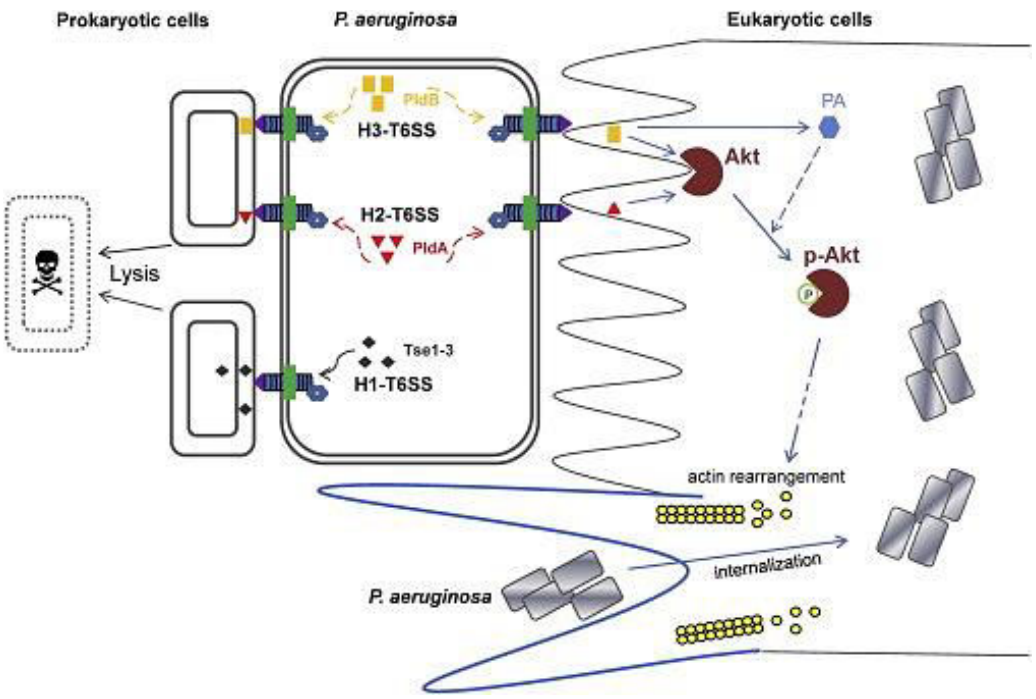


Figure 66: Action de PldA et PldB sur le remodelage du cytosquelette d'actine des cellules eucaryotes. (Jiang et al., 2014). Les toxines PldA et PldB sont délivrées *via* le H2- et H3-T6SS respectivement. Le réarrangement d'actine favorise alors l'internalisation du pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* au sein des cellules eucaryotes. PA : acide phosphatique.

iii. Induction de l'autophagie et stress du réticulum endoplasmique de l'hôte

Décrite dans un chapitre précèdent, la toxine TplE, également appelée Tle4 (Lu et al., 2014), est délivrée par le H2-T6SS de *P. aeruginosa.* Elle cible à la fois les cellules eucaryotes et procaryotes. La protéine d'immunité TplEi (ou Tli4) est présente dans le périplasme et interagit directement avec la toxine, réprimant l'action néfaste de l'effecteur (Jiang et al., 2016; Lu et al., 2014). La phospholipase TplE (pour Type 6 PGAP1-like effector) possède un domaine de type PGAP1 (post-glycosylphosphatidylinositol attachment to proteins 1) (Jiang et al., 2016). La protéine membranaire eucaryote PGAP1 possède un domaine conservé caractéristique des lipases (motif GxSxG) et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Les auteurs ont montré que l'effecteur TplE cible le compartiment du réticulum endoplasmique de l'hôte, induisant la perturbation de cet organite. L'effecteur TplE entraîne alors un stress au niveau du réticulum et peut conduire à l'induction de l'autophagie (auto-dégradation d'une partie du cytoplasme par les lysozymes de la cellule) des cellules épithéliales humaines.

iv. Effecteurs impliqués dans l'acquisition d'ions dans l'hôte

Le SST6 ne permet pas uniquement l'injection des effecteurs directement dans le cytoplasme de la cellule cible, mais peut également sécréter l'effecteur dans le milieu extracellulaire.

Par exemple, l'expression des gènes du T6SS-4 de la bactérie *Yersinia pseudotuberculosis* est activée par OxyR, un régulateur transcriptionnel qui régule de l'expression de nombreux gènes de réponse au stress oxydatif (Wang et al., 2015). Le T6SS-4 est impliqué dans l'accumulation d'ions zinc (les ions Zn^{2+} sont des co-facteurs de nombreuses enzymes essentielles) dans le cytoplasme et est requis dans la neutralisation des radicaux hydroxyles accumulés lors de stress oxydatif. En effet, la protéine YezP (*Yersinia* extracellular zinc-binding protein) est sécrétée *via* le T6SS-4 d'*Y. pseudotuberculosis* et est impliquée dans l'acquisition de l'ion zinc Zn^{2+} provenant du milieu extracellulaire. L'effecteur YezP permet alors à la bactérie d'assimiler les ions zinc et de résister au stress oxydatif. L'hôte et la bactérie sont en compétition pour cet élément limitant, révélant un nouveau mécanisme du SST6 dans la pathogénie. De plus, le T6SS-4 est activé lorsque la bactérie est phagocytée par un macrophage et le mutant du T6SS-4 n'est plus virulent envers le modèle murin.

Chez *Burkholderia thailandensis*, le régulateur OxyR régule négativement l'expression des gènes du T6SS-4 (Si et al., 2017a). Le T6SS-4 est activé lors d'un stress oxydatif et sécrète dans le milieu extracellulaire TseM, un effecteur impliqué dans la prise en charge des ions manganèse (Mn^{2+}) (figure 67). TseM interagit ensuite avec le transporteur de membrane externe TonB-dépendant MnoT. Ce transporteur spécifique aux ions Mn^{2+} permet d'internaliser les ions manganèses dans le cytoplasme bactérien. L'accumulation cytoplasmique des ions Mn^{2+} permet à la bactérie de résister là encore au stress oxydatif. L'expression du gène *mnoT* est également régulée négativement par OxyR. Les auteurs ont également montré que le T6SS-4, TseM et MnoT sont impliqués dans la virulence envers la larve de la fausse teigne de la cire *Galleria mellonella.* L'import des ions manganèses confère aussi un avantage dans la compétition interbactérienne et ne nécessite pas de contact entre les bactéries compétitrices.

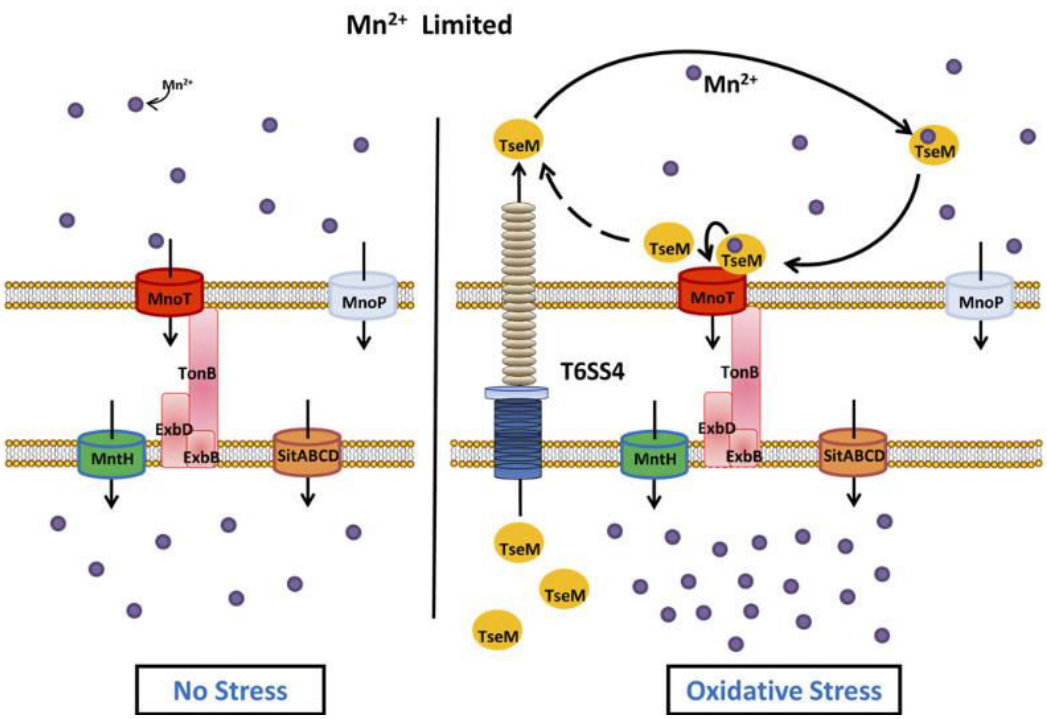


Figure 67: Modèle du transport des ions manganèse chez *Burkholderia thailandensis*. (Si et al., 2017a). Lors d'un stress oxidatif, le T6SS-4 est activé et peut alors sécréter TseM, une protéine qui interagit avec les ions Mn^{2+}. TseM intéragit avec le transporteur MnoT, permettant l'internalisation des ions dans le cytoplasme bactérien.

v. Implication du SST6 dans la réponse inflammatoire

Helicobacter hepaticus est une bactérie considérée comme un « pathobiont intestinal », c'est-à-dire que cet organisme est en symbiose avec l'hôte mais dans certaines conditions peut entrainer des pathologies. Chow et collaborateurs ont montré que le SST6 d'*H. hepaticus* permet à la fois de limiter le nombre de bactéries intracellulaires et d'atténuer les réponses immunitaires, innée et adaptative, des cellules épithéliales de l'intestin durant la colonisation bactérienne (Chow and Mazmanian, 2010). Dans ce cas, le SST6 permettrait de maintenir *H. hepaticus* dans un état non pathogène et ainsi de promouvoir une relation symbiotique entre la bactérie et l'hôte. L'inactivation du SST6 améliore le pouvoir colonisateur d'*H. hepaticus* et entraîne une réponse du système immunitaire conduisant à une inflammation de l'intestin. Cependant, une autre étude montre que les protéines VgrG1 et VgrG2 d'*H. hepaticus* augmentent la réponse pro-inflammatoire et que VgrG1 augmente le pouvoir pathogène de cette souche (Bartonickova et al., 2013).

c) Implication du SST6 dans une niche écologique : avantage et compétition

i. Effecteurs impliqués dans l'acquisition d'ions dans l'environnement

Certains ions sont indispensables au métabolisme bactérien et se trouvent en concentration limitante dans l'environnement. Tout comme pour les sidérophores, une bactérie sécrétant un effecteur SST6-dépendant lié à la séquestration et à l'internalisation d'ions peu bio-disponibles, possède un avantage compétitif.

La souche *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov. CMS^T est une bactérie du sol qui présente une activité antagoniste contre le phytopathogène du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Chen et al., 2016). Les auteurs ont montré que le SST6 est impliqué dans la sécrétion de pyoverdine mature, sidérophore majeur de *P. taiwanensis*. L'inactivation de la machinerie du SST6 provoque une accumulation de la pyoverdine dans le périplasme. Lorsque l'ion ferrique Fe^{3+} est limitant dans l'environnement, la pyoverdine permet d'assimiler les ions ferrique donnant ainsi un avantage compétitif et limite donc la croissance de *X. oryzae* pv. *oryzae.* L'import des ions Fe^{3+} complexés à la pyoverdine est réalisé *via* le récepteur FpvA. Le SST6 de *P. taiwanensis* offre donc un avantage compétitif dans l'acquisition d'éléments extracellulaires limitants. Il peut être envisagé que dans ce cas la souche exerce un rôle essentiel, *via* le SST6, dans la protection de la plante vis-à-vis d'un phytopathogène et dans l'activité de biocontrôle.

Chez *P. aeruginosa,* le H3-T6SS permet la sécrétion de TseF qui joue un rôle dans l'acquisition d'ion ferrique Fe^{3+} (Lin et al., 2017) (figure 68). En effet, TseF interagit avec le PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), molécule de la communication bactérienne mais aussi liée à la fixation des ions Fe^{3+}. TseF et le complexe PQS-Fe^{3+} sont incorporés dans les vésicules de membrane externe (OMV : outer membrane vesicule), présentes dans le milieu extracellulaire. TseF interagit avec le récepteur FptA et/ou la porine OprF et faciliterait ainsi l'import du complexe PQS-Fe^{3+} dans le cytoplasme bactérien.

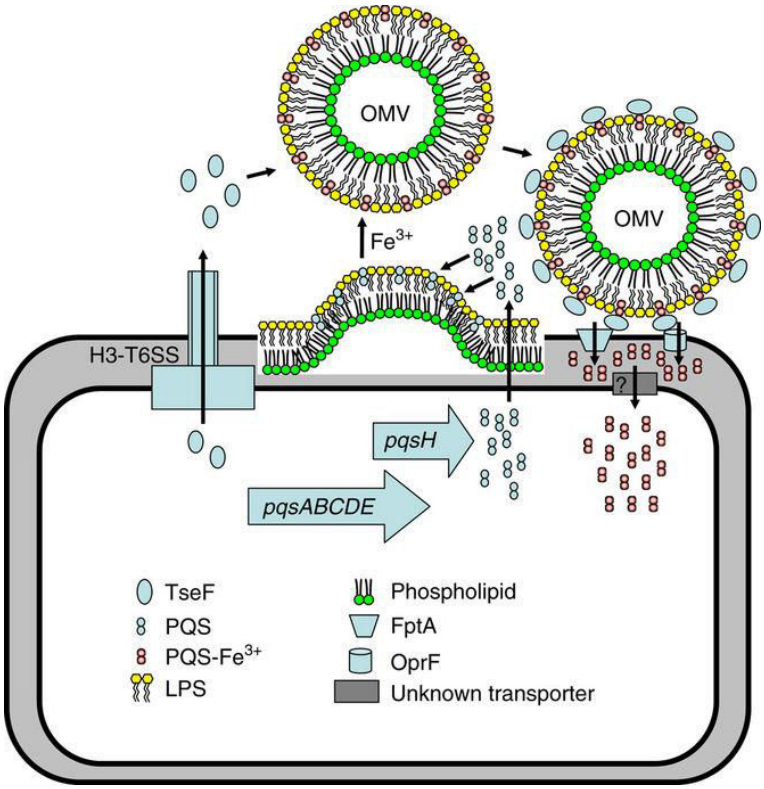


Figure 68: Mécanisme d'action de TseF dans l'acquisition d'ion ferrique. (Lin et al., 2017). L'effecteur TseF est sécrété dans le milieu extracellulaire par le H3-T6SS de *Pseudomonas aeruginosa*. Ensuite TseF interagit avec le complexe PQS-Fe^{3+} incorporé dans les vésicules de membranes externes. TseF interagit avec les récepteurs de membrane externe FptA et/ou la porine OprF et faciliterait ainsi l'import du complexe PQS-Fe^{3+} dans le cytoplasme bactérien. OMV : vésicule de membrane externe ; PQS : *Pseudomonas* quinolone signal et LPS : lipopolysaccharide.

Ainsi pour l'acquisition du fer, *P. aeruginosa* utilise d'autres systèmes que les sidérophores (pyochéline, pyoverdine). L'effecteur TseF et les molécules du PQS interviennent dans l'acquisition d'éléments extracellulaires limitants, donnant alors un avantage compétitif. Chez *Burkholderia thailandensis*, le T6SS4 intervient dans la sécrétion de l'effecteur TseZ (type VI secretion system effector for zinc acquisition) (Si et al., 2017b). Ce dernier est lié à l'acquisition de zinc et interagit avec le transporteur d'hème HmuR localisé au niveau de la membrane externe. Le transporteur HmuR intervient dans le transport d'ion Zn^{2+} lors de condition de stress oxydatif et joue un rôle important dans la résistance au cours de ce stress. TseZ est également requis pour une survie bactérienne maximale lors de stress oxydatif. La voie de transport de zinc, dépendant du T6SS4 et du transporteur HmuR offre un avantage compétitif et ne nécessite pas de contact direct avec les autres bactéries compétitrices (Si et al., 2017b). Tout comme les effecteurs de type lipase, TseZ est à la fois impliqué dans la

compétition bactérienne et dans la pathogénie. En effet, les mutants *clpv4* (T6SS4 inactif), *tseZ* et *hmuR* ne présentent plus de cytotoxicité envers la larve *Galleria mellonella* (Si et al., 2017b).

ii. Implication du SST6 dans la formation de biofilm

La mutation du gène *icmF* (intracellular multiplication factor) codant pour la protéine TssM (complexe membranaire) de la souche d'*Escherichia coli* APEC (avian pathogenic *E. coli*) SEPT362 entraîne l'incapacité à former des biofilms (de Pace et al., 2011). Le SST6 de cette souche contribue à l'adhésion de la bactérie sur les cellules épithéliales, favorise la formation de biofilm et pourrait jouer un rôle dans la dispersion de ce pathogène. De même, le SST6 de la souche d'*Acidovorax citrulli* xjl12 est lié à la formation de biofilm et est ainsi un facteur critique pour la colonisation des graines de melon (Tian et al., 2015). Il a également été montré que le SST6 du phytopathogène *Ralstonia solanacearum* intervient dans la formation de biofilm (Zhang et al., 2014). En revanche, la mutation du gène *tssM* d'une souche *d'Acinetobacter baumannii* n'altère pas la formation de biofilm (Weber et al., 2013) contrairement à ce qui est décrit chez *P. aeruginosa* où la mutation du gène *icmf3* (équivalent au gène *tssM*) améliore la formation de biofilm (Lin et al., 2015). Chez la souche *P. fluorescens* MFE01, nous avons montré que l'inactivation totale du SST6 (l'absence de la protéine TssC impacte sur l'assemblage et la contraction de la gaine) entraîne la perte de la capacité de la souche à former du biofilm (Gallique et al., 2017a). Il a été montré auparavant que le complexe membranaire est correctement assemblé lorsque les gènes *tssB* et *tssC* sont mutés (Durand et al., 2015). Dans le cas du mutant MFE01Δ*tssC*, la perte de la capacité de la souche à former un biofilm n'est donc pas corrélée à l'absence du complexe membranaire mais plutôt à une autre fonction du SST6. Nous proposons une implication du SST6 dans le comportement social de la souche, nécessaire à la formation de biofilm. De plus, les protéines Hcp1, Hcp2 et Hcp3 n'influencent pas sur la formation de biofilm ni son biovolume, mais jouent un rôle dans la maturation du biofilm (Gallique et al., 2017a).

iii. SST6, transfert horizontal et compétence naturelle

La machinerie d'import d'ADN de *V. cholerae* est impliquée dans l'assimilation d'ADN extracellulaire (DNA-uptake machinery) par la bactérie compétente (transformation naturelle) et est activée en présence de chitine (figure 69). L'assimilation d'ADN extracellulaire étranger permet le transfert horizontal de gènes, et donc à l'échange d'information génétique et favorisant ainsi l'évolution bactérienne. TfoX est un régulateur important dans l'activation de l'expression des gènes de la compétence naturelle et régule également de manière positive l'expression de différents gènes du SST6 (Borgeaud et al., 2015). De même, l'expression des gènes du SST6 de *Vibrio cholerae* O1 A1552 est régulée positivement par TfoX (et QstR, un autre régulateur important de la compétence naturelle). Ainsi, les auteurs ont montré que les gènes codant pour le SST6 de *V. cholerae* font partie du même régulon que ceux de la compétence naturelle et sont activés durant la croissance de certaines souches de *V. cholerae* sur des surfaces chitineuses (la chitine est un polysaccharide structural de nombreux eucaryotes) (figure 69). La machinerie d'assimilation d'ADN et le SST6 sont co-régulés positivement par TfoX, HapR et QstR (Blokesch, 2015; Borgeaud et al., 2015) (figure 70).

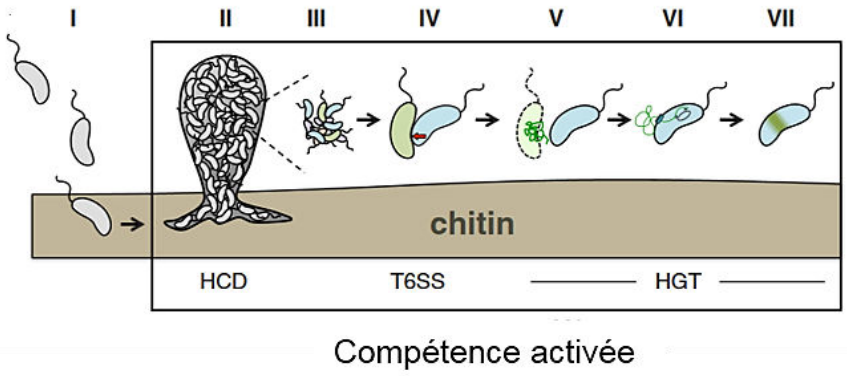


Figure 69: Schéma du mode d'action de V. cholerae dans l'acquisition d'ADN par transfert horizontal. Adapté de (Borgeaud et al., 2015). La chitine (marron clair), constituant de l'exosquelette du zooplancton est un élément souvent colonisé par *V. cholerae*. Une fois attachée (I), *V. cholerae* forme un biofilm à la surface de la chitine (II), très souvent multi-espèces (III). Les bactéries de différentes couleurs représentent une panoplie de couples toxines/antitoxines non compatibles (pas d'immunité croisée). La chitine ainsi que la forte densité bactérienne (HCD : high cell density), la compétence naturelle et également le SST6 (représenté par la flèche rouge) sont activés (IV). Le SST6 permet de lyser les bactéries non-isogéniques (ou non-immunes), libérant ainsi l'ADN de la bactérie cible (V). L'ADN libéré va être assimilé par la bactérie compétente (VI), entrainant la transformation naturelle et l'évolution lorsque le matériel génétique est incorporé (VII). HGT : Transfert de gènes horizontal et HCD : high cell density.

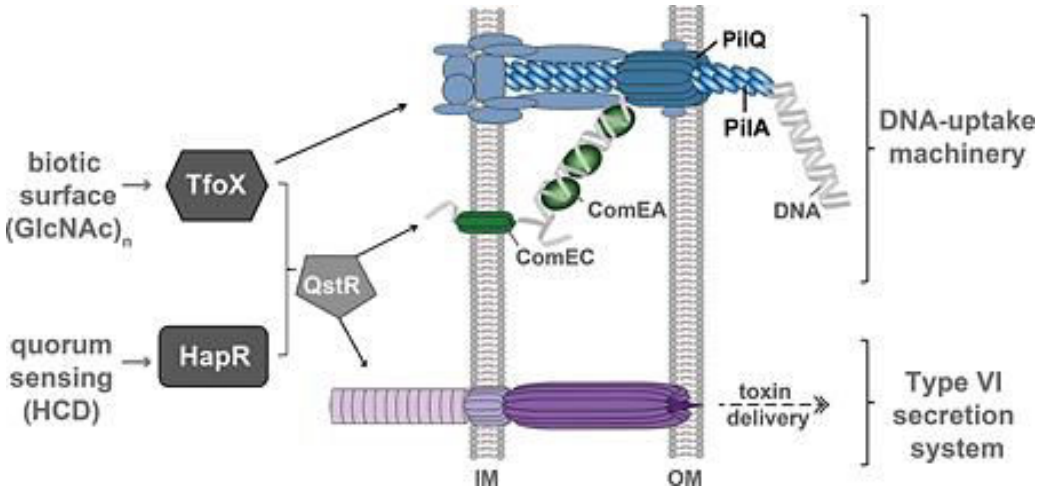


Figure 70: Le SST6 et le système d'import d'ADN de *Vibrio cholerae* sont co-régulés par trois protéines. (Blokesch, 2015). La chitine (formée de monomères de GlcNac), *via* le régulateur TfoX, et le quorum sensing, *via* la production de HapR, co-régulent à la fois le SST6 (violet) et le système d'import d'ADN (DNA-uptake machinery en bleu, ComEA et ComEC en vert). L'activité de QstR dépend à la fois des protéines TfoX et de HapR. IM : membrane interne ; OM : membrane externe ; GlcNac : acide N-acétyl-D-glucosamine et HCD : high cell density.

Le SST6 conduit à la lyse des bactéries voisines (ne possédant pas les protéines d'immunité), libérant ainsi l'ADN bactérien dans le milieu extracellulaire qui sera ensuite importé *via* le système d'import d'ADN. L'assimilation d'ADN étranger permet à la bactérie d'acquérir de nouveaux gènes (par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques) pouvant être incorporés dans le chromosome. Il a été montré que ce transfert horizontal est lié à l'acquisition de gènes du SST6 (Thomas et al., 2017), notamment dans celui des deux clusters auxiliaires *aux1* et *aux2* (contenant les gènes codant pour une protéine Hcp, une protéine VgrG, et un couple toxine-antitoxine) de *Vibrio cholerae*. Par conséquent, *V. cholerae* est capable, *via* son SST6, de lyser une bactérie cible et d'acquérir son « patrimoine génétique » par recombinaison homologue (échange d'allèles : acquisition d'un nouvel allèle et perte de « l'ancien » allèle) dont des couples toxines-antitoxines de SST6. L'acquisition de nouvelles protéines d'immunité offre également une protection contre l'agression par un SST6 de bactéries compétitrices. L'acquisition de nouveaux « répertoires » de toxines-antitoxines fonctionnelles augmente le fitness et procure un avantage adaptatif dans la compétition interbactérienne. Cependant, il est important de souligner que l'acquisition de nouvelles toxines s'avère risquée, puisque la bactérie compétente peut tuer ses « sœurs » qui elles n'ont pas acquis ni la toxine ni l'antitoxine (Thomas et al., 2017) !

iv. Implication du SST6 dans la colonisation ?

Le flagelle est un organelle indispensable à la colonisation (voir partie PGPR). Plusieurs publications montrent que l'inactivation du SST6 chez des phytopathogènes entraîne une sous-expression de certains gènes flagellaires mais également aussi une incapacité à coloniser la plante (Tian et al., 2015; Zhang et al., 2014). Ainsi, le SST6 intervient de manière indirecte à la colonisation de la plante par l'intermédiaire du flagelle.

Chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, le SST6 et les toxines associées de type DNase (Tde) confèrent un avantage compétitif durant la colonisation de la plante (Ma et al., 2014). Le SST6 (SPI-6) de *Salmonella Typhimurium* est requis lors de la colonisation de l'intestin de la souris (Sana et al., 2016b). De manière indirecte, le SST6 de ce pathogène entérique favorise la colonisation et l'infection de l'intestin de l'hôte par son activité antibactérienne envers les bactéries commensales de l'intestin. De plus, le SST6 des *Bacteroidales,* fonctionnel dans l'intestin, confère un avantage compétitif dans cet habitat (Chatzidaki-Livanis et al., 2016). Chez *Vibrio cholerae*, la délétion du gène codant pour la protéine d'immunité TsiV3 (inhibant l'action bactéricide de VgrG3) entraîne une déficience dans la colonisation de l'intestin du souriceau (Fu et al., 2013). En effet, la perte de l'antitoxine rend la bactérie sensible à l'attaque de bactérie sécrétant encore l'effecteur VgrG3. La présence de couples toxine-antitoxine est fondamentale dans la compétition interbactérienne et donc dans la colonisation d'une niche écologique.

d) Le SST6, un système permettant la communication entre les bactéries ?

i. Reconnaissance et comportement social des souches de *Proteus mirabilis*

Lorsque deux souches différentes de *Proteus mirabilis* se rencontrent sur gélose (en condition de « swarming »), une démarcation visible formant une frontière entre les deux populations bactériennes est observée (Alteri et al., 2013). Cette démarcation macroscopique située entre les souches mobiles est appelée « Dienes lines ». Les auteurs ont montré qu'un SST6 fonctionnel permet une interaction physique bactérie-

bactérie et est essentiel durant ce phénomène de reconnaissance. En effet, il semblerait que les souches de *P. mirabilis* localisée au niveau de cette frontière essayent de s'entre-tuer en utilisant des effecteurs dépendants du SST6 (Alteri et al., 2013).

La protéine IdsD (Ids pour identification of self) est sécrétée par le SST6 et permet de transmettre « l'identité » entre les bactéries avoisinantes (Wenren et al., 2013). Les deux protéines de reconnaissance IdsD et IdsE, probablement membranaires, intéragissent entre elles de manière spécifique ce qui conduit à un comportement social (Cardarelli et al., 2015). En effet, la protéine IdsD interagit uniquement avec sa protéine IdsE correspondante (elle n'interagit pas avec la protéine IdsE d'une autre souche). L'absence d'interaction entre IdsD et IdsE protéines est corrélée avec la formation de la démarcation visible entre les souches. Les auteurs supposent que la protéine IdsE interagit avec elle-même et contribue à la formation de cette démarcation. L'interaction entre IdsD sur IdsE empêcherait alors l'auto-interaction d'IdsE et atténuerait ainsi la restriction de mobilité de type « swarming » et provoquerait donc l'absence de démarcation macroscopique (Cardarelli et al., 2015). Dans ce cas, le SST6 permet de discriminer, par interaction physique, les souches de *P. mirabilis* entre elle, coordonne un mouvement collectif et contribue donc à un comportement social. Il est envisageable que les protéines IdsD et IdsE forment un couple toxine-antitoxine.

ii. « Tit-for-tat »: perception des bactéries avoisinantes

On distingue deux types de bactéries : les cellules attaquantes qui contractent leur SST6 de manière aléatoire (par exemple *Vibrio* cholerae) et les cellules défensives qui détectent l'agression d'une bactérie voisine (montré chez *P. aeruginosa*). En effet, *P. aeruginosa* est à la fois capable de percevoir l'attaque par le SST6 d'une souche de *P. aeruginosa* (Basler and Mekalanos, 2012), de *Vibrio cholerae* ou d'*Acinetobacter baumannii* (Basler et al., 2013). Par exemple, *V. cholerae* peut perforer aléatoirement *via* son SST6 une souche de *P. aeruginosa* qui percevra cette agression et « ripostera » en assemblant un SST6 à l'endroit de l'agression. Il est probable que *P. aeruginosa* survive à cette attaque par la présence de protéines d'immunité croisées.

La cascade de signalisation TagQRST permet de percevoir l'attaque suite à une perturbation de la paroi bactérienne (Basler et al., 2013; Casabona et al., 2013; Ho et al., 2013). Ceci est à rapprocher de l'altération de la membrane bactérienne induite par la polymyxine B qui provoque l'activation du SST6 (Ho et al., 2013).

5) Reste-t-il d'autres mécanismes à découvrir ?

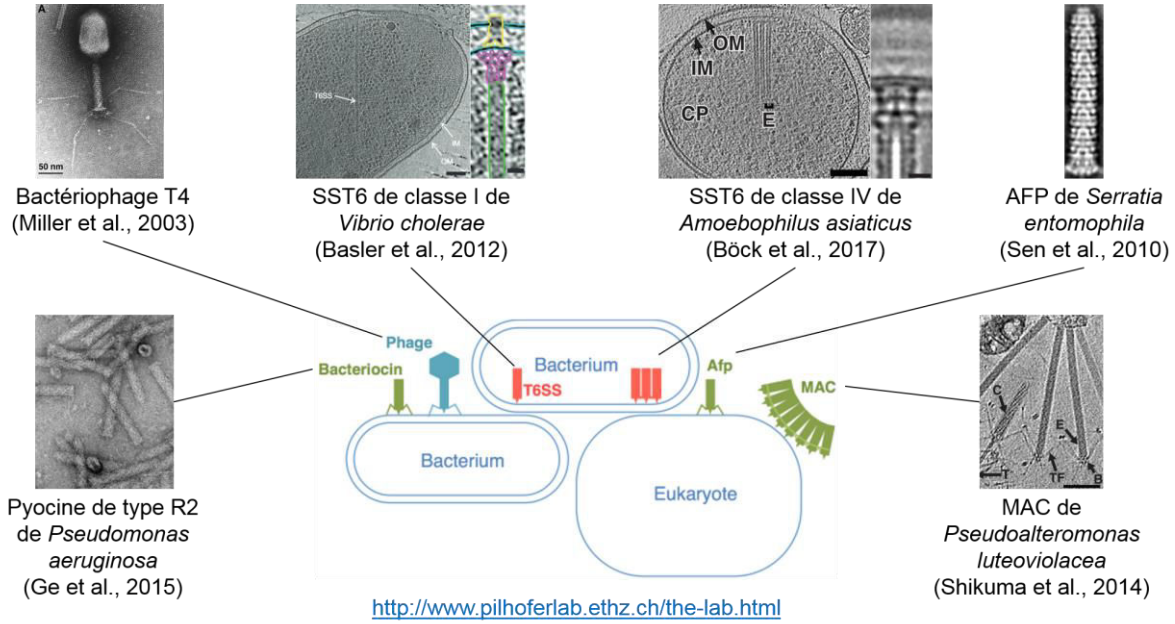


Figure 71: Les différents systèmes contractiles connus. Les images proviennent et sont adaptées du site Web du laboratoire Pilhoferlab (http://www.pilhoferlab.ethz.ch/the-lab.html) et des articles suivants (Basler et al., 2012; Böck et al., 2017; Ge et al., 2015; Miller et al., 2003; Sen et al., 2010; Shikuma et al., 2014). Les bactériocines et les bactériophages sont des structures contractiles unitaires ciblant les cellules procaryotes. Les AFP sont des structures unitaires ciblant les cellules eucaryotes alors que les MAC correspondent à un regroupement de multiples structures contractiles (environ 100) et sont impliquées dans la métamorphose d'organismes eucaryotes. Les SST6, quant à eux, ciblent à la fois les bactéries et cellules eucaryotes et peuvent être soit unitaires soit formés de paquets (de 2 à 34 machines individuelles). MAC : metamorphosis-associated contractile structure et AFP : Anti-feeding prophage.

Aujourd'hui, d'autres systèmes contractiles extracellulaires (eCIS : extracellular contractile injection system) (figure 71) ont été décrits : des bactériophages capables d'injecter des acides nucléiques, la pyocine de type R2 présentant une activité antibactérienne, les MAC (metamorphosis-associated contractile structure) de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* indispensables à la métamorphose de la larve d'*Hydroides elegans* (Shikuma et al., 2014, 2016), les AFP (Anti-feeding prophage) de

Serratia entomophila injectant une toxine insecticide (causant l'arrêt de l'alimentation) de *Costelytra zealandica* (Heymann et al., 2013), les PVC (*Photorhabdus* virulence cassettes) de *Photorhabdus luminescens* possédant une activité insecticide (Yang et al., 2006). Ces systèmes contractiles sont synthétisés et assemblés dans le cytoplasme bactérien puis sont libérés lors de la lyse cellulaire. Une fois dans le milieu extracellulaire, ces systèmes peuvent se contracter.

Contrairement à ces eCIS présents dans le milieu extracellulaire, le SST6 possède un complexe membranaire permettant l'ancrage de cette structure au niveau de l'enveloppe bactérienne (figure 72) et fait partie d'un groupe à part entière ne comportant que le SST6. Actuellement, il existe plusieurs sous-types de SST6, noté T6SS^{i} (*e.g V. cholerae*, *P. aeruginosa …*) (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006), T6SS^{ii} (*e.g Francisella* tularensis) (Bröms et al., 2010) et T6SS^{iii} (*e.g Flavobacterium johnsoniae*) (Russell et al., 2014). Mais récemment, une machinerie très similaire au SST6 (nommée T6SS^{iv}) a été décrite chez *Amoebophilus asiaticus* et présente des particularités (Böck et al., 2017). Ces structures contractiles sont codées par des gènes regroupés en clusters qui ressemblent à celui du cluster *Afp*. Par microscopie électronique, la présence des trois complexes typiques du SST6 a été révélée : une queue contractile, un complexe membranaire et un complexe basal, ayant tous les trois une symétrie axiale d'ordre 6. Pour rappel, le complexe membranaire d'*E. coli* a été décrit comme d'ordre 5 mais pourrait *via* TssA d'être d'ordre 6 (Zoued et al., 2017). Contrairement au SST6, ces structures sont regroupées en faisceau (alors que les SST6 ont toujours été observés comme « isolés » les uns des autres). De plus, la protéine Hcp est retrouvée dans le surnageant de culture, soulignant que ce SST6 est fonctionnel mais surtout que cette structure appartient plutôt au groupe SST6 qu'à celui des eCIS (bien que le cluster soit similaire au cluster codant pour les AFP) (Böck et al., 2017). De plus, la taille de la queue contractile est homogène (figure 73) et des gènes codant pour des protéines similaires à celles intervenant dans le contrôle de la taille de la queue contractile ont été découverts (T4 gp15 et T4 gp29). Ces résultats suggèrent que contrairement au SST6 classique, la longueur de la queue contractile du SST6 d'*A. asiaticus* est contrôlée par des protéines. Ce SST6 pourrait alors avoir évolué à partir des Afp ou MAC (Böck et al., 2017). Cette souche utiliserait ce SST6 afin de s'échapper des phagosomes, soit par des forces mécaniques soit par des effecteurs dédiés (Böck et al., 2017).

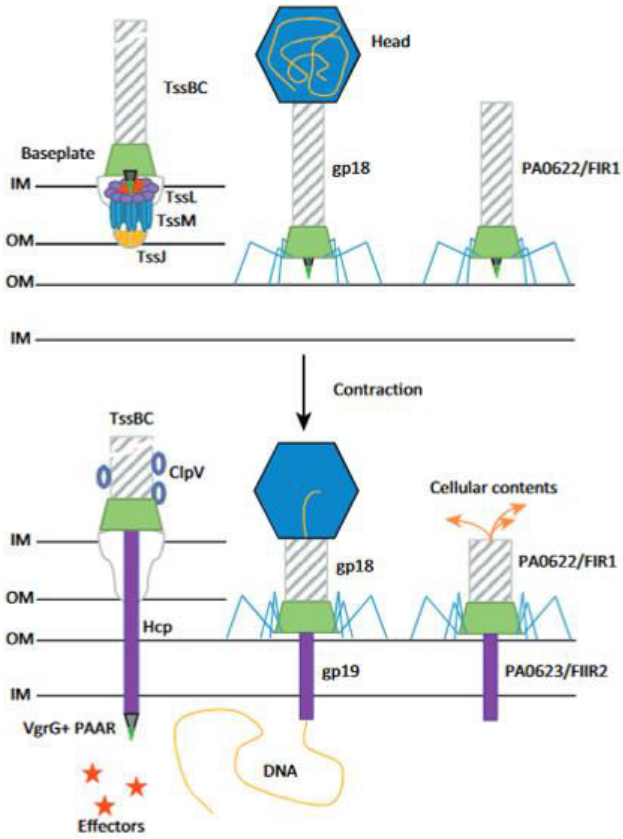


Figure 72: Mécanisme d'action des différentes structures contractiles. (Brackmann et al., 2017) Le SST6 permet d'injecter des effecteurs présents dans le cytoplasme de la bactérie productrice vers le cytoplasme, l'enveloppe bactérienne de la bactérie cible ou le milieu extracellulaire (non représenté). Le bactériophage T4 injecte son matériel génétique dans le cytoplasme de la bactérie cible. La pyocine de type R2 génère un trou dans l'enveloppe membranaire de la cellule cible. IM : membrane interne ; OM : membrane externe.

La découverte de ce genre de structure montre un lien dans l'évolution entre le T6SS[i] et les eCIS (figure 73), qui comprend notamment les bactériophages. Ceci est à rapprocher de ce qui a été décrit auparavant chez *Myxococcus xanthus.* A savoir, l'existence de structures similaires aux fibres caudales des bactériophages qui pourrait révéler un « état transitoire » dans l'évolution entre le bactériophage et le SST6 (ou inversement).

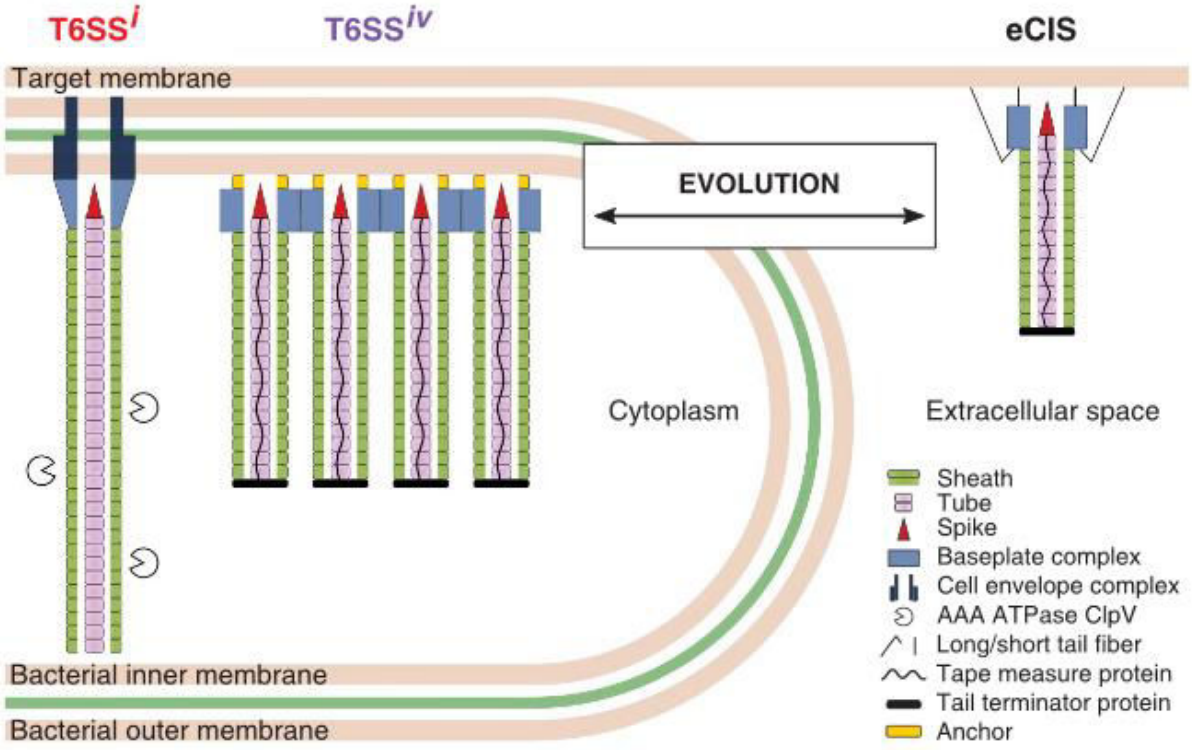


Figure 73: Représentation des structures des SST6 ainsi que les systèmes contractiles extracellulaires (eCIS). (Böck et al., 2017). Deux scénarios d'évolution sont possibles : le SST6 de classe iv (T6SS^{iv}) a évolué à partir d'un eCIS (par exemple l'AFP) ou alors le SST6 de classe iv est le système primaire de l'évolution à l'origine des SST6 de classe i à iii ainsi que des phages ou autre eCIS (bactériophage, bactériocine, AFP...). eCIS : systèmes contractiles extracellulaires.

Ces nouvelles structures ont été mises en évidence par microscopie électronique chez des souches particulières. D'autres structures de SST6 présentent-elles aussi des particularités chez d'autres espèces ? Sont-elles impliquées dans des rôles encore non décrits ?

Nous ne connaissons qu'environ 1% des bactéries présentes dans l'environnement car les conditions de culture de ces dernières restent encore non définies. Or, de nouvelles méthodes permettent de cultiver les bactéries « incultivables » (Lewis et al., 2010). De plus, les récentes technologies de microscopie électronique révèlent des structures jusqu'alors non décrites (Dobro et al., 2017). Ainsi, le SST6 ne semble pas avoir livré tous ses secrets !

OBJECTIFS DE LA THESE

La souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 environnementale sécrète un fort taux de protéines Hcp dans le surnageant de culture, qui constituent les protéines sécrétées majoritaires, et ce dès le début de la croissance. Ainsi nous avons envisagé que ce système de sécrétion jouerait un rôle crucial dans l'adaptation et le fitness de cette souche. Lors de la découverte du SST6 en 2006, il a été associé à la virulence envers les cellules eucaryotes chez *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* et *Escherichia coli* EAEC (Dudley et al., 2006; Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Puis le SST6 de *P. aeruginosa* s'est révélé comme étant également impliqué dans la compétition bactérienne (Hood et al., 2010). Actuellement, l'ensemble des études portant sur le SST6 tend à montrer que le SST6 possède d'autres fonctions, comme l'acquisition d'ions ou bien dans l'évolution par acquisition de nouveaux gènes (Thomas et al., 2017).

Le séquençage de la souche MFE01 a révélé au sein du génome la présence d'un seul cluster du SST6, d'une dizaine de gènes *vgrG* ainsi que de plusieurs gènes *hcp*. Victorien Decoin a démontré qu'une des protéines Hcp produites par la souche MFE01, la protéine Hcp2, était liée à l'activité antibactérienne de MFE01 envers de nombreuses bactéries à Gram négatif (Decoin et al., 2014). En lien avec cette activité antibactérienne et la protéine Hcp2, MFE01 permet la protection de différents modèles végétaux contre des bactéries phytopathogènes à Gram négatif. De plus, MFE01 ne montre aucune virulence envers différents modèles de cellules animales. En lien avec ces travaux, nous avons démontré, que si la protéine Hcp2 est impliquée dans l'activité antibactérienne, la protéine Hcp1, est nécessaire à l'immobilisation de la souche clinique *P. fluorescens* MFN1032 (Decoin et al., 2015). C'est dans ce contexte que la suite de mes travaux de thèse s'est dessinée. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes d'action des toxines associées à Hcp1 et le rôle de la protéine Hcp3. L'objectif de ma thèse était de caractériser les différents rôles des toxines associées à chaque protéine Hcp mais également les fonctions potentielles du SST6. Il semble en effet primordial de s'interroger sur le rôle de chaque protéine Hcp et d'étudier leurs rôles individuels dans le fitness de la souche MFE01. Quelle est ou quelles sont les cibles de la (ou des) toxine(s) associée(s) à Hcp1 ? Quelle est cette toxine ou que sont ces toxines ? La protéine Hcp3 est-elle impliquée dans l'activité antibactérienne ? Quelles sont les toxines associées à cette protéine ? Le SST6 de la souche MFE01 joue-t-il un rôle crucial dans la compétition interbactérienne au sein d'un biofilm ?

MATERIELS ET METHODES

I. Physiologie bactérienne

1) Composition des milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont référencés dans le tableau 1. Ces milieux sont stérilisés par chaleur humide sous pression (autoclavage, 121°C, environ 1 bar, 20 minutes). Les antibiotiques, molécules thermosensibles, sont ajoutés une fois le milieu refroidi.

Tableau 1: Composition des milieux de culture. Le pH des milieux de culture est ajustée à 7,4 avec du NaOH 1M. Le LBg sucrose 10% est utilisée lors de la recombinaison homologue (mutagénèse).

	Quantité				
Composants	LB liquide	LB 0.3% agar	LB 0.6% agar	LBg	Sucrose 10%
Tryptone	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Extrait de levure	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Sucrose	---	---	---	---	100 g
Eau Milli-Q	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
Agar	---	1,5 g	3 g	7,5 g	7,5 g

2) Conditions de culture des souches bactériennes

Les différents mutants de la souche MFE01 ainsi que les autres souches et plasmides utilisés sont référencés dans les tableaux 2 et 3, respectivement. Toutes les cultures bactériennes sont cultivées dans du milieu Luria Bertani dont la composition est décrite dans le tableau 1. Les cultures liquides sont incubées sous agitation de 180 rpm. Les souches de *P. fluorescens* MFE01, MFN1032, MFP05 sont cultivées à 28°C en étuve statique ou agitation. Les souches d'*E. coli* W3110, S17.1, Top10 et *P. aeruginosa* H103 ou PA14 sont incubées à 37°C et *E. coli* BTH101 à 30°C.

3) Conservation des souches

Les souches sont isolées sur gélose, supplémentée en antibiotique si besoin, afin de vérifier l'absence de contamination. La biomasse bactérienne est resuspendue dans un tube cryobille (Fisher Scientific). Les souches sont conservées à -80°C.

Tableau 2: Liste des souches utilisées.

Souches	Caractéristiques	Références
P. fluorescens		
MFE01	Isolée de l'air, Rif^R	(Decoin et al., 2014)
MFE01+*fliA*	MFE01 avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *fliA*, Gm^R	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*hcp1*+EV	Interruption du gène *hcp1* avec la cassette Tétracycline, Tc^R	(Decoin et al., 2015)
MFE01Δ*hcp1*+*hcp1*	MFE01Δ*hcp1* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *hcp1*, Tc^R et Gm^R	(Decoin et al., 2015)
MFE01Δ*hcp1*+*fliA*	MFE01Δ*hcp1* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *fliA*, Tc^R et Gm^R	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*hcp2*	Interruption du gène *hcp2* avec un codon stop précoce	(Decoin et al., 2014)
MFE01Δ*hcp3*	Mutation du gène *hcp3* par délétion centrale (291 pb)	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*hcp3* + EV	MFE01Δ*hcp3* avec le plasmide pPSV35 vide, Gm^R	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*hcp3*+*hcp3*	MFE01Δ*hcp3* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *hcp3*, Gm^R	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*tssC*	Mutation du gène *tssC* par délétion centrale (414 pb)	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*tssC*+EV	MFE01Δ*tssC* avec le plasmide pPSV35 vide, Gm^R	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*tssC*+*tssC*	MFE01Δ*tssC* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *tssC*, Gm^R	(Gallique et al., 2017a)
MFE01Δ*tssC*+*fliA*	MFE01Δ*tssC* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *fliA*, Gm^R	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*fliA*	Mutation du gène *fliA* par délétion centrale (411 pb)	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*fliA*+EV	MFE01Δ*fliA* avec le plasmide pPSV35 vide, Gm^R	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*fliA*+*fliA*	MFE01Δ*fliA* avec le plasmide pPSV35 contenant le gène sauvage *fliA*, Gm^R	(Gallique et al., en préparation)
MFE01Δ*tec1*	Mutation du gène *tec1* par délétion centrale (258 pb)	Non publié
MFE01Δ*vgrG1*	Mutation du gène *vgrG1* par délétion centrale (1728 pb)	Non publié
MFE01Δ*lysM*	Mutation du gène *lysM* par délétion centrale (1833 pb)	Non publié
MFE01Δ*tpr*	Mutation du gène *tpr* par délétion centrale (510 pb)	Non publié
MFN1032	Souche Clinique, infection pulmonaire	(Chapalain et al., 2008)
MFP05	Souche isolée de la peau	(Dagorn et al., 2013)
P. aeruginosa		
PA14	Isolat clinique	(Tan et al., 1999)
H103	Souche dérivée de PAO1	(Hancock et al., 1979)
E. coli		
S17.1	RP4-2-Tc::Mu, *aph*::Tn7, recA, SmR, souche donneuse pour conjugation	(Simon et al., 1983)
Top10®	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*araleu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G	Collection du LMSM
BTH101	F-, *cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str r), hsdR2, mcrA1, mcrB1.*	(Karimova et al., 1998)
W3110	F-, lambda- IN(*rrnD-rrnE*)1 *rph*-1	Collection du LISM

Tableau 3: Liste des plasmides.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pPSV35	*P. aeruginosa oriV*, *lacIq mob*+, P*lac*UV5, pUC18 MCS, vecteur d'expression, Gm^R	(Rietsch et al., 2005)
pPSV35-*hcp1*	pPSV35 portant le gène *hcp1* (516 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*SmaI*)	(Decoin et al., 2015)
pPSV35-*hcp3*	pPSV35 portant le gène *hcp3* (507 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	(Gallique et al., 2017b)
pPSV35-*tssC*	pPSV35 portant le gène *tssC* (1476 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	(Gallique et al., en préparation)
pPSV35-*fliA*	pPSV35 portant le gène *fliA* (741 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	(Gallique et al., en préparation)
pPSV35-*flaA-flaG*	pPSV35 portant les gènes *flaA* et *flaG* (861 et 357 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*XmaI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*fliD*	pPSV35 portant le gène *fliD* (1461 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*fliS*	pPSV35 portant le gène *fliS* (399 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*fliT*	pPSV35 portant le gène *fliT* (297 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*flgN*	pPSV35 portant le gène *flgN* (468 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*flgZ*	pPSV35 portant le gène *flgZ* (747 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XbaI*)	Non publié
pPSV35-*lysM*	pPSV35 portant le gène *lysM* (3009 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*XmaI*)	Non publié
pPSV35-*tpr*	pPSV35 portant le gène *tpr* (1047 pb) de *P. fluorescens* MFE01 (*EcoRI*/*SacI*)	Non publié
pAKE604	Vecteur plasmide conjugatif, Ap^R, Km^R, oriT, *lacZ*, *sacB*	(El-Sayed et al., 2001)
pSMC2.1-*gfp*	Vecteur réplicatif chez les bactéries à Gram-négatif, contenant le gène de la *gfp*, Km^R	(Crépin et al., 2012)
pT18-FLAG	Bacterial Two Hybrid vector, ColE1 origin, P*lac*, fragment T25 de *B. pertussis* CyaA, AmpR	(Battesti and Bouveret, 2012)
T18-Pal	Plasmide pT18-FLAG contenant le gène *pal* en aval de la séquence codante T18	(Battesti and Bouveret, 2012)
Tec1-T18	Plasmide pT18-FLAG contenant le gène *tec1* en amont de la séquence codante T18	Non publié
T18-Tec1	Plasmide pT18-FLAG contenant le gène *tec1* en aval de la séquence codante T18	Non publié
VgrG1C-T18	Plasmide pT18-FLAG contenant la région 3' du gène *vgrG1* en amont de la séquence codante T18	Non publié
T18-VgrG1C	Plasmide pT18-FLAG contenant la région 3' du gène *vgrG1* en aval de la séquence codante T18	Non publié
pT25-FLAG	Vecteur du double hybride bactérien, p15A origin, P*lac*, fragment T25 de *B. pertussis* CyaA, Kan^R	(Battesti and Bouveret, 2012)
TolB-T25	Plasmide pT25-FLAG contenant le gène *tolB* en amont de la séquence codante T25	(Battesti and Bouveret, 2012)
VgrG1N-T25	Plasmide pT25-FLAG contenant la région 5' du gène *vgrG1* en amont de la séquence codante T25	Non publié
VgrG1C-T25	Plasmide pT25-FLAG contenant la région 3' du gène *vgrG1* en amont de la séquence codante T25	Non publié
T25-VgrG1C	Plasmide pT25-FLAG contenant la région 3' du gène *vgrG1* en aval de la séquence codante T25	Non publié
VgrG15-T25	Plasmide pT25-FLAG contenant le gène *vgrG15* en amont de la séquence codante T25	Non publié
VgrGc1-T25	Plasmide pT25-FLAG contenant le gène *vgrGc1* en amont de la séquence codante T25	Non publié

4) Test de mobilité de type « swimming »

La mobilité de type « swimming » résulte de l'action des flagelles bactériens permettant le déplacement de la cellule sur une gélose semi-solide à 0,3% d'agar (tableau 1). Les souches sont incubées sur la nuit en milieu liquide puis sont centrifugées à 7 500 x g pendant 5 minutes. La biomasse bactérienne est prélevée à l'aide d'un cure-dent et déposée sur une gélose LB 0,3% d'agar, supplémentée ou non avec de l'IPTG 1 mM final et préalablement séchée stérilement, puis incubée à 28°C sur la nuit.

5) Inhibition de mobilité de type « swarming » ou « swarm killing »

La mobilité de type « swarming » est testée sur gélose 0,6% d'agar (tableau 1), nécessitant en plus de l'action du flagelle, la production de biosurfactant (Caiazza et al., 2005) ou de l'action du pili de type IV (Köhler et al., 2000). Les cultures bactériennes sont incubées sur la nuit sous agitation (180 rpm). La densité optique (DO_{580}) est ajustée à 0,5 et les souches sont mélangées selon un ratio 5 : 1 (500 µl de la souche MFE01 ou mutant contre 100 µl de la souche compétitrice). Un volume de 5 µl de ce mélange est déposé au centre de la gélose 0,6% agar préalablement séchée stérilement et incubée pendant 18 h à 28°C.

6) Activité antibactérienne en condition solide

L'activité antibactérienne est mesurée selon le protocole décrit par Murdoch et ses collègues avec quelques modifications (Murdoch et al., 2011). Les bactéries cibles ont été transformées avec le plasmide conférant la résistance à la kanamycine (pSMC2.1) afin de dénombrer uniquement la population de la bactérie cible et donc déterminer l'activité antibactérienne de MFE01 ou de ses mutants (figure 74). Les souches sont cultivées sur la nuit sur milieu LB gélosé puis la biomasse est reprise dans du milieu LB liquide. La densité optique (DO_{580}) est ajustée à 0,5 et les souches sont mélangées selon un ratio 5 : 1 (500 µl de la souche MFE01 ou mutant contre 100 µl de la souche

compétitrice). Le témoin correspond à 100 µl de la suspension de la cellule cible dans 500 µl de LB. Un volume de 25 µl de ce mélange est déposé sur filtre avec pore de 0,2 µm placé à la surface d'une gélose puis incubé pendant 4 h à 28°C. Les filtres sont ensuite resuspendus dans 1 ml d'eau physiologique stérile et une dilution en série est effectuée. Un volume de 10 µl de chaque dilution est déposé sur une gélose LB supplémenté en kanamycine incubée sur la nuit à 28°C.

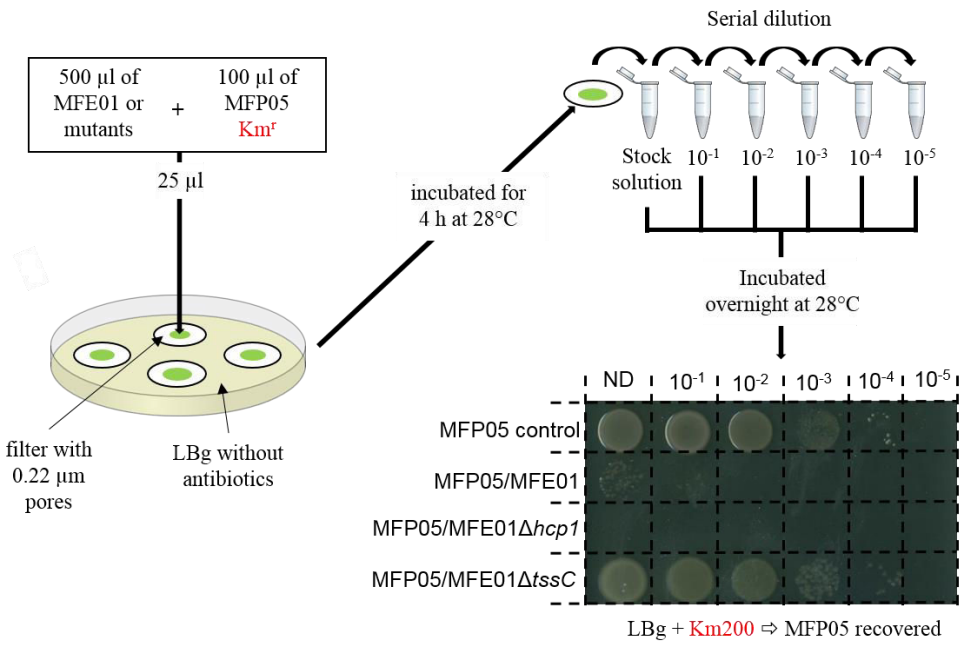


Figure 74: Représentation du protocole du test d'activité antibactérienne.

7) Test d'activité antibactérienne *in planta* sur l'endive

La souche MFE01 sauvage (ou un de ses mutants) et *P. aeruginosa* H103 sont cultivées avec agitation (180 rpm) sur la nuit à 28°C et 37°C respectivement. Un volume de 1 ml est centrifugé à 7 500 x g et les culots sont repris dans 1 ml de $MgSO_4$ à 10 mM puis la DO_{580} est ajustée à 0,1 dans du $MgSO_4$ à 10 mM. Les souches sont mélangées en respectant le ratio 5 : 1 (MFE01 : H103) puis 10 µl de suspension bactérienne est injectée dans la nervure centrale de la feuille d'endive (*Chicorium intybus var. foliosum*) préalablement rincée à l'eau distillée. Les endives sont ensuite incubées à 28°C pendant 24 h en présence d'une feuille de papier Whatman® imbibée d'eau distillée afin d'éviter l'asséchement de l'endive. La présence ou non de macération permet de déterminer l'activité antibactérienne de la souche de MFE01 (ou mutant) sur H103 (macération : pas ou peu d'activité antibactérienne).

8) Test d'activité antibactérienne *in planta* sur tubercule de pommes de terre

La surface des pommes de terre, *Solanum tuberosum* cv. Alllians, est désinfectée dans un bain d'eau de javel 1,2% pendant 10 minutes puis lavée deux fois avec de l'eau distillée. La souche MFE01 ou un de ses mutants, ainsi que *Pectobacterium atrosepticum* 6276, phytopathogène responsable de la macération du tubercule de pomme de terre, sont cultivées jusqu'en phase stationnaire. Le culot bactérien (après une centrifugation de 7 500 x g, 5 minutes) est repris dans de l'eau physiologique et la DO_{580} est ajustée à 1. Les deux souches sont mélangées selon le ratio 5 : 1 (MFE01 : *P. atrosepticum*). Un volume de 10 µl des suspensions bactériennes est ensuite injecté directement dans la blessure superficielle réalisée auparavant à l'aide d'un cône de propipette. Les tubercules sont incubés dans une étuve à 25°C avec une humidité relative de 65% ± 2% pendant 7 jours (Minitron, Infors HT). Les tubercules sont ensuite découpées à l'endroit où la suspension bactérienne a été injectée et les diamètres de macération sont mesurés.

9) Conjugaison bactérienne et mutagénèse

Le plasmide pAKE604 (contenant la version du gène d'intérêt avec délétion centrale) est transféré par conjugaison biparentale entre la souche *E. coli* S.17 et *P. fluorescens* MFE01. Les bactéries sont centrifugées à 7 500 x g pendant 5 minutes et le culot est repris dans 100 µl d'eau physiologique stérile. Un volume de 50 µl de suspension de la souche MFE01 en phase stationnaire est ajouté à la suspension de 50 µl de culture *E. coli* S.17 (ayant la construction plasmidique) en phase exponentionnelle. Le mélange bactérien (un volume de 35 µl) est déposé sur gélose LB sans antibiotique à 37°C (afin d'éviter l'activité antibactérienne de la souche MFE01 sur *E. coli*). Les souches MFE01 ayant réalisé la première recombinaison homologue sont sélectionnées sur une gélose LB supplémentée en rifampicine (50 µg/ml) et en kanamycine (50 µg/ml). Seule la souche MFE01 est naturellement résistante à la rifampicine et la kanamycine permet de vérifier l'intégration du plasmide au chromosome. Puis les souches ayant réalisé la deuxième recombinaison homologue sont sélectionnées sur une gélose LB supplémentée en sucrose 10% final. En effet, le

plasmide intégré au sein du chromosome contient le gène *sacB*, conférant la sensibilité au sucrose. La présence de sucrose favorise la sélection des clones ayant éliminé le plasmide par une recombinaison homologue. Les clones positifs contenant la version du gène portant une délétion centrale sont vérifiés par PCR (avec l'amorce sens 1F et l'amorce antisens 4R, tableau 4), selon la taille de l'amplicon.

Tableau 4: Liste des amorces utilisées pour la mutagénèse. Les lettres soulignées correspondent aux sites de restriction (*EcoRI* : GAATTC ; *XhoI* : CTCGAG et *XbaI* : TCTAGA) et les lettres figurant en rouge correspondent aux extrémités flottantes utilisées lors de la PCR chevauchante.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
Muta1-*tssC*-F	CTGAGACTCCAGTAGCCAAG
Muta2-*tssC*-QC-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGATAAGCTTTCCAGACCGAAGAA
Muta3-*tssC*-QC-F	ATCACCTGGACCCACGAAGTATGAAGGCTTCATCTCCCTGAC
Muta4-*tssC*-R	ATGTCATTGAGATCGGGCAA
Muta1-*hcp3*-F	TCGACCACAACCATACAACA
Muta2-*hcp3*-QC-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGATAAGTCCACTTCAGCTACCG
Muta3-*hcp3*-QC-F	ATCACCTGGACCCACGAAGTATCACCATGATCTTGTCTTCGC
Muta4-*hcp3*-R	TGGATCAGCAAGTCCAGATC
Muta1-*fliA*-F	ACACTGGCCGACGTTATC
Muta2-*fliA-EcoRI*-R	TAATAAGAATTCGTAAAGATTCATGCCACTGG
Muta3-*fliA-EcoRI*-F	TAATAAGAATTCCTGTTCAGTTTCGACGAC
Muta4-*fliA*-R	CTTCAGCAGTCACCATCAA
Muta1-*tec1*-F	CATGAAAGTGGTGATGGAAG
Muta2-*tec1-Xho1*-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGAACGATGTGAGCAGAATACC
Muta3-*tec1-Xho1*-F	TCACCTGGACCCACGAAGTATAACTAAAGATCAACACGCTG
Muta4-*tec1-Xba1*-R	GAAGTAGTCCATCAACCCTG
Muta1-*vgrG1*-F	AAAACAAGGCCTGATCACT
Muta2-*vgrG1-Xho1*-R	TAATAACTCGAGCTCCACCTCAAACACAAAAG
Muta3-*vgrG1-Xho1*-F	TAATAACTCGAGGTGATCAACATGAACTCCG
Muta4-*vgrG1-Xba1*-R	TAATAATCTAGAGATTTCATCGAACGCTATCA
Muta1-*lysM*-F	AACTAAAGATCAACACGCTG
Muta2-*lysM*-QC-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGATGCTTTCGACTCCACATAACTG
Muta3-*lysM*-QC-F	ATCACCTGGACCCACGAAGTATACTGCTGTTATCGATCAAGG
Muta4-*lysM*-R	GCCATAAATGAATCGAGCTT
Muta1-*tpr*-F	GACAATAAAAGCGTCAAGGA
Muta2-*tpr*-QC-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGATGGCTGCTTCATACCATTTTCT
Muta3-*tpr*-QC-F	CATCACCTGGACCCACGAAGTATACTTGATTGAGGCTTATGGA
Muta4-*tpr*-R	GTTGGCTGAAATGCGATT

10) Formation de biofilm en condition statique

Les bactéries sont incubées sur la nuit à 28°C avec agitation (180 rpm). Après centrifugation (7 500 x g, 5 minutes), les bactéries sont lavées deux fois avec 4 ml d'eau physiologique stérile. La DO_{580} est ensuite ajustée à 1 dans de l'eau physiologique. Un volume de 400 µl de suspension bactérienne est déposé dans les puits centraux à fond de verre (plaque 24 puits, Greiner Bio-One). Les puits latéraux sont remplis avec 600 µl d'eau physiologique afin d'éviter l'asséchement des cultures

bactériennes dans l'étuve. Après 2 h d'incubation à 28°C permettant l'adhésion des cellules sur le support en verre, le surnageant est retiré délicatement et un volume de 600 µl de milieu liquide LB (supplémenté ou non en IPTG 1 mM ou en antibiotique) est ajouté doucement afin de ne pas décrocher les bactéries. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 h à 28°C avec un changement de milieu LB au bout de 24 h.

11) Formation de biofilm en condition dynamique « flow cell »

Cette technique consiste en un apport continu de nutriments, évitant ainsi de décrocher une partie du biofilm lors du pipetage. Le montage du système ainsi que le protocole ci-dessous a été décrit par les équipes de Bazire et de Sternberg avec quelques modifications (Bazire et al., 2010; Sternberg et al., 1999). Les différents composants (piégeur de bulles, chambre…) ont été conçus par Biocentrum DTU (Danemark, http://comstat.dk/reswiki/doku.php?id=biofilm_setup). Le système « flow cell » est stérilisé par un flux de javel 1,2% pendant 4h. Puis le système est rincé avec de l'eau physiologique stérile pendant une nuit. Une mise en milieu avec du LB est effectuée avant l'inoculation de la chambre (dimension : 1 x 4 x 40 mm, en polycarbonate recouvert par une fine lamelle de microscopie en verre permettant l'adhésion bactérienne, VWR international). Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB liquide à 28°C sur la nuit. Les cultures subissent deux lavages successifs à l'eau physiologique stérile (centrifugation de 6 000 x g, 5 minutes), puis le culot est repris dans 2 ml d'eau physiologique. La DO_{580} est ajustée à 0,1 pour un volume final de 1 ml. Dans le cas des cultures mixtes, le ratio 5 : 1 est respecté (1 ml de la souche MFE01 ou mutants ajouté à 200 µl de la bactérie cible expimant le gène *gfp*). La suspension bactérienne est injectée directement dans la chambre de la « flow cell » à l'aide d'une seringue. Une étape d'adhésion de 2 heures est respectée en interrompant le flux. Après une inoculation de 48h à 28°C avec un faible flux de milieux LB (supplémenté ou non en antibiotique ou en IPTG 1 mM), le flux est stoppé. Dans le cas des souches transformées avec la Green Fluorescent Protein, les bactéries peuvent être directement observées par microscopie confocale. Une alternative consiste à marquer la biomasse au Syto®9 (Life technologies™, 5 µg/ml). Le flux est rétabli 15 minutes après l'injection du fluorophore afin de rincer les chambres et d'éliminer les bactéries planctoniques.

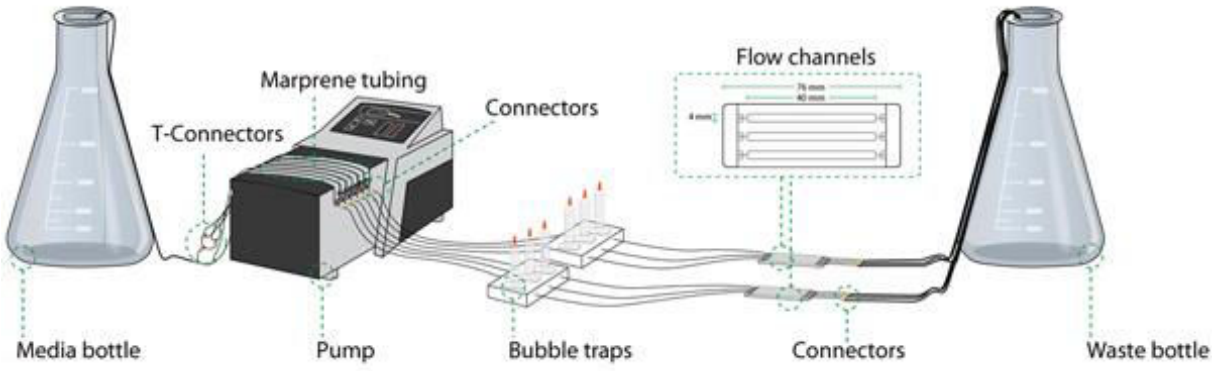


Figure 75: Système de chambre en flux « flow cell ». (Weiss Nielsen et al., 2011). La pompe péristaltique permet d'alimenter en continu avec un débit constant les suspensions bactériennes adhérées sur lame de verre dans les canaux (« flow channels »). Les pièges à bulles (« bubble traps ») permettent d'éviter la formation de bulles en amont des suspensions bactériennes. Une « poubelle » en aval permet de récupérer les déchets bactériens.

12) Observation de biofilm par microscopie confocale

L'observation est effectuée avec le microscope confocal à balayage laser LSM 710 (Zeiss, Allemagne) avec l'objectif à immersion à huile 63x. Les biofilms sont observés par coupes de 1µm en enregistrant la fluorescence du fluorophore Syto®9 (pour les cultures pures) ou de la protéine GFP dans le cas des cultures mixtes (la bactérie compétitrice est transformée avec la GFP dont le gène est présent dans le plasmide pSMC2.1). La longueur d'onde d'excitation (λ) est de 488 nm et celle d'émission de 510 nm. Les différentes coupes sont superposées pour obtenir des images en 3D. L'intensité de la fluorescence est analysée avec le logiciel COMSTAT (Heydorn et al., 2000, 2002). Le paramètre calculé est le biovolume, c'est à dire le volume de bactéries (en µm3) par µm2. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

13) Test statistique

Les données sont analysées avec le test non paramétrique Mann-Whitney avec le logiciel Prism6.

II. Culture de cellules eucaryotes et test de cytotoxicité

1) Culture des cellules HaCaT

La lignée cellulaire de kératinocyte humain HaCaT est stockée à -80°C. Une fois décongelées, les cellules sont centrifugées (2 000 x g, 3 minutes) puis resuspendues subtilement avec 1 ml de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma-Aldrich, préalablement incubé à 37°C) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich) 10% final et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine pour éviter toute contamination bactérienne). Les cellules sont incubées dans des flasques à 37°C et 5% de CO_2. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours. Lorsque les cellules atteignent environ 90% de confluence (monocouche de cellules adhérées sur support avec quelques interstices entre les cellules), le tapis cellulaire est rincé deux fois délicatement avec 4 ml de tampon PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, préalablement incubé à 37°C). Une fois le surnageant retiré, un volume de 2 ml de solution trypsique (Sigma-Aldrich) est ajouté et incubé à 37°C avec 5% CO_2 pendant 15 minutes. Les cellules sont décollées à l'aide de raclette cellulaire (Fisher Scientific) et individualisées, puis de légers pipetages (cône de propipette P1000). Une fois homogène, l'action de la trypsine est stoppée par ajout de 3 ml de SVF. Les cellules sont ensuite culotées (2 000 x g, 3 minutes), resuspendues dans du DMEM supplémenté en SVF 10% final et un volume de 1 ml est déposé dans les puits centraux d'une plaque 24 puits (les puits latéraux sont remplis avec 1 ml de PBS pour éviter l'asséchement des cellules). La culture est incubée à 37°C, 5% CO_2 avec renouvellement en milieu tous les deux jours.

2) Test de cytotoxicité de la souche MFE01 sur les cellules HaCaT

Tout d'abord, il faut déterminer le nombre de cellules avec la méthode de Neubauer (http://www.celeromics.com/fr/resources/docs/Articles/Comptage-de-Cellules-avec-Neubauer.pdf) qui permet de déterminer la concentration cellulaire selon le nombre de cellules comptées sur une surface. En moyenne, il y a environ 5.10^6 cellules par puits. Les tests de cytotoxicité ont été effectués avec une multiplicité d'infection cellulaire de

20 (MOI : multiplicity of infection), correspondant à 20 bactéries pour une seule cellule HaCaT (nombre de bactérie : 20 x 5.10^6 soit 1.10^8 bactéries par puits). La DO_{580} bactérienne en phase exponentielle (environ DO_{580} = 1) est ajustée à 0,1 (1 ml de suspension bactérienne à DO_{580} = 0,1 représente 1.10^8 bactéries) avec du milieu DMEM. Le milieu des cultures de cellules HaCaT est retiré et 1 ml de suspension de MFE01 à DO_{580} = 0,1 est ajoutée sur le tapis bactérien. Le témoin négatif de lyse correspond à l'ajout de 1 ml de DMEM seul sur les cellules HaCaT alors que l'ajout de 1 ml de Triton™ X-100 0,9% final dans du DMEM correspondant au témoin positif.

3) Dosage de la lactate déshydrogénase des cellules HaCaT infectées

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique. Sa présence dans le milieu extracellulaire indique une perturbation de la membrane cellulaire, potentiellement causée par une lyse suite à une infection bactérienne. Le dosage de la LDH est réalisé avec le test enzymatique CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega).

Les surnageants des cultures infectées ainsi que ceux correspondant aux témoins positifs et négatifs sont prélevés et centrifugés (afin d'éliminer d'éventuelles cellules). Un volume de 100 µl de surnageant est prélevé et ajouté à 100 µl de solution Start puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Puis la réaction est stoppée avec 100 µl de solution Stop et 700 µl d'eau distillée est ajoutée. La densité optique est déterminée à DO_{490} (le « blanc » est réalisé avec une solution de 100 µl de DMEM + 100 µl de solution Sart + 100 µl de solution Stop + 700 µl d'eau distillée). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé avec la relation :

$$\frac{\text{DO490 de l'échantillon testé}}{\text{DO490 témoin positif de lyse Triton™ X100 0,9\%}} = \text{cytotoxicité (en \%).}$$

Le témoin négatif permet de soustraire le pourcentage de lyse des cellules non infectées.

III. Techniques d'interaction protéine-protéine

1) Double hybride bactérien

Tableau 5: Listes des amorces utilisées pour le BACTH. Les lettres en bleu correspondent aux extrémités flanquantes s'hybridant sur le plasmide et le codon stop est représenté en rouge.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
T25T18C-Tec1-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGTCTGAATGGCTAAGTCATTTCCTGAAAAAAACC
T18C-Tec1-R	CCTCGCTGGCGGCTAAGCTTGGCGTAATGACTTCCATTCGTTGTACTTTCTCGAATGC
T18N-Tec1-F	CGCCACTGCAGGGATTATAAAGATGACGATGACAAGTCTGAATGGCTAAGTCATTTCCTGAAAAAAACC
T25T18N-Tec1-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTAGACTTCCATTCGTTGTACTTTCTCGAATGC
T25T18C-VgrG1N-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGTTGCGGCCGTCGACGAGCG
T25C-VgrG1N-R	GTTTGCGTAACCAGCCTGATGCGATTGCTGCCAGCACTTCCATGCCGATGC
T25N-5-PfI-VgrG1N-F	GGCGGGCTGCAGATTATAAAGATGACGATGACAAGTTGCGGCCGTCGACGAGCG
T25T18N-VgrG1N-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTACCAGCACTTCCATGCCGATGC
T25T18C-VgrG1C-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGGAAGTGCTGGTGACCTTCCTTGAAG
T25C-VgrG1C-R	GTTTGCGTAACCAGCCTGATGCGATTGCTGGCCATTCAGACATGGGCAAACC
T25N-VgrG1C-F	GGCGGGCTGCAGATTATAAAGATGACGATGACAAGGAAGTGCTGGTGACCTTCCTTGAAG
T25T18N-VgrG1C-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTAGCCATTCAGACATGGGCAAACC
T18N-VgrG1C-F	CGCCACTGCAGGGATTATAAAGATGACGATGACAAGGAAGTGCTGGTGACCTTCCTTG
T25T18N-VgrG1C-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTAGCCATTCAGACATGGGCAAACC
T25T18C-VgrG1C-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGGAAGTGCTGGTGACCTTCCTTGAAG
T18C-VgrG1C-R	CCTCGCTGGCGGCTAAGCTTGGCGTAATGCCATTCAGACATGGGCAAACC
T25T18C-VgrG15-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGCTCAATGACAAGGAAAGTCCCTTCACCC
T25C-VgrG15-R	GTTTGCGTAACCAGCCTGATGCGATTGCTGATGCTCGGCGCGGTGGCTC
T25N-VgrG15-F	GGCGGGCTGCAGATTATAAAGATGACGATGACAAGCTCAATGACAAGGAAAGTCCCTTCACCC
T25T18N-VgrG15-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTAATGCTCGGCGCGGTGGCTC
T25T18C-VgrGc1-F	CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGTTCGGCAAAGGCCACTGCGCT
T25C-VgrGc1-R	GTTTGCGTAACCAGCCTGATGCGATTGCTGTGCGACTTCTCCCAGCTCACAC
T25N-VgrGc1-F	GGCGGGCTGCAGATTATAAAGATGACGATGACAAGTTCGGCAAAGGCCACTGCGCT
T25T18N-VgrGc1-R	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAGTTATGCGACTTCTCCCAGCTCACAC

Les amorces utilisées pour les constructions (voir partie « megaprimers ») sont listées dans le tableau 5. Le protocole de « Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system » découle du protocole décrit par Karimova avec quelques modifications (Karimova et al., 1998). Les deux gènes codant pour les domaines catalytiques T18 et T25 de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, sont fusionnés avec les gènes d'intérêt sur les plasmides pT18-FLAG et pT25-FLAG respectivement (Battesti and Bouveret, 2012). Le témoin positif utilisé est l'interaction entre la lipoprotéine Pal et la protéine périplasmique TolB. Les souches d'*E. coli* BTH101 sont co-transformées par choc thermique (voir partie choc thermique) et sélectionnées sur gélose supplémenté en kanamycine (50 µg/ml) et en ampicilline (100 µg/ml). Après co-transformation, les souches BTH101 contenant les deux constructions plasmidiques sont incubées à 30°C pendant 48 h dans 600 µl de milieu LB supplémenté en ampicilline (25 µg/ml), en kanamycine (10 µg/ml), en IPTG (0,5 mM) et en acides aminés (leucine 0,3 mM, isoleucine 0,15 mM et valine 0,4 mM). Un volume de 10 µl de chaque suspension bactérienne est ensuite déposé sur gélose LB supplémentée en ampicilline (25 µg/ml), en kanamycine (10 µg/ml), en IPTG (0,5 mM) et avec le substrat chromogène X-gal (40 µg/ml). La gélose est ensuite incubée à 30°C pendant environ 6-7 h.

2) Co-immunoprécipitation

Le protocole utilisé est celui décrit par Zoued (Zoued et al., 2013) avec quelques modifications. Les cultures d'*E. coli* W3110 transformées avec les plasmides pASK-IBA37 et pBAD33, produisant les protéines fusionnées avec l'étiquette FLAG (DYKDDDDK) ou VSV-G (YTDIEMNRLGK) respectivement, sont incubées à 37°C avec agitation (180 rpm) jusqu'à DO_{580} = 0,5. Puis les cultures sont induites avec de l'anhydrotétracycline (0,1 µg/ml) ou avec de L-arabinose (0,2%) pendant 1 h. Les cellules sont ensuite lysées par sonication à 4°C (6 cycles de 10 secondes avec 10 secondes de repos entre chaque cycle). Le lysat est centrifugé à 13 000 x g pendant 10 minutes à 4°C et le surngeant est récupéré. Les surnageants des deux cultures indépendantes sont mélangés par faible rotation (environ 20 rpm) à température ambiante pendant 30 minutes puis agités par faible rotation pendant 2 h avec 25 µl de billes anti-FLAG M2 affinity (Sigma-Aldrich). Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 et centrifugées à 500 x g.

IV. Techniques analytiques des échantillons protéiques

1) Analyse des protéines du surnageant de culture

Les bactéries sont cultivées (25 ml) sur la nuit à 28°C avec agitation (180 rpm) avec induction à l'IPTG 1 mM si besoin. Les cellules sont ensuite centrifugées à 7 500 x g pendant 5 minutes puis le surnageant est filtré sur membrane 0,2 µm (Millipore) afin d'éliminer les bactéries résiduelles. Les protéines présentes dans le surnageant sont ensuite précipitées sur la nuit dans de la glace avec de l'acide trichloroacétique (TCA) 10% final. Après la précipitation sur la nuit, le surnageant est centrifugé à 13 000 x g à 4°C pendant 30 minutes afin de culotter les protéines. Le culot est lavé deux fois avec 5 ml d'acétone froid (stocké au -20°C) sans pipetage et centrifugé à 13 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est ensuite séché sous hotte chimique jusqu'à évaporation de l'acétone. Le culot est repris dans 100 µl de tampon de réhydratation (tableau 6).

Tableau 6: composition du tampon de réhydratation. CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (Sigma-Aldrich). Tampon IPG 3-10 (Sigma-Aldrich).

Composants	Quantité
Urée	2,1 g
Thiourée	0,76 g
CHAPS	0,2 g
Tampon IPG 3-10	25 µl
Eau milli-Q	Qsp 5 ml

2) Séparation des protéines sur gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées par électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Le pourcentage d'acrylamide final des gels SDS-PAGE utilisé est soit de 10, 12 ou 15% pour le gel de séparation et de 7% d'acrylamide final pour le gel de concentration. La composition de chaque gel utilisé figure dans le tableau 7. Les échantillons sont repris dans du tampon Laemmli 2X (6,25 ml de Tris-HCl pH 6,8, 0,5 g de SDS, 2,5 ml de glycérol, 50 µl de bleu de Bromophénol 10% et 1,25 ml de β-mercaptoéthanol, qsp 10ml) puis chauffés

pendant 5 minutes à 100°C et chargés sur gel SDS-PAGE. La migration s'effectue avec un ampérage constant (25 mA pour un petit gel et 60 mA pour un grand gel) avec du tampon de migration (14,4 g glycine, 3,03 g Tris-Base, SDS 0,1 % final, qsp 10 1L).

Tableau 7: Composition des gels SDS-PAGE utilisés au cours de ce travail.

Réactifs	Gel de séparation 10%	Gel de séparation 12%	Gel de séparation 15%	Gel de concentration
Acryl/bisacrylamide 40%	2.5 ml	3 ml	3.75 ml	2.430 ml
Tris-HCl 0.75M pH 8.8	2.35 ml	2.35 ml	2.35 ml	----------
Tris-HCl 0.75M pH 6.8	----------	----------	----------	3.45 ml
Eau MilliQ	5.1 ml	4.6 ml	3.85 ml	9 ml
SDS 20%	60 µl	60 µl	60 µl	114 µl
APS 10%	60 µl	60 µl	60 µl	114 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	9 µl

3) Western Blot

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0,2 µm (BioRad) avec un voltage constant de 100 volts pendant 1 h dans du tampon de transfert (25 ml Tris-Base 1M pH 8,3, 11,26 g glycine, 200 ml méthanol, qsp 1L). Puis la membrane est lavée dans du tampon de lavage PBS-Tween (10 ml Tris-Base 1M pH 8,0, 11,7 g NaCl, 500 µl TWEEN® 20, qsp 1L) avec une faible agitation puis incubée pendant 1 h dans du tampon de blocage (10 g de lait en poudre dans 100 ml de PBS-Tween). La membrane est lavée dans du tampon de lavage pendant 15 minutes puis est incubée avec les anticorps primaires (généralement dilués au 1/2000ème dans du tampon de blocage pendant 1 h). Puis la membrane est lavée dans un bain de tampon de lavage trois fois successivement (15 minutes d'incubation par bain). Ensuite, la membrane est incubée avec les anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline pendant 1 h puis lavée trois fois avec du tampon de lavage. La phosphatase alcaline est ensuite révélée par colorimétrie (AP conjugate substrate kit, BioRad) selon les recommandations du fournisseur.

4) Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie

Après migration sur gel SDS-PAGE, le gel est incubé sur la nuit dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie G-250 (Merck) se fixant sur les protéines (400 ml méthanol, 100 ml acide acétique glaciale, 1 g de bleu de Coomassie G-250, qsp 1L). Puis le gel est décoloré par plusieurs bains de décoloration (400 ml méthanol, 100 ml acide acétique glaciale, qsp 1L).

5) Digestion des protéines d'intérêts extraites sur gel SDS-PAGE

Les protéines sont extraites directement sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un scalpel nettoyé à l'éthanol et les fragments de gels sont découpés en petits morceau afin de faciliter la digestion. Le gel est décoloré dans un bain BICAM 100 mM/acétonitrile (1 :1, v/v) (BICAM : 199 mg bicarbonate d'ammonium qsp 25 ml) pendant 30 minutes à température ambiante, en vortexant toutes les 10 minutes. Si nécessaire, un nouveau bain de BICAM/acétonitrile peut être utilisé pour les gels encore non décolorés. Une fois décoloré, le mélange BICAM/acétonitrile est enlevé, puis le gel est desséché avec 500 µl d'acétonitrile pur et incubé pendant 10 minutes environ à température ambiante jusqu'à ce que le gel apparaisse blanchâtre puis l'acétonitrile est enlevé. La solution de trypsinolyse (tampon de trypsinolyse + trypsine à 13 ng/µl) (Trypsin Gold Mass Spectrometry grade, Promega, tableau 7) est ajoutée de façon à recouvrir totalement la fraction protéique et le tout est incubé dans la glace pendant 30 minutes afin que le gel absorbe la solution de trypsinolyse. Puis la digestion trypsique a lieu sur la nuit à 37°C. Les peptides digérés à la trypsine sont stockés au -80°C ou analysés directement par spectrométrie de masse.

Tableau 8: Composition de la solution de trypsinolyse.

Solution	Composants	Quantité
Tampon de trypsinolyse	BICAM	800 µl (100 mM)
	Acétonitrile	800 µl
	Eau Milli-Q	6,4 ml
Trypsine à 13 ng/µl	Acide formique	100 µl
	Acétonitrile	200 µl

6) Préparation de plaque pour l'analyse MALDI-TOF

Les échantillons protéiques sont cristallisés avec la matrice HCCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, Bruker Daltonics). Pour la préparation de la matrice HCCA, environ 10 mg de poudre de HCCA sont repris dans 100 µl d'acide trifluoroacétique 0,2 % (TFA) et 100 µl d'acétonitrile pure. Puis le mélange est vortexé et soniqué pendant 5 minutes dans un bain à ultrason (Branson 2200, 47 kHz ± 6%) puis centrifugé (1 000 x g pendant 1 minute). 100 µl de surnageant sont mélangés avec 100 µl de TFA 0,2% et 100 µL d'acétonitrile pure.

Un volume de 1,5 µl d'échantillon est déposé sur la plaque MALDI-TOF puis 1,5 µl de matrice HCCA préparée est déposée sur la goute d'échantillon. La préparation du calibrant (peptide calibration standard II, Bruker Daltonics) est également déposée de la même façon (0,5 µl de calibrant puis 0,5 µl de matrice HCCA). Puis les échantillons sont séchés sous hotte chimique jusqu'à cristallisation des échantillons (environ 1 h).

7) Analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les échantillons sont analysés par Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF/TOF LIFT, AutoFlexIII, Bruker Daltonics) en mode positif MH+ contrôlé par le logiciel FlexControl software Version 3.3 selon le protocole décrit par Barbey (Barbey et al., 2012). Le profil peptidique (PMF : peptide mass fingerprinting) caractérisé par la masse des différents pics, est renvoyé au logiciel MASCOT (http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe) avec une tolérance de 100 ppm. L'analyse statistique des séquences est déterminée selon le score de Mowse du logiciel MASCOT. Lorsque la *P*-value est inférieure à 0,05 (seuil $p < 0,05$), l'identification protéique est significative.

Le site web http://web.expasy.org/peptide_mass/ permet déterminer *in silico* des différents peptides générés par digestion trypsique d'une protéine à partir de sa séquence afin de comparer à un profil peptidique.

V. Techniques de biologie moléculaire

1) Annotation du génome de *P. fluorescens* MFE01

Le génome de *P. fluorescens* MFE01, séquencé mais non totalement assemblé (une centaine de contigs), a été annoté avec plusieurs logiciels. Le génome global a été annoté avec le logiciel RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology (http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/RapidAnnotationServer) mais également avec le serveur CDSeasy (http://db-mml.sjtu.edu.cn/STEP/STEP_CDSeasy.php) permettant l'identification avec le programme Prodigal V2.60 et utilisant Blastp. En effet, l'utilisation de différents logiciels d'annotation est préférable car l'annotation peut différer entre les logiciels, permettant d'avoir une meilleure vue d'ensemble. Pour compléter l'annotation, les contigs intéressants (annotés par Rast ou CDSeasy) ont été renvoyés au système d'annotation bactérien en ligne BASys (https://www.basys.ca/). Les outils BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Blastn (alignement ADN/ADN) et Blastp (alignement protéine/protéine) du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) ont également été utilisés au cours de ma thèse (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) afin de confirmer l'annotation par les logiciels présentés ci-dessus et de comparer les séquences avec celles d'autres souches ou espèces bactériennes.

Lorsque l'annotation est « non satisfaisante » (par exemple le cas des « hypothetical proteins »), l'analyse de domaines protéiques a été réalisée avec le serveur Phyre^2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) permettant de prédire la structure et d'analyser les domaines protéiques par rapport à l'homologie de séquence d'autres protéines dont la structure a été décrite.

2) Extraction d'ADN et de plasmide

Le chromosome bactérien a été extrait à l'aide du kit ChargeSwitch® Forensic DNA Purification (Invitrogen™) selon les recommandations du fournisseur à partir d'une culture de nuit. Les plasmides bactériens ont étés extraits à l'aide du kit GeneJET®Genomic DNA Purification (Thermo Scientific™) selon les recommandations du fournisseur à partir d'une culture de nuit.

3) Conception des amorces et amplification par PCR

Les séquences des amorces utilisées ont été « dessinées » sur le site web http://primer3.ut.ee/. La conception des amorces est réalisée par Eurogentec™. Les amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'acide nucléique sont référencées dans le tableau 9.

Les fragments d'ADN chromosomiques ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) par utilisation de l'ADN-polymérase ADN-dépendant Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB). La température d'hybridation des amorces est déterminée avec l'outil en ligne NEBtools™ sur le site web NEB (http://calculator.neb.com/). Le temps d'élongation est calculé selon les descriptions du fournisseur : 30 secondes pour 1 000 pb (tableau 10). Le premier cycle PCR d'un volume réactionnel final de 50 µl contient : 10 µl de tampon 5X (HF buffer, NEB), 4 µl d'amorce « sens » à 10 µM et 4 µl d'amorce « antisens » à 10 µM, 4 µl de dNTP à 2,5 mM, 2µl d'ADN chromosomique à environ 15ng/µl et 0,5U de Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB) et complété pour un volume final de 50 µl avec de l'eau de biologie moléculaire.

Tableau 9: Amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'ADN d'intérêts. Les lettres soulignées correspondent aux sites de restriction (*EcoRI* : GAATTC ; *XbaI* : TCTAGA ; *XmaI* : CCCGGG et *SacI* : GAGCTC).

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
***hcp3-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCACTTCATAACTAAGGAGCCA
***hcp3-XbaI*-R**	TAATAATCTAGAGTCGGTCATGCTCAGTTC
***tssC-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCAAGGAAGCCAACACAATG
***tssC-XbaI*-R**	TAATAATCTAGAAGTCGCTCTTACTCTTTGTC
***fliA-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCGGCATCTGGAATTTTTCGT
***fliA-XbaI*-R**	TAATAATCTAGATCCCCACACTGCCTTCA
***flaA-flaG-XmaI*-F**	TAATAACCCGGGATTCGTCATGGCTTTAACAG
***flaA-flaG-XbaI*-R**	TAATAATCTAGACCATTCTTTTGACCGTTACA
***fliD-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCCTGAAGGGAGATGCACAT
***fliD-XbaI*-R**	TAATAATCTAGACGTTACTGACTGTTACTTCG
***fliS-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCGGCAATGAGGTAGAACATGA
***fliS-XbaI*-R**	TAATAATCTAGAAATTCGCTGCAATACGAGA
***fliT-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCGCACCATGAGTCTCGTATT
***fliT-Xba*I-R**	TAATAATCTAGAACATCTCTGGTTCAACTGAC
***flgN-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCCATGCACGACACTAACTTAT
***flgN-XbaI*-R**	TAATAATCTAGACAGGTGGATAGTACAGGGT
***flgZ-EcoRI*-R**	TAATAAGAATTCATTGAAGAACCGTGTCCAA
***flgZ-XbaI*-R**	TAATAATCTAGATGCGACTCAGAGATCGTC
***lysM-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCAGTACAACGAATGGAAGTCT
***lysM-XmaI*-R**	TAATAACCCGGGGCTGTTCTTGTGTTAGTTGT
***tpr-EcoRI*-F**	TAATAAGAATTCTAACTGGACACTGTGAGTAC
***tpr-SacI*-R**	TAATAAGAGCTCAGGTTTTGACTACGTTGAAC

Tableau 10: Mix réactionnel et cycle PCR utilisés pour amplifier des fragments d'acide nucléique.

Solution réactionnelle de la PCR		Cycle PCR		
Composants	volume	Degré	Temps	Cycle
Tampon 5X Phusion	10 µl	98 °C	30 sec	X 1
dNTP 2,5 mM	4 µl	98 °C	10 sec	X 30
Primer F 2,5 µM	4 µl	Tm °C	30 sec	X 30
Primer R 2,5 µM	4 µl	72 °C	1 min/kb	X 30
ADN	2 µL	72 °C	5 min	X 1
Eau Milli-Q	25,5 µl	4 °C	∞	X 1
Taq Phusion	0,5 µl			

4) Séparation des fragments d'acide nucléique

Les fragments d'acide nucléique (produits PCR, ARNm…) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8%, pour les fragments de grande taille, à 2% pour ceux de petites tailles) dans du tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,5). Du tampon de charge (30% glycérol, 0,25% bleu de bromophénol) est ajouté aux échantillons (1 :5, v/v) qui sont ensuite déposés sur gel pour une migration avec un voltage de 125 volts. La visualisation des fragments d'acide nucléique est effectuée sous éclairage UV (280 nm) après une incubation dans un bain de coloration de Sybr® Safe DNA Gel (Invitrogen™).

5) Purification et extraction sur gel des fragments d'ADN

Les produits PCR spécifiques sont purifiés à l'aide du kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen™) selon les recommandations du fournisseur. Si l'amplification est non spécifique (présence de plusieurs bandes), la bande d'inérêt est extraite et purifiée à l'aide du kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen™).

6) Digestion enzymatique et ligature

Le choix des enzymes de restriction dépend de la cassette de multiclonage (MCS) du plasmide mais également de l'absence du site de restriction au sein du fragment (vérifié sur le site http://www.restrictionmapper.org/). Les enzymes de restriction sont utilisées selon les recommandations du fabricant (NEB) fournissant le tampon optimal,

la température et le temps de digestion *etc*... La plupart des enzymes utilisées sont actives à 37°C et inactivées à 65° pendant 10 minutes. Pour le cas de d'une double digestion, le tampon optimal est déterminé avec l'outil en ligne Double Digest Finder (site web NEB) https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder.

La T4 DNA ligase (NEB) est utilisée pour insérer le fragment digéré au sein du plasmide linéarisé selon les recommandations du fournisseur. Afin d'optimiser l'étape de ligature, un ratio de 3 : 1 de mélange d'insert/plasmide est effectué, selon la quantification des acides nucléiques par le NanoDrop 2000c™ (Thermo Scientific™). Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante sur la nuit.

7) Clonage par « megaprimer » polymerase chain reaction

Comme son nom l'indique, cette technique nécessite de longues amorces et s'effectue par deux cycles PCR (Tyagi et al., 2004). Cette technique se déroule en plusieurs étapes : une première PCR permet d'amplifier l'ADN chromosomique ayant des extrémités flanquantes, venant s'hybrider sur le plasmide et ainsi insérer le fragment d'intérêt dans le plasmide *via* une deuxième PCR (où les extrémités flanquantes de l'insert servent d'amorces).

L'ADN-polymérase ADN-dépendant Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB) est utilisée pour les deux étapes de PCR selon les recommandations du fournisseur. La température d'hybridation des amorces est déterminée avec l'outil en ligne NEBtools™ sur le site web NEB (http://tmcalculator.neb.com/). Le temps d'élongation est calculé selon les descriptions du fournisseur : 30 secondes pour 1 000 pb.

Le premier cycle PCR (tableau 10) d'un volume réactionnel final de 50 µl contient : 10 µl de tampon 5X (HF buffer, NEB), 4 µl d'amorce « sens » à 10 µM et 4 µl d'amorce « antisens » à 10 µM, 4 µl de dNTP à 2,5 mM, 2µl d'ADN chromosomique à environ 15ng/µl et 0,5U de Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB) et complété à un volume final de 50 µl avec de l'eau de biologie moléculaire.

Le deuxième cycle PCR (tableau 11) d'un volume réactionnel final de 50 µl contient : 10 µl de tampon 5X (HF buffer, NEB), 8 µl de la première PCR purifiée, 2 µl de solution plasmidique, 5 µl de dNTP à 2,5 mM et 0,5U de Phusion® High Fidelity DNA polymerase (NEB) et complété à un volume final de 50 µl avec de l'eau de biologie moléculaire.

Tableau 11: Mix réactionnel et cycle PCR utilisés pour le deuxième cycle PCR « Megaprimer ».

Solution réactionnelle de la PCR		Cycle PCR		
Composants	volume	Degré	Temps	Cycle
Tampon 5X Phusion	10 µl	98 °C	30 sec	X 1
dNTP 2,5 mM	5 µl	98 °C	10 sec	X 21
Produit PCR	8 µl	Tm °C	30 sec	X 21
Plasmide	2 µl	72 °C	1 min/kb	X 21
Eau Milli-Q	24,5 µL	72 °C	5 min	X 1
Taq Phusion	0,5 µl	4 °C	∞	X 1

Ensuite, 1 µl de *DpnI* (NEB) est ajouté directement au produit de la deuxième PCR (compatibilité des tampons sur le site NEB : https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/activity-of-restriction-enzymes-in-pcr-buffers) et incubé pendant 5 h à 37°C afin de digérer le plasmide « original » mais pas le plasmide « néo-synthétisé ». En effet, étant synthétisé *in vitro*, ce plasmide ne possède pas de méthylation. Ce produit de digestion est ensuite introduit par choc thermique dans la souche *E. coli* Top10.

8) Vérification de la séquence nucléotidique

Le séquençage des produits PCR et des constructions plasmidiques contenant l'insert d'intérêt a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (Royaume-Uni, http://www.beckmangenomics.com/).

9) Transformation des souches d'*Escherichia coli*

a) Préparation des cellules *d'Escherichia coli* compétentes

Les souches d'*E. coli* BTH101, W3110, Top10 et S.17 sont cultivées à 37°C ou 30°C avec agitation (180 rpm). Lorsque la culture de 50 ml atteint la phase exponentielle (DO_{580} compris entre 0,6 et 0,8), les cellules sont centrifugées à 2 000 x

g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est incubé pendant 10 minutes dans la glace puis repris dans 5 ml de tampon TSB froid (tableau 12). Les bactéries sont aliquotées (100 µl) et stockées au -80°C pour des transformations ultérieures par choc thermique.

Tableau 12: Composition de la solution de TSB.

Composants	Quantité
Polyéthylène glycol 8000	5 g
Diméthylsulfoxyde	2,5 ml
$MgCl_2$ (H_2O)	101,5 mg
$MgSO_4$	60,15 mg
Eau Milli-Q	Qsp 50 ml

b) Transformation des souches *d'E. coli* par choc thermique

Un volume de 20 µl de KCM 5X froid (tableau 13) et 70 µl d'eau distillée froide sont ajoutés aux bactéries rendues compétentes, stockées au -80°C (100 µl). Un volume de 10 µl de produit de ligature ou 5 µl d'une extraction plasmidique est ensuite ajouté à cette suspension bactérienne. Après une incubation de cette suspension pendant 20 minutes dans la glace, un passage à 42°C pendant 45 secondes puis une deuxième incubation dans la glace pendant 5 minutes sont réalisés. Puis 500 µl de milieu LB liquide sans antibiotique est ajouté. Suite à une incubation à 37°C pendant 1 h 30, les cellules sont étalées sur milieu gélosé LB comprenant l'antibiotique approprié (tableau 2).

Tableau 13: Composition de la solution de KCM 5X.

Composants	Quantité
KCl	1,86 g
$CaCl_2$ (H_2O)	1,1 g
$MgCl_2$ (H_2O)	2,54 g
Eau Milli-Q	Qsp 50 ml

Dans le cas de construction pour le clonage, une solution de X-gal 40 µg/ml peut être ajoutée afin de sélectionner les clones ayant intégré un fragment. En effet, les sites de restriction de la cassette de multiclonage se situent au sein du gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase. Lors de l'insertion d'un fragment sur cette région, le gène *lacZ* est alors inactivé, la bactérie incapable de dégrader le X-gal en un produit bleu. Les clones positifs apparaîtront blancs contrairement aux clones négatifs qui eux seront bleus. Les clones blancs sont vérifiés par PCR.

10) Transformations des souches de *Pseudomonas*

a) Préparation des souches de *Pseudomonas fluorescens* compétentes

A partir d'une culture bactérienne sur gélose de 12 h, un peu de biomasse bactérienne est resuspendue dans de l'eau distillée stérile froide. Après une centrifugation (10 000 x g, 4°C, 1 minute), deux lavages consécutifs du culot avec de l'eau distillée froide sont effectués. Puis le culot est repris dans 100 µl d'eau distillée froide.

b) Transformation par électroporation (décharges électriques)

Ce protocole de transformation est décrit par Enderle et Farwell (Enderle and Farwell, 1998). Environ 150 ng d'ADN sont ajoutés à la suspension bactérienne décrite ci-dessus. Cette suspension est ensuite transférée dans une cuve d'électroporation (1 mm entre les deux électrodes) puis exposée à une décharge électrique de 1 800 volts pendant 5 millisecondes (Gene transformer GTF100, Savant). Très rapidement, un volume de 500 µl de milieu LB liquide sans antibiotique est ajouté et les cellules sont incubées à 28°C pendant 1 h 30 sous agitation (180 rpm). Puis les bactéries sont étalées sur milieu LB gélosé supplémenté avec un antibiotique sélectif (tableau 2).

VI. Transciptomique

1) Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits par la méthode d'extraction au phénol acide chaud selon la méthode décrite par l'équipe de Bouffartigues (Bouffartigues et al., 2012). Lorsque la culture bactérienne est en phase exponentielle (0,8 < DO580 < 1), environ 10^9 bactéries sont culotées. Les bactéries sont ensuite lysées avec un tampon de lyse (0,02 M d'acétate de sodium, pH 5,5, SDS 0,5% (w/v), 1 mM EDTA). Les lysats sont extraits avec deux incubations successives avec 600 µl de phénol acide chaud (à 60°C, pH 4,3, Sigma Aldrich) pendant 3 minutes à 60°C. Une centrifugation de 13 000 x g pendant 5 minutes permet de séparer les ARN totaux, présents dans la phase

aqueuse, de la phase organique. Puis la phase aqueuse est traitée avec 500 µl de mélange chloroforme/alcool iso-amylique (24 :1, Sigma-Aldrich) et ensuite centrifugée à 13 000 x g pendant 5 minutes afin de séparer les deux phases. Les ARN totaux sont précipités sur la nuit à -20°C dans 2 volume d'éthanol 100% contenant 100 mM d'acétate de sodium. Après la précipitation sur la nuit, les ARN sont culotés (centrifugation de 13 000 x g, 30 minutes, 4°C) puis rincés avec un volume de 1 ml d'éthanol 70% froid (-20°C). Le culot est séché sous hotte chimique pendant 1 h afin d'enlever toute trace de solvant et repris dans 50 µl d'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate, Sigma-Aldrich). Afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN, les ARN sont traités avec de la DNase pendant 2 h à 37°C selon les recommandations du fournisseur (Turbo™ DNase, Life Technologies®). L'absence d'ADN est confirmée par PCR. La DNase est ensuite inactivée à 75°C pendant 10 minutes après ajout d'un volume 1 µl d'EDTA 0,5 M (protection des ARN totaux). Une migration sur gel d'agarose 2% permet de vérifier la qualité des ARN totaux et une quantification est effectuée avec le spectromètre NanoDrop 2000c™ (Thermo Scientific™).

2) Reverse transcriptase (RT) ou transcription inverse

Avant traitement, la concentration des ARN est ajustée à 50 ng/µl. La rétro-transcription des ARN totaux en ADNc (ADN complémentaires) a été obtenue à l'aide du kit High capacity cDNA RT (Applied Biosystems™, Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur (10 minutes à 25°C, 2 h à 37°C puis inactivation à 85°C pendant 5 minutes) (tableau 14). Les échantillons négatifs de transcription (ou RT-, sans reverse transcriptase, même cycle d'incubation) sont utilisés comme témoins lors des PCR quantitatives. Les ADNc sont séparés par migration sur gel d'agarose 2% afin de vérifier la quantité équivalente entre les différents échantillons.

Tableau 14: Mix réactionnel et cycle de la RT-PCR.

Solution réactionnelle de la RT-PCR			Cycle RT-PCR	
Echantillons	RT +	RT -	Degré	Temps
Composants	Volume	Volume	25 °C	5 min
Tampon 5X RT	5 µl	5 µl	37 °C	2 h
dNTP 100 mM	2 µl	0 µl	85 °C	10 min
Amorces aléatoires	5 µl	5 µl	4 °C	∞
ARN 50 µg/µl	25 µl	25 µl		
Eau DEPC	10,5 µL	15 µl		
Reverse transcriptase	2,5 µl	0 µl		

3) PCR quantitative en temps réel

Tableau 15: Amorces utilisée pour l'étude de l'expression des gènes en qRT-PCR.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
qRT-PCR-*recA*-F	AAGGGTGCCGTAATGCGTAT
qRT-PCR-*recA*-R	ATATCCAGACCCAGAGAGCCAGTA
qRT-PCR-*fleQ*-F	CATCGCGAACCCAATCTGT
qRT-PCR-*fleQ*-R	GGCCACTTGCTGCATCATCT
qRT-PCR-*flgH*-F	TCACCATCACCCTGAACGAA
qRT-PCR-*flgH*-R	GCCGAACAACGAGGTCAGA
qRT-PCR-*flgE*-F	AGCACGCCGATCTATGACACT
qRT-PCR-*flgE*-R	TTCCAGGTATTCTCGCCAGTCT
qRT-PCR-*fliA*-F	CTGGTGTTGGCGCTGTACTAC
qRT-PCR-*fliA*-R	GCCAAGGACTTCACCGATTT
qRT-PCR-*flgM*-F	GTACCAGCAACGCCAAGGAA
qRT-PCR-*flgM*-R	TGTACCGACTCCCCGCTTT
qRT-PCR-*flaA*-F	ACACCCAGGCCATCCAGAA
qRT-PCR-*flaA*-R	TGCAGGATGTCGGTCGAA
qRT-PCR-*flaG*-F	GCTGCCAAGAGACAGGATACG
qRT-PCR-*flaG*-R	AACTCCAGATTACGCTTGATCGA
qRT-PCR-*rpoN*-F	ACTGGTCGCAGCGGAAAAT
qRT-PCR-*rpoN*-R	ATGCCTTGTGCCTCCAGTAAA
qRT-PCR-*fliD*-F	CATCGACGGTCTGACGGTTA
qRT-PCR-*fliD*-R	ACTGATCGCGCCGCTTA
qRT-PCR-*fliS*-F	GATGTTAGCCCTTCGGCAGTAC
qRT-PCR-*fliS*-R	CACCTTCCATCAACATTTGCA
qRT-PCR-*fliT*-F	AATTGCCGATACCCGTGAAG
qRT-PCR-*fliT*-R	CAGGAACGGCAAGCCAGAT
qRT-PCR-*flgZ*-F	CACCACGCCACTGGAAATC
qRT-PCR-*flgZ*-R	GGATCGTGGCTGTCTTGCA
qRT-PCR-*motA*-F	GCGTTCGTCTGCGATTACCT
qRT-PCR-*motA*-R	CGTGCGGAGCCATGTTG
qRT-PCR-*motB*-F	TCGATATTGTCGTACTGACCAAA
qRT-PCR-*motB*-R	GGACCCTGCGCACCTT
qRT-PCR-*flgN*-F	TGCAACTGATCAACGACGACTT
qRT-PCR-*flgN*-R	TGCAAAGCGAGGGATTCG

La conception des amorces a été effectuée avec le logiciel PrimerExpress® software v3.0.1 (tableau 15) et vérifiée préalablement par PCR. Les réactions s'effectuent dans un mélange de 13 µL comprenant 6,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Applied Biosystems™) auquel ont été ajoutés 100 nM de chaque amorce et les échantillons d'ADNc (un volume de 3 µl). Les amplifications PCR quantitatives en temps réels ont été réalisées avec l'appareil 7500 Fast Real Time PCR system » (Applied Biosystem®, LifeTechnologies) avec 40 cycles d'amplification (dénaturation : 95°C, 10 secondes ; hybridation des amorces : 58°C, 30 secondes ; élongation : 72°C, 6 secondes).

La quantification relative des ARNm d'intérêt a été obtenue par comparaison à la souche sauvage selon le seuil de détection Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), en utilisant le gène *recA* comme contrôle endogène. Les échantillons négatifs de transcription ont été utilisés pour contrôler l'absence d'ADN résiduel.

4) Analyse des expressions transcriptionnelles

Les valeurs d'expression ont été analysées avec le logiciel DataAssist v3.01 (Applied Biosystems™) avec un nombre d'échantillons n=6 indépendants. La différence transcriptionnelle est considérée comme significative si la *P*-value est inférieure à 0,02.

RESULTATS

I. Article 1

A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition

Victorien Decoin, **Mathias Gallique**, Corinne Barbey, Francois Le Mauff, Cecile Duclairoir Poc, Marc GJ Feuilloley, Nicole Orange and Annabelle Merieau

Contexte et importance de l'article 1:

Lors du premier article portant sur le système de sécrétion de type VI de la souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 (Decoin et al., 2014), il a été montré que la protéine Hcp2 était impliquée dans l'activité antibactérienne. Au cours de cet article, nous avons mis en évidence un nouveau rôle du SST6, spécifique à la protéine Hcp1 qui ne participe pas à l'activité antibactérienne.

Le premier phénotype observable chez le mutant MFE01Δ*hcp1* est la perte de mucoïdie. La mucoïdie est liée à la production d'exopolysaccharides formant un mucus qui confère aux colonies un aspect « gras » sur boîte. Par conséquent, nous nous sommes intéressés aux exopolysaccharides de la matrice extracellulaire. Nous avons comparé les compositions des matrices extracellulaires de la souche sauvage, mucoïde et du mutant MFE01Δ*hcp1*. Aucune différence qualitative n'a été révélée en ce qui concerne les sucres majoritaires qui sont présents en même proportion chez les deux souches. Cependant, il existe une différence quantitative car MFE01Δ*hcp1* présente deux fois moins d'exopolysaccharides que la souche sauvage. Nous nous sommes également intéressés aux protéines présentes dans le surngeant de culture et nous avons observé l'absence d'une protéine chez le mutant MFE01Δ*hcp1*. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier cette protéine : la flagelline. La perte de sécrétion de la flagelline chez ce mutant nous a incité à effectuer des tests de mobilité, révélant ainsi la perte de la mobilité chez MFE01Δ*hcp1*. De plus, nous avons démontré l'implication de la protéine Hcp1 dans l'inhibition de mobilité d'une souche clinique de *P. fluorescens,* MFN1032. En effet, lorsque MFE01 encercle la souche MFN1032 sur une gélose 0.3% agar, favorisant la mobilité de type « swimming », MFE01 est capable de séquestrer MFN1032, contrairement au mutant MFE01Δ*hcp1*. Deux hypothèses ont été formulées : (i) soit le mutant MFE01Δ*hcp1*

n'est plus capable de séquestrer MFN1032 car la mutation d'*hcp1* entraîne la perte de mobilité de MFE01 et la rend donc incapable de former une barrière physique autour de MFN1032 ; (ii) soit MFE01 sécrète un effecteur, par l'intermédiaire de la protéine Hcp1, délivré directement dans le cytoplasme de la souche MFN1032, inhibant ainsi sa mobilité. Pour répondre à cette question, nous avons procédé à une compétition entre les souches sur une gélose 0.6% agar, favorisant la mobilité de type « swarming ». Cette mobilité requiert à la fois un flagelle et la production de biosurfactant ou un flagelle et un pili de type IV. Seule la souche MFN1032, qui produit des biosurfactants, peut se déplacer sur ce type de gélose, contrairement à MFE01 qui est incapable de se déplacer par « swarming ». Sur ce milieu, la souche MFE01, pourtant immobile, est toujours capable d'inhiber la mobilité de type « swarming » de la souche compétitrice, écartant ainsi la première hypothèse. Par conséquent, notre hypothèse est que la protéine Hcp1 est impliquée dans la sécrétion d'un effecteur qui, une fois injecté dans le cytoplasme de la souche MFN1032, va y empêcher le fonctionnement ou la formation de flagelle. Chez MFE01Δ*hcp1,* l'absence de la protéine Hcp1 provoquerait une accumulation de cette toxine responsable de l'immobilisation dans le cytoplasme de MFE01Δ*hcp1.* Cette accumulation saturerait la capacité protectrice des antitoxines correspondantes. Ceci impliquerait une action de cette toxine dans le cytoplasme de MFE01Δ*hcp1*, empêchant ainsi la formation de flagelle ce qui conduirait à la perte du phénotype de mobilité. L'introduction du gène *hcp1* dans la souche MFE01Δ*hcp1* restaure la mobilité, ce qui est cohérent avec notre hypothèse. Puis nous avons inactivé le SST6, par mutation du gène *tssC* codant pour une protéine de la gaine du SST6. Cette mutation rend impossible la sécrétion de toutes les toxines transportées par le SST6, dont celles associées à la protéine Hcp1. La mutation de *tssC* entraine chez MFE01Δ*tssC* la perte de la mucoïdie et de la mobilité, prouvant ainsi que ces deux phénotypes sont associés spécifiquement à la perte de la sécrétion faisant intervenir la protéine Hcp1. Cette activité d'immobilisation, liée au SST6 n'avait encore jamais été décrite jusqu'à présent.

Decoin *et al. BMC Microbiology* (2015) 15:72
DOI 10.1186/s12866-015-0405-9

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition

Victorien Decoin[1], Mathias Gallique[1], Corinne Barbey[1], Francois Le Mauff[2], Cecile Duclairoir Poc[1], Marc GJ Feuilloley[1], Nicole Orange[1] and Annabelle Merieau[1*]

Abstract

Background: *Pseudomonas fluorescens* strain MFE01 secretes in abundance two Hcp proteins (haemolysin co-regulated proteins) Hcp1 and Hcp2, characteristic of a functional type 6 secretion system. Phenotypic studies have shown that MFE01 has antibacterial activity against a wide range of competitor bacteria, including rhizobacteria and clinically relevant bacteria. Mutagenesis of the *hcp2* gene abolishes or reduces, depending on the target strain, MFE01 antibacterial activity. Hcp1, encoded by *hcp1*, may also be involved in bacterial competition. We therefore assessed the contribution of Hcp1 to competition of *P. fluorescens* MFE01 with other bacteria, by studying MFE01 mutants in various competitive conditions.

Results: Mutation of *hcp1* had pleiotropic effects on the MFE01 phenotype. It affected mucoidy of the strain and its motility and was associated with the loss of flagella, which were restored by introduction of plasmid expressing *hcp1*. The *hcp1* mutation had no effect on bacterial competition during incubation in solid medium. MFE01 was able to sequester another *P. fluorescens* strain, MFN1032, under swimming conditions. The *hcp2* mutant but not the *hcp1* mutant conserved this ability. In competition assays on swarming medium, MFE01 impaired MFN1032 swarming and displayed killing activity. The *hcp2* mutant, but not the *hcp1* mutant, was able to reduce MFN1032 swarming. The *hcp1* and *hcp2* mutations each abolished killing activity in these conditions.

Conclusion: Our findings implicate type 6 secretion of Hcp1 in mucoidy and motility of MFE01. Our study is the first to establish a link between a type 6 secretion system and flagellin and mucoidy. Hcp1 also appears to contribute to limiting the motility of prey cells to facilitate killing mediated by Hcp2. Inhibition of motility associated with an Hcp protein has never been described. With this work, we illustrate the importance and versatility of type 6 secretion systems in bacterial adaptation and fitness.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, Type 6 secretion system, Hcp protein, Competitive inhibition, Motility, Mucoidy, Exopolysaccharides

Background

Environmental bacteria are in perpetual war against several competitors, and thus require weapons to conquer new territory. The type 6 secretion system (T6SS) of Gram-negative bacteria is an effector translocation apparatus resembling an inverted bacteriophage puncturing device [1-3]. It is involved in a broad variety of functions, including antibacterial activity [4,5] and bacterial communication [6]. For example, *Proteus mirabilis* uses the killing activity of T6SS for self-recognition: this T6SS seems to be activated when opposing *P. mirabilis* swarms meet. The result of its action is a visible boundary called the Dienes line [7,8].

The T6SS machinery comprises at least 13 proteins, the core components, and sometimes, additional proteins [9,10]. Some of the core component proteins can affect systems other than T6SS. Hcp proteins, extracellular components of this secretion machinery, are released

* Correspondence: annabelle.merieau@univ-rouen.fr
[1]LMSM, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Normandie Université, EA 4312, IRIB, Université de Rouen, IUT d'Evreux, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Decoin et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

into the medium, and therefore may serve as markers of a functional T6SS apparatus [11]. Silverman and colleagues demonstrated that *P. aeruginosa* Hcp are not only structural proteins but also play a crucial role as chaperone and receptor for T6SS effectors. Various Hcp proteins transport their own effectors and this effector selection by Hcp seems to be specific [12].

The diversity of T6SS regulation reflects the vast array of its functions. The *P. aeruginosa* H1-T6SS gene cluster exhibits posttranscriptional regulation involving two sensor kinases, RetS and LadS [13-15]. High concentrations of synthetic c-di-GMP have negative effects on sensor kinase RetS, leading to *P. aeruginosa* H1-T6SS being turned on [16]. It is likely that a similar regulatory pathway controls the expression of *P. protegens* Pf-5 and *P. syringae* pv. syringae T6SS gene clusters [17,18]. However, T6SS regulation involves systems that regulate other genes suggesting regulatory cross-talk between T6SS and other virulence factors.

Environmental bacteria are often surrounded by an extracellular matrix, forming a protective capsule called the glycocalyx [19]. This extracellular matrix is generally composed of bacterial exopolysaccharides (EPS). EPS are involved in a variety of functions, including microcolony formation, protection against bacteriophages and mucoid phenotypes. The mucoid phenotype of *Pseudomonas* sp. is believed to be a global adaptive stress response to adverse environmental conditions [20,21]. It is characterized by overproduction of EPS alginate leading to shiny, raised and opaque colonies. The mucoid phenotype is a major factor contributing to *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis (CF) patients [22,23] but is unstable *in vitro* [24]. Some *P. aeruginosa* CF isolates acquire a mucoid phenotype through mutation of the anti-sigma factor MucA, a negative regulatory factor that sequesters AlgU, a positive regulator of alginate production [22,25]. A proteomic study by Rao and coworkers found that mucoid *P. aeruginosa* strains do not express T6SS genes [26]. Unlike *P. aeruginosa*, some *Vibrio cholerae* strains are mucoid and have an active T6SS [27]. Some environmental *P. fluorescens* strains produce alginate or neutral and amino sugars which give a mucoid phenotype [28,29]. The *P. fluorescens* mucoid phenotype, like that in *P. aeruginosa*, was reported to be unstable [29]. The mucoid phenotype can occur following mutation of the negative regulator of the alginate biosynthetic operon, muc [30]. We previously characterized the strain MFE01, a mucoid environmental *P. fluorescens* isolate. It constitutively secretes two characteristic T6SS proteins at 28°C: Hcp1 and Hcp2. It also exerts antibacterial activity during contact on a solid surface with competitive bacteria; this activity is associated with Hcp2 [31]. The aim of this work was to study the role of Hcp1 and the link between T6SS and the mucoid phenotype of MFE01.

Results and discussion

Some mucoid *P. fluorescens* strains secrete Hcp abundantly

The phenotypes of four *P. fluorescens* strains were observed after growth on LB agar plates at 28°C. Environmental strains MFE01 [31] and MFE07 (this study) had a stable shiny aspect, characteristic of mucoid phenotypes at 28°C. Skin strain MFP05 [32] and clinical strain MFN1032 [33] did not have a mucoid phenotype at this temperature (Figure 1A and B).

MucA is a negative regulator of the mucoid phenotype [22] in *Pseudomonas* species. We introduced the *mucA* gene of the *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 (previously described as a *P. fluorescens* strain) [34] into MFE01. The expression of *mucA* did not switch-off mucoidy at 28°C, suggesting that the mucoid phenotype of MFE01 is not due to a mutation of the *mucA* gene or is MucA independent (Figure 1A). Scanlan and Buckling showed that the environmental *P. fluorescens* strain SBW25 has an

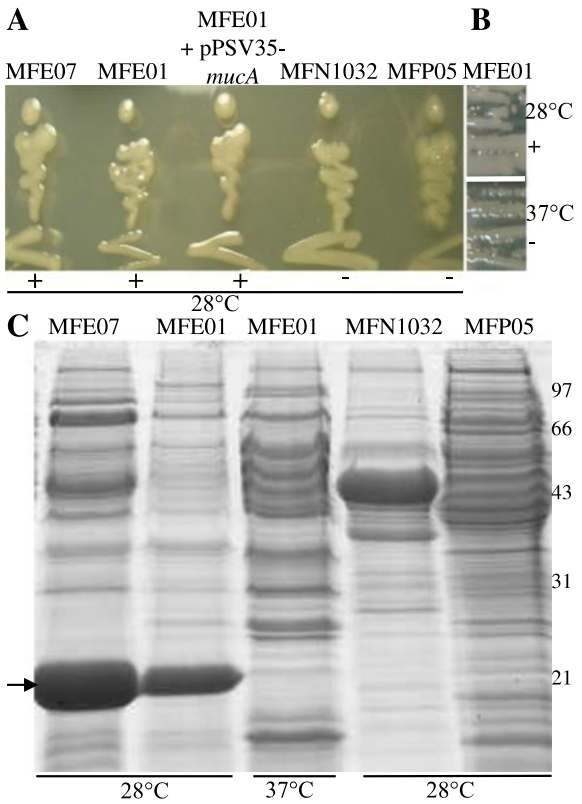


Figure 1 Hcp secretion and mucoid phenotype in *P. fluorescens* strains. A: Mucoidy was assessed on LB agar at 28°C. +: mucoid, −: non mucoid. **B**: Mucoidy at 28°C or 37°C of MFE01. +: mucoid, −: non mucoid. The images shown are representative of three assays. **C**: Concentrated supernatants of cultures in late exponential growth phase, grown at 28°C or 37°C, were analysed by SDS-PAGE (15% separation gel) and Coomassie staining. Bands (indicated by arrows) with an approximate molecular mass of 21 kDa were observed in MFE01 and MFE07 supernatants at 28°C. Mass spectrometry identified these major supernatant proteins as Hcp proteins.

unstable mucoid phenotype; although the genetic mechanisms of this phenotype remain unknown, they do not include mutations at many of the loci commonly reported to be involved in mucoid conversion, including *mucA* and *algU*. They also demonstrated that lytic phage exerts a selection pressure by selecting the mucoid phenotype [29].

We prepared supernatants of cultures of mucoid *P. fluorescens* strains MFE01 and MFE07 and found that these strains secreted large amounts of proteins identified as Hcp by Mass Spectroscopy (MS) (Figure 1C). The spot for the protein secreted by MFE01 matched significantly with gi: 398989489 (T6SS effector, Hcp1 family from *Pseudomonas* sp GM24) with a score of 120 for a score threshold of 84. The spot for the protein secreted by MFE07 spot matched significantly with gi:77458272 (hypothetical protein Pfl01_2045 from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, Hcp1 family) with a score of 65 for a score threshold of 54. The non-mucoid *P. fluorescens* strains MFP05 and MFN1032 did not secrete detectable amounts of Hcp proteins into the extracellular medium.

The optimal growth temperature of MFE01 is 28°C but it can grow at 37°C. Clearly visible at 28°C, the mucoid phenotype and Hcp secretion were both switched off at 37°C, suggesting a common regulation of these two phenotypes (Figure 1B,C).

Unterweger and colleagues observed a correlation between the mucoid phenotype and Hcp secretion in *V. cholerae* smooth strains [27]. Sigma-54 controls T6SS genes transcription, so they introduced *vasH*, encoding a sigma-54 activator protein, into rough (non mucoid) *V. cholera* strains impaired in Hcp secretion: the expression of *vasH* restored the mucoid phenotype, but not the Hcp secretion. However, *vasH* can activate transcription of genes other than T6SS genes *via* sigma-54 [35,36] suggesting that the correlation between mucoidy and T6SS in *V. cholerae* may be due to a common regulation system.

Hcp1 of *P. fluorescens* MFE01 is involved in mucoid phenotype

We constructed *hcp* mutants, and found that the *hcp1* mutation (MFE01Δ*hcp1* strain) lead to the loss of mucoidy at 28°C whereas the *hcp2* mutation (MFE01Δ*hcp2* strain) did not affect the mucoid phenotype (Figure 2). The introduction of a plasmid carrying the *hcp1* gene into MFE01Δ*hcp1* (MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* strain) restored the wild-type phenotype, suggesting a direct link between *hcp1* expression and mucoidy. We analysed and compared the extracellular matrices (ECM) of MFE01 and MFE01Δ*hcp1*. The mucoid phenotype is a consequence of exopolysaccharide (EPS) accumulation [37], so we determined ECM sugar composition by Gas–liquid Chromatography (GLC). No significant difference between MFE01 and MFE01Δ*hcp1* was observed concerning the

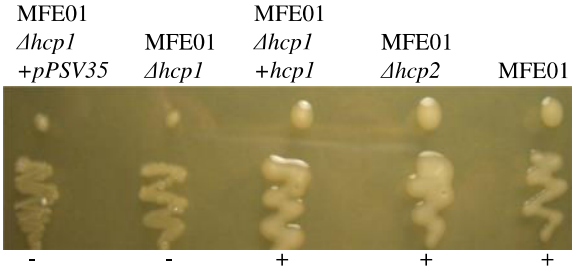


Figure 2 Effects of *hcp1* and h*cp2* mutations on mucoid phenotype. Representative images of mucoidy of MFE01, MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp2*, MFE01Δ*hcp1*+*pPSV35* and MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* at 28°C on LB agar (n = 3). +: mucoid, –: non mucoid.

proportion of characteristic sugars of the *Pseudomonas* EPS (rhamnose, mannose, galactose and glucose; Figure 3A). Thus, MFE01Δ*hcp1* is able to secrete an EPS similar to that produced by MFE01. Nevertheless, the MFE01 ECM contained twice as much EPS as the MFE01Δ*hcp1* ECM suggesting that the loss of the mucoid phenotype was a consequence of less EPS accumulation (Figure 3B). In *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm formation and T6SS expression are negatively regulated by the sensor RetS and *ret*S mutants produce a hyperbiofilm phenotype [16]. Biofilm formation by MFE01 and mutants was then assayed. The moderate biofilm biovolume was not significantly different between MFE01 and MFE01Δ*hcp1 or* MFE01Δ*hcp2* mutants (Figure 3C). These findings indicate that mucoid phenotype and biofilm formation are not co-regulated by T6SS in MFE01.

ECM protein fractions from supernatants of MFE01, MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* were studied by SDS-PAGE (Figure 4A). Proteins of approximate molecular mass of 38 kDa were present in ECM extracts from MFE01 and MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* but not in MFE01Δ*hcp1*. MS identified these 38 kDa proteins as flagellin proteins: they matched significantly with flagellin from *Pseudomonas moraviensis* (gi: 515142380) with a score of 94 for a score threshold of 86. Thus, the mucoid phenotype appears to involve the accumulation of both EPS and flagellin in ECM, which are perturbed by *hcp1* deletion. This was unexpected because the literature generally reports an inverse cross-talk between the mucoid phenotype and flagellar assembly. For example, the alternative sigma factor, σ22 (synonym AlgT or AlgU), is a positive regulator of alginate biosynthesis and a negative regulator of flagellum biosynthesis [38].

P. fluorescens MFE01 Hcp1 is involved in motility

We examined motility of our various strains to elucidate the relation between flagellin accumulation in the ECM and flagellum functionality. MFE01, MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp2*, MFE01Δ*hcp1*+pPSV35 (empty vector control) and MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* were assayed for swimming;

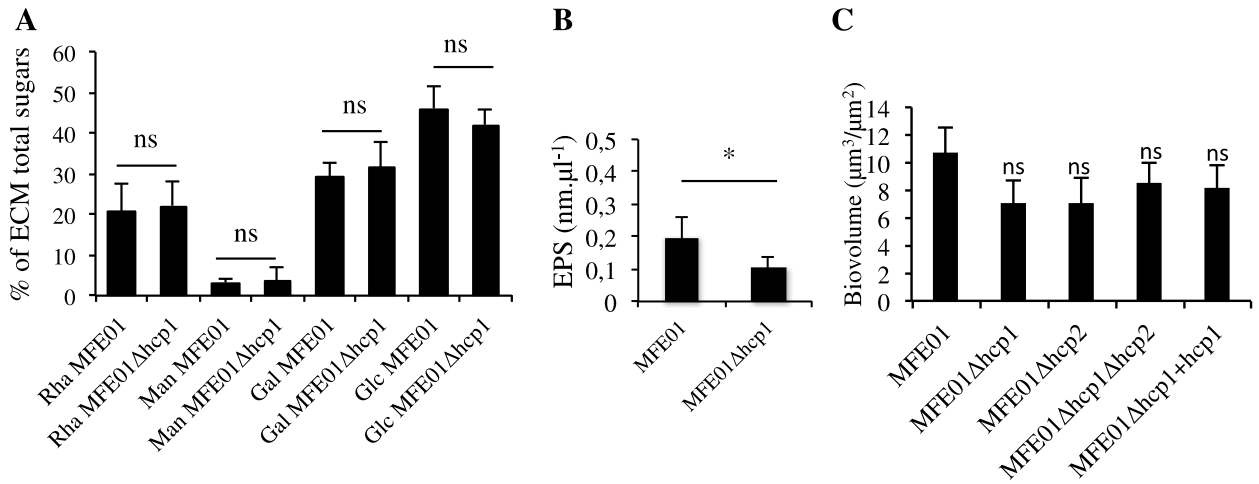


Figure 3 Analysis of the sugar composition of the extracellular matrix and effect of *hcp1* and *hcp2* mutations on biofilm biovolume. **A**: Relative quantity of major sugars (Rha = Rhamnose, Man = Mannose, Gal = Galactose and Glc = Glucose) determined by gas chromatography in extracellular matrix (ECM) of MFE01 and MFE01Δ*hcp1*. Values are mean results of four independent experiments, and the error bars represent standard error of the mean. Strains were compared pairwise by non-parametric Mann–Whitney two-tailed tests. ns: no significant difference. **B**: Gas chromatographic determinations of the absolute quantity of exopolysaccharides (EPS) in the extracellular matrix (ECM) of MFE01 and MFE01Δ*hcp1*. Values are mean results of four independent experiments and the error bars represent standard error of the mean. Strains were compared pairwise by non-parametric Mann–Whitney two-tailed tests. **p*-value <0.05. **C**: Biovolume of biofilms. The biofilms were grown on glass surface at 28°C for 48 h under a flow of LB medium. Biovolumes were obtained by COMSTAT analyses. Values are mean results of at least five independent experiments and the error bars represent standard error of the mean. Statistical analyses were performed using Non-parametric Mann–Whitney Tests (two tailed). ns means no significant difference in biovolume (*p*-value >0.05) relative to the MFE01 biofilm biovolume assay.

this confirmed that MFE01Δ*hcp1* had lost motility that was restored by *hcp1* introduction *in trans*. The restoration of wild-type phenotype in MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* is inconsistent with a possible polar effect of the *hcp1* deletion (Figure 4B).

The type 3 secretion system is related to the flagellum [39], but little is known about the relation between T6SS and the flagellar regulon. The IcmF of *Vibrio cholerae*, a T6SS protein, is involved in motility [40]. IcmF is an inner-membrane protein of the T6SS found in numerous pathogens, and has been implicated in intracellular multiplication inside host cells [41,42]. In an avian pathogenic *E. coli*, *icmF* mutation impaired motility [43]; the authors indicate that this contrasts with other mutants in T6SS genes, notably *clpV* and *hcp*, which had no motility defects. Their findings suggest that the motility

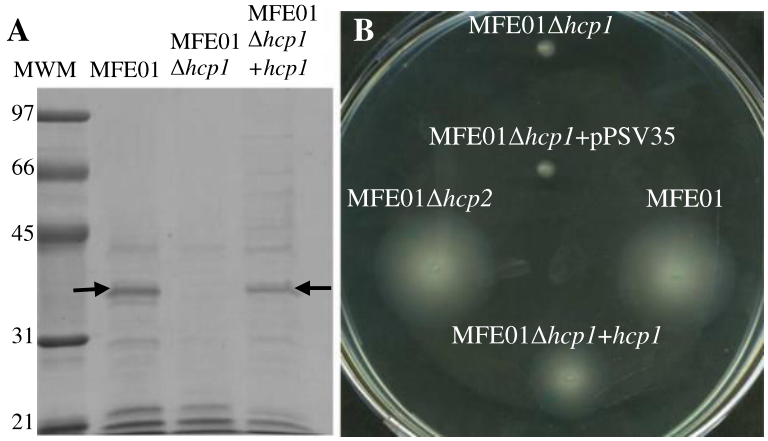


Figure 4 Effect of *hcp1* and *hcp2* mutations on flagellin secretion into the extracellular matrix and on motility. A: Protein fractions from the ECM of MFE01, MFE01*Δhcp1* and MFE01*Δhcp1+hcp1* were analysed by SDS-PAGE and Coomassie staining. Bands with approximate molecular mass ≈ 38 kDa, indicated by the arrows, were observed at the growth temperature of 28°C and were identified as flagellin proteins by MALDI-TOF (n = 3). Molecular weight markers are indicated. **B**: Swimming assay on LB in 0.3% agar at 28°C. MFE01, MFE01Δ*hcp2* and MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* were motile but MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*hcp1*+ pPSV35 (empty plasmid used as control) were non motile (n = 3).

defect of the *icmF* mutant was not due to a general defect of motility because of a non-functional T6SS. IcmF was somehow involved in flagellar regulation. The restoration of the motility of MFE01Δ*hcp1* by *hcp1* introduction *in trans* implies that the function of T6SS associated to *hcp1* expression is directly involved in motility in this strain.

The *hcp1* mutant of *P. fluorescens* MFE01 retains virulence toward competitor bacteria

The Hcp concentration was slightly lower in the supernatant of MFE01Δ*hcp1* than that of the wild-type MFE01 at 28°C (Figure 5A). This is consistent with our previous observations [31]: most of the Hcp secreted by MFE01 is produced from the expression of the *hcp2* gene. We have also demonstrated that MFE01 has a killing activity against various Gram-negative bacteria on solid medium. MFE01Δ*hcp2* reduced prey cell populations, but significantly less than MFE01 indicating that Hcp2 contributes to the killing activity, and that another factor is also involved. To determine whether Hcp1 could be this other factor, we co-cultured mutant MFE01Δ*hcp1* and the prey MFN1032 on a filter on solid media for 4h at 28°C. There was no significant difference of the MFN1032 population between the co-culture with wild-type MFE01 and the co-culture with MFE01Δ*hcp1* (Figure 5B). Thus, Hcp1 was not the key factor in this antibacterial activity even if it contributed to killing. Whereas, the MFE01Δ*hcp2* mutant had significantly less antibacterial activity than MFE01 and MFE01Δ*hcp1*. The double mutant, MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2*, was even less bactericidal than MFE01Δ*hcp2* but nevertheless reduced the MFN1032 population. Another system independent of Hcp1 and Hcp2 seems to be involved in killing activity.

P. fluorescens MFE01 inhibits the motility of *P. fluorescens* strain MFN1032

The killing activity mediated by T6SS during swarming in *P. mirabilis* involves self-recognition (the Dienes effect), and we therefore studied the behaviour of MFE01 in conditions permitting its motility [7,8]. In swimming conditions (in 0.3% agar), *P. fluorescens* MFN1032 was spotted into the centre of a ring formed by MFE01 or its mutants (Figure 6A). MFE01, MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* and MFE01Δ*hcp2* inhibited MFN1032 motility, but swimming MFN1032 spread through the MFE01Δ*hcp1* and, MFE01Δ*hcp1*+*pPSV35* mutants (Figure 6B). The *hcp1* mutation thus abolished MFE01 confining MFN1032. Introduction of the native *hcp1* gene in *trans* restored the inhibitory activity on MFN1032 swimming. Thus, in these swimming conditions, *hcp1* expression seems required for *P. fluorescens* MFE01 to control the swimming of *P. fluorescens* MFN1032. In these conditions, MFE01Δ*hcp1* lacked motility whereas MFE01 was motile (Figure 4B). The confinement of MFN1032 could be simply due to the formation of a physical barrier by the

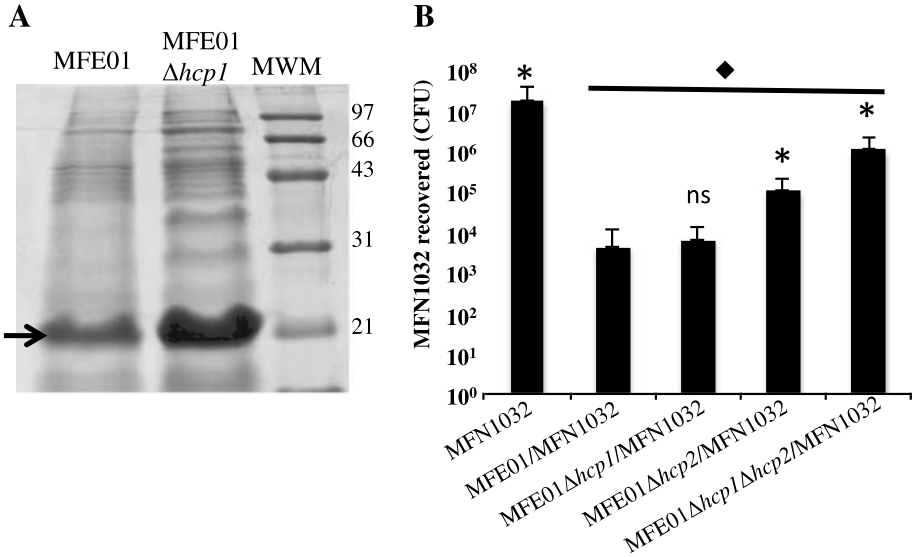


Figure 5 Hcp secretion and killing activity of *P. fluorescens* MFE01 and derivatives strains. A: Concentrated supernatants of MFE01 and MFE01Δ*hcp1* cultures were analysed by SDS-PAGE and Coomassie staining. Bands with a molecular mass similar to that of an Hcp protein (≈20 kDa), indicated by the arrow, were observed at a growth temperature of 28°C. MWM: molecular weight markers are indicated. **B**: Quantitative co-culture assays were performed. Prey cells (MFN1032 carrying pSMC21-*gfp*) were or were not mixed at ratio of 1:5 with *P. fluorescens* MFE01, MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2* and MFE01Δ*hcp2*; after 4 h at 28°C, MFN1032 cfu were counted (n = 4, the error bars represent standard error of the mean).
* Indicates a significant difference in MFN1032 cfu (*p*-value <0.05) relative to the MFN1032/MFE01 assay; ns means no significant difference. ♦ indicates a significant difference in MFN1032 cfu (*p*-value <0.05) relative to the MFN1032 alone control assay.

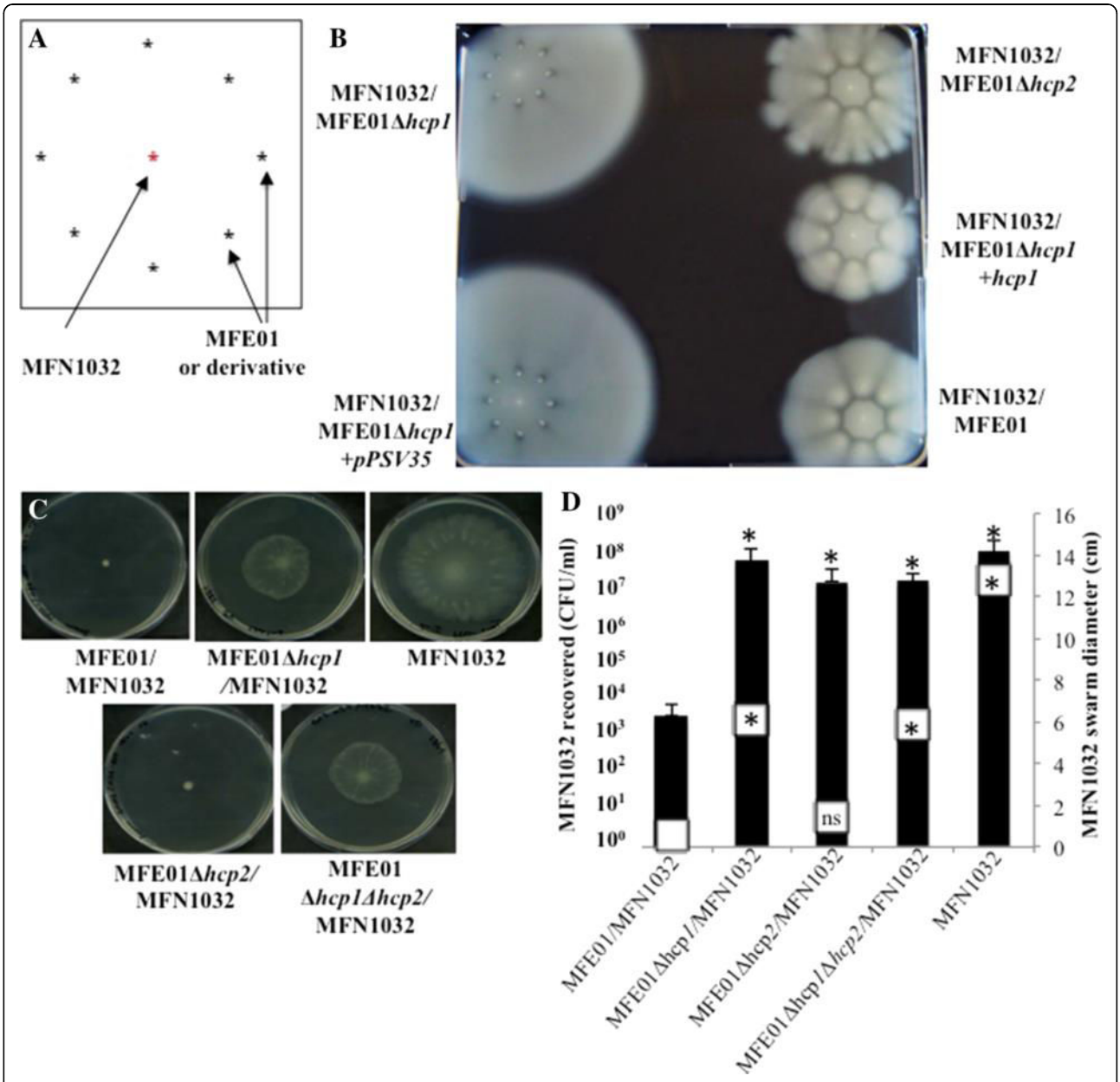


Figure 6 Effects of *P. fluorescens* MFE01 and its mutants on competitive bacteria. A: Schematic drawing of the assay: *P. fluorescens* MFN1032 was inoculated into the centre of a ring formed by MFE01 or a mutant on LB medium in 0.3% agar. On this medium MFN1032 and ME01 can swim. **B**: Swimming of MFN1032 in competition with MFE01 or mutants. Results after incubation at 28°C, 24 h. The images shown are representative of three assays. **C**: Co-cultures were performed on swarming medium (LB in 0.6% agar) at 28°C, 24h. On this medium MFN1032 can swarm but ME01 cannot. Prey cells (MFN1032) were or were not mixed with *P. fluorescens* MFE01 or its derivatives at ratio 1:5. The images shown are representative of three assays. **D**: Quantitative black histograms represent survival of MFN1032 and white squares the MFN1032 swarm diameter (n = 4, error bars represent standard error of the mean). * Indicates a significant difference of the MFN1032 cfu (*p*-value <0.05) relative to the MFN1032/MFE01 assay. ns: no significant difference.

motile MFE01 whereas non-motile MFE01Δ*hcp1* could not form this barrier.

So we therefore conducted co-cultures overnight on 0.6% LB agar, conditions allowing the swarming of MFN1032. On these plates, MFE01 and mutants were unable to swarm because MFE01 lacks surfactants essential for *P. fluorescens* swarming [44]. MFE01 and MFE01Δ*hcp2* clearly inhibited MFN1032 swarming, whereas MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2* had much less effect on MFN1032 swarming (Figure 6C,D). This indicates that the inhibition of motility observed was not due to MFE01 or its derivatives forming a physical

barrier. Also, diameter of the MFN1032 swarming was reduced, albeit to a lesser extent, by the double mutant MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2* providing further evidence for another unidentified inhibitory factor. These experiments are uninformative about whether the decrease in swarming diameter is due to a killing activity or an immobilization activity.

We consequently assayed the bactericidal activity of MFE01 and its mutants by counting MFN1032 cells in each swarming condition (Figure 6D). The MFN1032 population underwent 5-logs drops after co-culture with wild-type MFE01. Co-culture with MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*hcp2* did not significantly decrease the MFN1032 population. We assumed that when co-cultured with MFE01Δ*hcp1,* MFN1032 cells could swarm and thereby escape from the killing activity mediated by Hcp2, which requires close contact. When in co-culture with MFE01Δ*hcp2,* MFN1032 could not be able to escape but the killing activity is abolished by *hcp2* mutation. In antibacterial activity assays on solid media (Figure 5B), the MFN1032 cells were immobilized on a filter, and therefore unable to escape the killing activity of the *hcp1* mutant.

These results suggest that MFE01 needs Hcp1 and Hcp2 to kill MFN1032 in conditions of motility: Hcp1 could reduce the motility of prey cells and thereby facilitate killing by Hcp2.

Phenotypes assigned to Hcp1 and Hcp2 are associated to a T6SS

Analysis of MFE01 draft genome is under way. Preliminary results indicated that this genome contains only one T6SS cluster exhibiting all core component genes but *hcp* genes. The two *hcp* genes, *hcp1* and *hcp2,* are separately located outside this cluster and are associated with *vgr*G genes. Into this unique T6SS we identified a gene coding for a putative protein corresponding to a protein member of EvpB/VC_A108 family (TIGR03355). This putative protein matched with the WP_016772499.1 sequence (MULTISPECIES: type VI secretion protein [*Pseudomonas*], with 99% identity and coverage of 100%). These proteins are described as T6SS needle sheath proteins TssC and are essential components of this system. MFE01Δ*tssC,* a mutant disrupted in this T6SS core component gene, was non motile in swimming conditions and non-mucoid at 28°C as well as MFE01Δ*hcp1* (Figure 7A and B) whereas MFE01Δ*hcp2* conserved the wild type phenotype (mucoid and motile). During co-culture on LBG containing X-gal at 28°C with *E.coli* containing pUC19 (*E.coli*pUC19), MFE01Δ*hcp2* and MFE01Δ*tssC* allowed *E.coli*pUC19 growth (blue spots) whereas MFE01Δ*hcp1* and MFE01 inhibited *E.coli*pUC19 growth (white spots) (Figure 7C). ME01Δ*tssC* phenotype seems similar to a patchwork of MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*hcp2* phenotypes. These results provide a

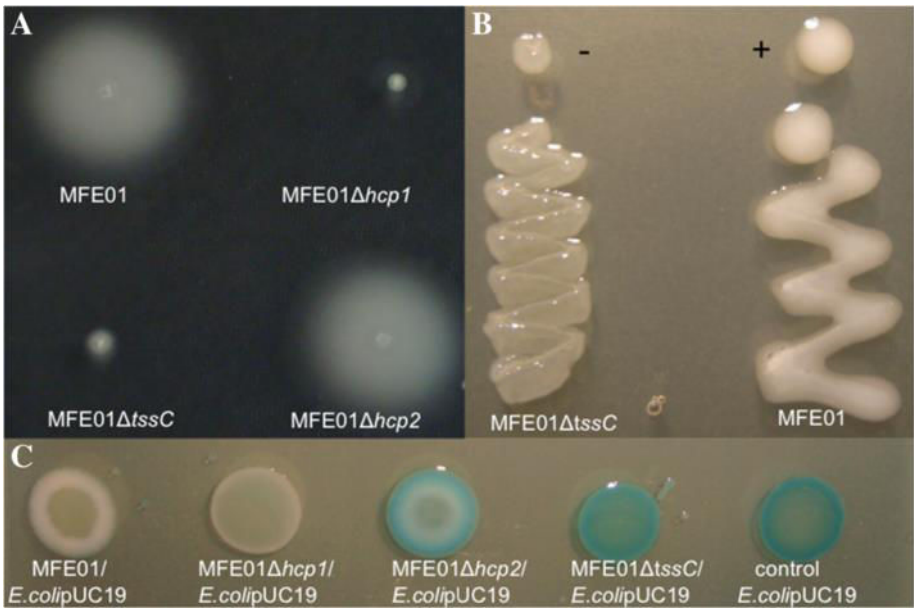


Figure 7 Phenotypes of the MFE01Δ*tssC* mutant. A: Swimming assay on LB in 0.3% agar at 28°C during 24 h. MFE01 and MFE01Δ*hcp2* were motile contrary to MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* strains (n = 3). **B**: Representative images of mucoidy of MFE01 and MFE01Δ*tssC* on LB agar at 28°C, 24 h (n = 3). +: mucoid, −: non mucoid. **C**: Effects of *P. fluorescens* MFE01 and its mutants on competitive *E.coli* on solid medium. Co-cultures were performed on LB medium supplemented with X-Gal (40 μg/ml) at 28°C during 24 h. Prey cells (*E.coli DH5amcr* containing pUC19) were or were not mixed with *P. fluorescens* MFE01 or its derivatives at ratio 1:1. Blue is due to X-Gal degradation by *E.coli*pUC19. The images shown are representative of three assays.

strong confirmation of Hcp1 and Hcp2 involvement in a T6SS.

Conclusion

In this work, we further illustrate the importance and versatility of the T6SS in bacterial adaptation and fitness. We demonstrated cooperation between two different Hcp proteins in bacterial competition. The observations indicate that T6SS associated with Hcp1 secretion has pleiotropic effects on *P. fluorescens* MFE01: it affects mucoidy, motility and competitor inhibition in motility conditions. The relationships between T6SS and flagellin and between T6SS and mucoidy have not yet been fully elucidated. Nevertheless, we describe some of the mechanisms associated with MFE01 motility and inhibition of prey cell motility. This suggests that some effectors, that are used to inhibit competitor motility, could be accumulated in MFE01Δ*hcp1*, in absence of Hcp1, and consequently might inhibit the mutant's own motility. Analysis of MFE01 draft genome is under way. Numerous mutants should be constructed to analyse function of unknown putative genes surrounding these *hcp* genes to ensure an informative genomic annotation and to explain how this T6SS could impact mucoidy and motility.

Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

All strains and plasmids used are listed in Table 1. All bacterial strains were grown in LB medium with shaking (180 rpm). *Pseudomonas fluorescens* strains were grown at 28°C or 37°C and *Escherichia coli* at 37°C. Media were supplemented with antibiotics as appropriate: kanamycin (Km) 50 μg/ml (*E. coli*) or 200 μg/ml (*P. fluorescens*); tetracycline (Tc) 15 μg/ml; gentamicin (Gt) 15 μg/ml (*E. coli*), or 50 μg/ml or 100 μg/ml (*P. fluorescens* in liquid and solid media, respectively).

Hcp secretion analysis

Hcp secretion was studied by harvesting the supernatants by centrifuging the cultures at 5000 × *g* for 10 minutes at 20°C and passing them through a Millipore membrane with 0.22 μm pores. TCA (trichloroacetic acid, Sigma-Aldrich) was added to the supernatant to a final concentration of 10% and the mixture was incubated overnight at 4°C. The supernatant was removed by centrifugation at 13000 × *g*, for 30 minutes at 4°C. The protein pellet was washed twice with 5 ml of 20 mM Tris base (VWR) in cold acetone (Merck) and centrifuged at 13000 × *g*, for 30 minutes at 4°C. The dry pellet was then resuspended in distilled water. Proteins were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Briefly, samples were mixed with an equal volume of 2 × Laemmli sample buffer (with β-mercaptoethanol), boiled for 5 min at 100°C and then cooled to room temperature before loading.

Table 1 Plasmids and strains used in the study

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Reference/ source
P. fluorescens		
MFE01	Air isolate, Rif^R	[31]
MFE01Δ*hcp2*	MFE01 with early stop codon in *hcp2*	[31]
MFE01Δ*hcp1*	MFE01 with *hcp1* disruption	This study
MFE01Δ*hcp1* + *hcp1*	MFE01Δ*hcp1* with pPSV35 carrying the wild-type *hcp1* gene	This study
MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2*	MFE01 with *hcp1* and *hcp2* mutations	This study
MFE01Δ*tssC*	MFE01 with *tssC* disruption	This study
MFN1032	Clinical strain	[33]
MFP05	Skin isolate	[32]
Pf-5	Plant isolate	[34]
MFE07	Air isolate	This study
Escherichia coli		
DH5amcr	General cloning strain	LMSM collection
S17.1	RP4-2-Tc::Mu, *aph*::Tn7, recA, SmR, donor strain for conjugation	[48]
Vectors		
pPSV35	*P. aeruginosa oriV*, *lacIq mob*+, P*lac*UV5, pUC18 MCS, expression vector, Gm^R	[49]
pSMC21-*gfp*	Replicative plasmid, Km*R*, *gfp*	[46]
pME3087	Suicide plasmid, Tc^R	[47]
pUC19	Replicative plasmid, *lacZ*, Ap^R	Invitrogen®

Mucoid phenotype and swimming assays

Strains were plated on LB agar with 0.1 mM IPTG and incubated for 24 h at 28°C; the colonies were then examined for the mucoid phenotype. Swimming assays were performed as previously described [45].

Swarming killing assay

The protocol described by Alteri and colleagues [8] was used with minor modifications. Aliquots of 5 μl of a mixture of strains at a ratio of 5:1, MFE01 or mutants: MFN1032 containing plasmid pSMC21-*gfp* [46] were spotted onto LB 0.6% agar with 0.1 mM IPTG. The plates were incubated overnight at 28°C, and the entire swarm was collected, and serially diluted. Aliquots of 10 μl of each dilution were plated on LB agar supplemented with 200 μg kanamycin and colony forming units counted.

Motility inhibition

Overnight cultures were centrifuged at 3000 × *g*, for 5 minutes at room temperature. The cell pellets were collected on toothpicks which was used to stab 0.3% agar LB plates, with 0.1 mM IPTG; the plates were then incubated at 28°C overnight.

Antibacterial competition assay

Antibacterial competition assays in solid media were performed as described by Decoin and coworkers [31]. To ensure pSMC21-*gfp* stability (presence or absence) in our conditions, MFN1032 containing pSMC21-*gfp* was cultivated in LB medium containing kanamycin until $OD_{580\ nm}$ of 1. Serial dilutions were then plated on LB plates without Kanamycin during 24 h at 28°C. Colonies were scrapped and suspended in NaCl 9 g/L and adjusted to $OD5_{580\ nm}$ of 1. Serial dilutions were plated on selective (with kanamycin) and non-selective (without kanamycin) plates and counting. Statistics were done by pairwise strain comparisons (non-parametric Mann–Whitney-two tailed Test): no significant difference was observed between the two conditions (p-value >0.05, n = 6).

For *E.coli* growth inhibition, *Pseudomonas fluorescens* MFE01 and mutants were cultivated at 28°C in LB medium with shaking at 180 rpm overnight. *Escherichia coli DH5αmcr* transformed with pUC19 (*E.coli*pUC19), allowing blue detection on medium containing X-Gal, was cultivated at 37°C in LB with ampicillin (50 μg/ml) with shaking at 180 rpm overnight. The $OD_{580\ nm}$ was adjusted to 0.5 and the strains were mixed at a 1:1 ratio. A volume of 20 μl was spotted in LB agar plates supplemented with X-Gal (40 μg/ml) and incubated overnight at 28°C.

Disruption of the *hcp1* gene *in P. fluorescens* MFE01

MFE01Δ*hcp1* was generated by deletions in the 5′ (44 bp) and 3′ extremities (18 bp) of *hcp1*. 5′ and 3′ truncated *hcp1* was generated by PCR with the Hcp3F and Hcp4R primers (see Table 2). The resulting truncated *hcp1* construct was introduced between the *Eco*RI and *Hind*III sites (blunt-ended) of the transferable suicide plasmid pME3087 (6.9 Kb) [47]. The resulting plasmid, pME3087Δ*hcp1,* was verified by sequencing and was then transferred into MFE01 by biparental mating: *E. coli* S17-1 [48] containing pME3087Δ*hcp1* and recipient MFE01 cells were mixed and spotted onto LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The mating mixture was then suspended in 1 ml of sterile NaCl 9 g/L and 0.1 ml aliquots were spread on LB agar plates supplemented with tetracycline (12 μg/ml), to select for the presence of the integrated plasmid, and rifampicin (25 μg/ml), to kill the *E. coli* S17-1 donor bacteria and to ensure the selection of MFE01. The resulting *hcp1* mutant (containing two truncated *hcp1* genes) was named MFE01Δ*hcp1.*

Table 2 Oligonucleotides used for this study

Primer name	Primer sequence (5′-3′)
PFL_1449mucAF	ATAATAAGAGCTCATGAGTCGTGAAGCCCTGC
PFL_1449mucAR	ATAATAATCTAGATTAGCGGTTTTCCAGGCTTG
Hcp1F	ATGGCAACACCAGCGTACATG
Hcp2R	TTAAACGACTGGAGCACGCCA
Hcp3F	CCTGATCACTGCCGGCGCTT
Hcp4R	ACGCCAGTCATCGGAACCCG
muta1tssC	CTGAGACTCCAGTAGCCAAG
muta2tssC	AAGCTTTCCAGACCGAAGAAATACTTCGTGGGT CCAGGTGAT
muta3tssC	ATCACCTGGACCCACGAAGTATGAAGGCTTCAT CTCCCTGAC
muta4tssC	ATGTCATTGAGATCGGGCAA

Disruption of the *hcp2* gene in *P. fluorescens* MFE01Δ*hcp1* and disruption of the *tssC* gene in *P. fluorescens* MFE01

A markerless *hcp2* mutation was introduced into MFE01Δ*hcp1* strain by the protocol described by Decoin and co-workers [31]. The resulting strain was named MFE01Δ*hcp1*Δ*hcp2.* The same protocol with PCR modifications was used to introduce a markerless *tssC* mutation into MFE01 strain. This *tssC* deletion was achieved by PCR with the muta1tssC and muta2tssC primers (<650 bp product) or the muta3tssC and muta4tssC primers (<650 bp product) (Table 2). The PCR products obtained corresponded to the upstream and downstream parts, respectively, of the *tssC* gene of MFE01, each carrying an overlapping sequence at the end. PCR parameters were as follows: annealing temperature, 62°C, extension time, 45 s; 35 cycles. A third PCR was then carried out in which the overlapping sequences of the two first products were hybridized together allowing the *tssC* deletion after PCR with the muta1tssC and muta4tssC primers. The PCR parameters were as follows: annealing temperature, 62°C; extension time, 1 m 45 s and 35 cycles. The mutant containing the *tssC* deletion was verified by DNA sequencing and named MFE01Δ*tssC.*

Heterologous expression of *mucA* in MFE01

The *mucA* (PFL_1449) sequence was amplified with the PFL_1449mucAF and PFL_1449mucAR primers (Table 2) by standard PCR from genomic DNA from *P. protegens* Pf-5. The PCR conditions were as follows: an annealing temperature of 64°C, an extension time of 30 s and 25 cycles. The polymerase used was Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The PCR product was digested with *Sac*I (NEB) and *Xba*I (NEB) and ligated into pPSV35 [49] digested with the same enzymes. *E. coli* was

transformed with the ligation product and the resulting plasmid was checked by PCR. Fresh MFE01 colonies were washed twice in cold sterile distilled water and transformed with 5 μl of plasmid DNA by electroporation in 1 mm cuvette at 1.8 kV (Savant electroporater). LB was then added and the mix incubated for 1 h at 28°C with shaking (180 rpm). The samples were then plated on LB agar supplemented with gentamicin and with 0.1 mM IPTG.

Insertion of the *hcp1* gene into pPSV35 and construction of strain MFE01Δ*hcp1*+*hcp1*

The *hcp1* gene was amplified from the *P. fluorescens* MFE01 genome with the Hcp1F and Hcp2R primers (Table 2). The PCR conditions were as follows: an annealing temperature of 59°C, an extension time of 30 s and 25 cycles. The polymerase used was the Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The amplified fragments were inserted into the pPSV35 shuttle vector at *Sma*I site by blunt-end ligation, and the resulting pPSV35-*hcp1* was used to transform *E. coli DH5αmcr* cells by electroporation. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and checked by PCR and asymmetric digestion with *BamHI* (NEB) to verify the orientation of the insert. MFE01Δ*hcp1* was transformed with pPSV35-*hcp1* by electroporation as described in the section "Heterologous expression of *mucA* in MFE01". The resulting strain was called MFE01Δ*hcp1*+*hcp1*.

Preparation and purification of extracellular matrix (ECM) containing exopolysaccharides (EPS)

Strains were tested for EPS production on LB agar at 28°C. ECM was extracted as described by Dignac and colleagues with modifications [50]. Biomass was harvested and suspended in NaCl 9 g/L then sonicated at 37 Watts for 30 sec on ice and centrifuged (20,000 × *g* for 30 min). Clear supernatants were collected and three volumes of ice-cold ethanol were added; the samples were incubated for 24 h at 4°C, and EPS were collected by centrifugation (7000 × *g*, 30 min). The EPS-containing pellets were resuspended in water and lyophilised.

Analysis of the monosaccharide composition of EPS by gas chromatography – flame ionization

Lyophilised EPS were hydrolysed by treatment with 2M trifluoroacetic acid for 2 hours at 110°C. Monosaccharides were then derivatised: methanol-1M HCl (Supelco) was added and the samples incubated at 80°C overnight; then a mix of hexamethyldisiloxan:trimethyldisiloxan: pyridine (3:1:9, Supelco) was added and the samples incubated at 110°C for 20 minutes. The resulting derivatives were dried then dissolved in 1 ml of cyclohexane and injected into the 3800 GC system equipped with a CP-Sil5-CB column (Agilent Technologies). Elution was performed with the following gradient of temperature: 120°C to 160°C at a rate of 10°C per minute, 160°C to 220°C at a rate of 1.5°C per minute, 220°C to 280°C at a rate of 20°C per minute. Quantification was based on the internal standard and response factor determined previously for each monosaccharide.

Biofilm formation

Pure culture biofilms were grown in continuous-culture three-channel flow cells (channel dimensions, 1 by 4 by 40 mm). The system was assembled and prepared as follows: system sterilization during 4 h with bleach at 1.2% and rinsing with sterile NaCl 9 g/L. Before flow chamber inoculation, LB medium was injected into the system at 28°C. Overnight cultures were centrifuged at 8 000 × g during 5 min at room temperature. Pellets were recovered and washed twice with 2 mL of sterilized physiological water. Channels were inoculated with 1 mL of pure bacterial suspension at $DO_{580}nm = 0.1$. Bacteria were allowed to attach to the glass surface (microscope coverslip, VWR International, Fontenay sous Bois, France) during 2 h at 28°C under static conditions. Biofilm growth was then performed under a constant flow of LB medium with antibiotics at appropriate concentration if necessary (Wakson Marlow 205S, 2.5 mL/h) for 48 h at 28°C.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analyses

Microscopic observations were performed with a LSM 710 system, Zeiss, Germany by using a 63x oil immersion objective. Biofilms were observed after a 15 min incubation with 5 μM Syto 9® green fluorescent nucleic acid stain (life technologies) (excitation and emission λ, 488 nm and 510 nm, respectively). Biofilm stacks were analysed with COMSTAT software. The calculated parameter was the biovolume, which is the volume of bacteria (in μm^3) per μm^2 of glass surface. The results were the mean of at least five independent experiments.

Mass spectrometry analysis

Mass spectroscopy (MS) analyses were performed with a MALDI-TOF AutoflexIII (Brucker) in positive ion mode as described by Barbey *et al.* [51]. Statistical analyses of the sequences involved determining the probability based on Mowse score with MASCOT software (peptide tolerance = 100 ppm and mass values = MH+). A *p*-value of less than 0.05 was considered significant. The criteria used to accept a protein identification based on peptide mass fingerprinting (PMF) data included a score probability greater than a score threshold defined by MASCOT software.

Statistical analysis

Non-parametric Mann–Whitney Tests (two tailed) with GraphPad Prism version 6.0 (La Jolla, CA) were used for statistical analyses. A p-value <0.05 was considered to be statistically significant.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

VD carried out the assays with the help of MG and CB and participated in the design of the experiments and writing of the manuscript. AM designed the study, wrote the manuscript and analysed most of the data. CDP and FL were involved in ECM analysis. NO and MF were involved in scientific discussions during the design of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by a GRR CBS Sesa grant from the Région Haute-Normandie and FEDER funds. We are grateful to Josette Guérillon and Gaëlle Rossignol, who initiated T6SS research in the LMSM lab. We also thank Alex Edelman and Awa N'Diaye Renoult for linguistic support.

Author details

[1]LMSM, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Normandie Université, EA 4312, IRIB, Université de Rouen, IUT d'Evreux, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France. [2]GlycoMEV, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, Normandie Université, EA 4358, Université de Rouen, Faculté des sciences, Batiment 20 Gadeau de Kerville, IRIB 76820 Mont Saint-Aignan, France.

Received: 3 July 2014 Accepted: 11 March 2015
Published online: 26 March 2015

References

1. Jani AJ, Cotter PA. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. Cell Host Microbe. 2010;8(1):2–6.
2. Records AR. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. Mol Plant Microbe Interact. 2011;24(7):751–7.
3. Basler M, Mekalanos JJ. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. Science. 2012;337(6096):815.
4. Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, Trinidad RR, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host Microbe. 2010;7(1):25–37.
5. Murdoch SL, Trunk K, English G, Fritsch MJ, Pourkarimi E, Coulthurst SJ. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. J Bacteriol. 2011;193(21):6057–69.
6. Brunet YR, Espinosa L, Harchouni S, Mignot T, Cascales E. Imaging type VI secretion-mediated bacterial killing. Cell Rep. 2013;3(1):36–41.
7. Gibbs KA, Urbanowski ML, Greenberg EP. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. Science. 2008;321(5886):256–9.
8. Alteri CJ, Himpsl SD, Pickens SR, Lindner JR, Zora JS, Miller JE, et al. Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. PLoS Pathog. 2013;9(9):e1003608.
9. Aschtgen MS, Gavioli M, Dessen A, Lloubes R, Cascales E. The SciZ protein anchors the enteroaggregative *Escherichia coli* Type VI secretion system to the cell wall. Mol Microbiol. 2010;75(4):886–99.
10. Aschtgen MS, Thomas MS, Cascales E. Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP… what else? Virulence. 2010;1(6):535–40.
11. Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. Curr Opin Microbiol. 2009;12(1):11–7.
12. Silverman JM, Agnello DM, Zheng H, Andrews BT, Li M, Catalano CE, et al. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. Mol Cell. 2013;51(5):584–93.
13. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. Dev Cell. 2004;7(5):745–54.
14. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. Science. 2006;312(5779):1526–30.
15. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(1):171–6.
16. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. Environ Microbiol. 2011;13(12):3128–38.
17. Hassan KA, Johnson A, Shaffer BT, Ren Q, Kidarsa TA, Elbourne LD, et al. Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. Environ Microbiol. 2010;12(4):899–915.
18. Records AR, Gross DC. Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. J Bacteriol. 2010;192(14):3584–96.
19. Jacques M, Marrie TJ, Costerton JW. Review: Microbial colonization of prosthetic devices. Microb Ecol. 1987;13(3):173–91.
20. Terry JM, Pina SE, Mattingly SJ. Role of energy metabolism in conversion of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to the mucoid phenotype. Infect Immun. 1992;60(4):1329–35.
21. Wood LF, Leech AJ, Ohman DE. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. Mol Microbiol. 2006;62(2):412–26.
22. Ramsey DM, Baynham PJ, Wozniak DJ. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ to sites upstream of the algZ promoter leads to repression of transcription. J Bacteriol. 2005;187(13):4430–43.
23. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2010;5(11):1663–74.
24. Pugashetti BK, Metzger Jr HM, Vadas L, Feingold DS. Phenotypic differences among clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Clin Microbiol. 1982;16(4):686–91.
25. Wiens JR, Vasil AI, Schurr MJ, Vasil ML. Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. MBio. 2014;5(1):e01010–3.
26. Rao J, Damron FH, Basler M, Digiandomenico A, Sherman NE, Fox JW, et al. Comparisons of two proteomic analyses of non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a cystic fibrosis patient. Front Microbiol. 2011;2:162.
27. Unterweger D, Kitaoka M, Miyata ST, Bachmann V, Brooks TM, Moloney J, et al. Constitutive type VI secretion system expression gives *Vibrio cholerae* intra- and interspecific competitive advantages. PLoS One. 2012;7(10):e48320.
28. Fett WF, Wells JM, Cescutti P, Wijey C. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent pseudomonads associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. Appl Environ Microbiol. 1995;61(2):513–7.
29. Scanlan PD, Buckling A. Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Isme J. 2012;6(6):1148–58.
30. Muhammadi AN. Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. Curr Genomics. 2007;8(3):191–202.
31. Decoin V, Barbey C, Bergeau D, Latour X, Feuilloley MG, Orange N, et al. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. PLoS One. 2014;9(2):e89411.
32. Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairoir-Poc C, Chevalier S, et al. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. Int J Mol Sci. 2013;14(6):12186–204.
33. Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, et al. Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. Can J Microbiol. 2008;54(1):19–27.
34. Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GS, Mavrodi DV, et al. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nat Biotechnol. 2005;23(7):873–8.
35. Kitaoka M, Miyata ST, Brooks TM, Unterweger D, Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2011;193(23):6471–82.
36. Miyata ST, Kitaoka M, Brooks TM, McAuley SB, Pukatzki S. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. Infect Immun. 2011;79(7):2941–9.

37. Pulcrano G, Iula DV, Raia V, Rossano F, Catania MR. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. New Microbiol. 2012;35(3):295–305.
38. Tart AH, Wolfgang MC, Wozniak DJ. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. J Bacteriol. 2005;187(23):7955–62.
39. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol. 2006;4(11):811–25.
40. Das S, Chakrabortty A, Banerjee R, Chaudhuri K. Involvement of in vivo induced *icmF* gene of *Vibrio cholerae* in motility, adherence to epithelial cells, and conjugation frequency. Biochem Biophys Res Commun. 2002;295(4):922–8.
41. Hilbi H, Segal G, Shuman HA. Icm/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol. 2001;42(3):603–17.
42. Watarai M, Derre I, Kirby J, Growney JD, Dietrich WF, Isberg RR. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. J Exp Med. 2001;194(8):1081–96.
43. de Pace F, Boldrin De Paiva J, Nakazato G, Lancellotti M, Sircili MP, Guedes Stehling E, et al. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. Microbiology. 2011;157(10):2954–62.
44. Rossignol G, Sperandio D, Guerillon J, Duclairoir Poc C, Soum-Soutera E, Orange N, et al. Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032. Res Microbiol. 2009;160(5):337–44.
45. Rossignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley MG, et al. Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. BMC Microbiol. 2008;8:189.
46. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. 2003;185(3):1027–36.
47. Schnider U, Keel C, Voisard C, Defago G, Haas D. Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. Appl Environ Microbiol. 1995;61(11):3856–64.
48. Simon R, Pehle A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechology. 1983;1:784–90.
49. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(22):8006–11.
50. Dignac MF, Urbain V, Rybacki D, Bruchet A, Snidaro D, Scribe P. Chemical description of extracellular polymers: implication on activates sludge floc structure. Wat sci tech. 1998;8–9:45–53.
51. Barbey C, Crepin A, Cirou A, Budin-Verneuil A, Orange N, Feuilloley M, et al. Catabolic pathway of gamma-caprolactone in the biocontrol agent *Rhodococcus erythropolis*. J Proteome Res. 2012;11(1):206–16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

II. Article 2

Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation

Mathias Gallique, Victorien Decoin, Corinne Barbey, Thibaut Rosay, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Annabelle Merieau

Contexte et importance de l'article 2 :

Nous avons préalablement montré que la protéine Hcp2 participait à l'activité antibactérienne (Decoin et al., 2014) alors que la protéine Hcp1 était nécessaire à l'immobilisation de bactéries compétitrices (Decoin et al., 2015). Durant cette période, l'annotation du génome de MFE01 a révélé la présence d'un autre gène codant pour une autre protéine Hcp, nommée Hcp3. L'étude de l'environnement du gène *hcp3* nous a permis d'identifier des gènes codant pour deux enzymes putatives responsables de la dégradation du peptidoglycane, annotées NUDIX hydrolase (probable Tge) et amidase (probable Tae) mais aussi un gène codant pour un adaptateur (noté Tec3, pour Toxin effector chaperone associated to Hcp3), un gène *vgrG3* ainsi que d'autres gènes encore non décrits. Cette étude *in silico* nous a suggéré que la protéine Hcp3 était donc potentiellement, elle-aussi, impliquée dans l'activité antibactérienne par l'intermédiaire d'au moins deux toxines. Dans l'environnement, on estime que les bactéries favorisent l'état sessile et forment un biofilm, protégeant alors les bactéries de différents stress environnementaux. Il nous est donc apparu primordial d'étudier l'activité antibactérienne de MFE01 au sein d'un biofilm multi-espèces.

L'activité antibactérienne de MFE01 et de ses mutants en condition solide a donc été testée et nous avons mis en évidence que l'activité antibactérienne associée à Hcp3 dépend de la bactérie cible. En effet, certaines souches sont plus résistantes que d'autres, peut-être en fonction de la présence d'une immunité croisée entre MFE01 et la bactérie cible. C'est-à-dire que si cette dernière possède une paire toxine-antitoxine homologue, la bactérie produit également une protéine d'immunité qui lui confère une résistance face aux toxines de MFE01, diminuant ainsi l'efficacité de l'activité antibactérienne exercée par MFE01. Nous avons ensuite étudié l'activité anti-

biofilm de MFE01 sur une autre souche de *P. fluorescens,* la souche MFP05 isolée de la flore cutanée humaine, au sein d'un biofilm mixte. La population de MFP05 est estimée selon la fluorescence émise par cette souche (produisant la protéine GFP). MFE01 inhibe la formation de biofilm de la souche compétitrice MFP05 (peu de fluorescence). De manière surprenante, la mutation individuelle des gènes *hcp1*, *hcp2* et *hcp3* n'affecte pas cette inhibition de formation. Cependant, lorsque le SST6 entier de MFE01 est non fonctionnel, comme c'est le cas chez le mutant MFE01Δ*tssC*, la souche MFP05 forme un biofilm et la population est aussi importante que lorsque cette souche est seule (MFE01Δ*tssC* est alors incapable d'inhiber la formation de biofilm de la souche MFP05). Plusieurs hypothèses ont pu être formulées : (i) soit les trois protéines Hcp sont essentielles dans cette inhibition, (ii) soit un autre facteur dépendant du SST6, mais ne dépendant directement d'aucune des protéines Hcp étudiées, est responsable de l'inhibition de la formation de biofilm de la souche compétitrice, (iii) soit le mutant MFE01Δ*tssC* n'est plus compétitif suite à l'incapacité de former un biofilm et ainsi de persister au sein de ce biofilm multi-espèces. Suite à ces résultats, nous nous sommes alors intéressés à l'implication des différents constituants du SST6, à savoir les protéines Hcp1, Hcp2, Hcp3 ainsi que la machinerie globale du SST6 (*via* MFE01Δ*tssC*) sur la formation de biofilm par MFE01. La mutation des gènes *hcp1*, *hcp2* et *hcp3* n'impacte pas le biovolume du biofilm (densité bactérienne) mais modifie la maturation de biofilm. En effet, le biofilm de la souche sauvage est très hétérogène et forme des structures comparables à de fines « chevelures » alors que celui du mutant Hcp3 par exemple est très homogène. Lorsque le SST6 est non fonctionnel, ce qui est le cas pour MFE01Δ*tssC,* ceci induit une incapacité à former un biofilm. L'introduction *en trans* du gène *tssC* chez ce mutant améliore légèrement la formation de biofilm. La mutation *tssC* n'influant en aucun cas la présence du complexe membranaire chez ce mutant, l'incapacité de formation de biofilm chez le mutant MFE01Δ*tssC* ne peut s'expliquer par le rôle exercé par ce complexe membranaire. Par contre, MFE01, comme bien d'autres souches de *P. fluorescens*, ne produit pas de molécules signal du quorum sensing typiques de *P. aeruginosa*. Notre hypothèse est que le SST6 est impliqué dans la communication bactérienne et permet un comportement social, typique des bactéries présentes au sein d'un biofilm. On peut donc envisager que le mutant MFE01Δ*tssC* soit incapable de coordonner un mouvement collectif expliquant ainsi l'incapacité à former un biofilm.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation

Mathias Gallique[1], Victorien Decoin[1], Corinne Barbey[1,2], Thibaut Rosay[1], Marc G. J. Feuilloley[1], Nicole Orange[1], Annabelle Merieau[1]*

1 LMSM, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA 4312, IUT d'Evreux, Université de Rouen, Normandy University, Evreux, France, **2** Seeds Innovation Protection Research and Environment (SIPRE), Achicourt, France

* annabelle.merieau@univ-rouen.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MGJ, Orange N, et al. (2017) Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. PLoS ONE 12(1): e0170770. doi:10.1371/journal.pone.0170770

Editor: Eric Cascales, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, FRANCE

Received: November 7, 2016

Accepted: January 10, 2017

Published: January 23, 2017

Copyright: © 2017 Gallique et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequences are available from the GenBank database. Accession number are indicated in the paper.

Funding: This study was supported by a GRR CBS Sesa grant from the Région Haute-Normandie, GEA (grand Evreux agglomeration) funds, and FEDER funds.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Type VI secretion systems (T6SSs) are widespread in Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas*. These macromolecular machineries inject toxins directly into prokaryotic or eukaryotic prey cells. Hcp proteins are structural components of the extracellular part of this machinery. We recently reported that MFE01, an avirulent strain of *Pseudomonas fluorescens*, possesses at least two *hcp* genes, *hcp1* and *hcp2*, encoding proteins playing important roles in interbacterial interactions. Indeed, *P. fluorescens* MFE01 can immobilise and kill diverse bacteria of various origins through the action of the Hcp1 or Hcp2 proteins of the T6SS. We show here that another Hcp protein, Hcp3, is involved in killing prey cells during co-culture on solid medium. Even after the mutation of *hcp1*, *hcp2*, or *hcp3*, MFE01 impaired biofilm formation by MFP05, a *P. fluorescens* strain isolated from human skin. These mutations did not reduce *P. fluorescens* MFE01 biofilm formation, but the three Hcp proteins were required for the completion of biofilm maturation. Moreover, a mutant with a disruption of one of the unique core component genes, MFE01Δ*tssC*, was unable to produce its own biofilm or inhibit MFP05 biofilm formation. Finally, MFE01 did not produce detectable N-acyl-homoserine lactones for quorum sensing, a phenomenon reported for many other *P. fluorescens* strains. Our results suggest a role for the T6SS in communication between bacterial cells, in this strain, under biofilm conditions.

Introduction

The type VI secretion system (T6SS) is a widespread macromolecular machinery in Gram-negative bacteria [1]. This multiprotein complex delivers effectors into eukaryotic and/or bacterial cells [1–5]. This secretion system has a structure similar to that of the contractile tails of bacteriophages [6,7]. Hcp (hemolysin-coregulated protein) and VgrG (valine-glycine repeat protein G) are structural proteins of this machinery with structural similarities to the gp19 and gp5-gp27 proteins of bacteriophage T4, respectively [8,9]. The structural homologue of the phage tube is built from rings of Hcp hexamers with a tip complex composed of VgrG trimers, Paar protein,

and effectors [10–15]. This tube is ejected by the contraction of a tubular sheath consisting of the conserved T6SS-associated cytoplasmic proteins, TssB and TssC [16–19]. Hcp proteins appear to be directly involved in effector recognition [13,20–23], acting in synergy with VgrG proteins. Moreover, many VgrG proteins possessing a variety of effector domains at their C-termini, are effectors as well as structural components [4].

The T6SS is associated with several phenotypes, including biofilm formation [24]. In natural, industrial, and clinical environments, bacteria live predominantly in biofilms [25]. Biofilms act as reservoirs of infection, protecting the bacteria they contain against diverse external aggressions. They contribute to many problems, particularly in hospitals, where they may form on catheters or implants (e.g. hip prostheses) [26]. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms also aggravate bacterial infections in a human chronic wound mouse model [27]. The transition between the planktonic and biofilm states is linked to the production of adhesins and extracellular matrix (ECM) [28]. Adhesins, including flagellin, play a crucial role, by fixing the bacteria to the support, allowing biofilm formation to occur [28–30]. The ECM surrounding the bacteria may consist of exopolysaccharides (EPS), proteins, and DNA [31]. EPS act as adhesins on inert and living surfaces, promoting biofilm and microcolony formation. They are also involved in protection against antibacterial compounds [32–34]. In pseudomonads, quorum-sensing regulates the production of extracellular DNA, lectins, and biosurfactants, all of which play a role in biofilm formation [25].

We previously described *P. fluorescens* MFE01, a strain that secretes large amounts of Hcp proteins (mainly Hcp2 proteins) into the culture medium [35]. MFE01 is nonvirulent against various eukaryotic cell models, but has antibacterial activity against a wide range of competitor bacteria, including rhizobacteria and clinical bacteria [35]. The Hcp2 protein has been directly implicated in the killing activity of MFE01. Another Hcp protein, Hcp1, is encoded by *hcp1*, mutation of which has pleiotropic effects on the phenotype of MFE01, affecting its mucoidy and motility [36]. However, *hcp1* mutation has no effect on bacterial competition during incubation on solid medium. Moreover, MFE01 and its *hcp2* mutant can sequester a clinical *P. fluorescens* strain, MFN1032, under swimming and swarming conditions, whereas the *hcp1* mutant of MFE01 cannot. Hcp1 appears to reduce the motility of prey cells, to facilitate killing by Hcp2 [36].

We carried out a genomic analysis to investigate the genetic determinants of the T6SS of MFE01. This analysis revealed the existence of a unique T6SS core component locus and another orphan *hcp* gene, *hcp3*. We investigated the possible role of the T6SS in MFE01 biofilm formation and bacterial competition. We also studied the T6SS-mediated antibacterial activity of *P. fluorescens* MFE01 and biofilm formation by a cutaneous isolate of *P. fluorescens* in contact with MFE01.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

All the strains and plasmids used are listed in Table 1. All bacterial strains were grown in LB (Luria Bertani) medium with shaking (180 rpm). *P. fluorescens* strains were grown at 28˚C, *Pectobacterium atrosepticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Chromobacterium violaceum* were cultured at 25˚C, and *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* strains were grown at 37˚C. The medium was supplemented with antibiotics, as appropriate: kanamycin (Km) at 100 μg/mL (*P. fluorescens*) or 200 μg/mL (*P. aeruginosa*); tetracycline (Tc) at 15 μg/mL; gentamicin (Gt) at 50 μg/mL or 100 μg/mL (*P. fluorescens* in liquid and solid media, respectively).

Construction of the MFE01Δ*hcp3* mutant

Gene knockout was performed, as previously described [36], with the suicide plasmid pAKE604 [37]. In-frame *hcp3* disruption, due to the deletion of a central region of about 300 bp, was achieved by PCR with the muta1-hcp3-F and muta2-hcp3-R primers (product of about 650 bp)

Table 1. Plasmids and strains used in this study.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Reference/ source
P. fluorescens		
MFE01	Air isolate, Rif^R	[35]
MFE01Δ*hcp2*	MFE01 with early stop codon in *hcp2*	[35]
MFE01Δ*hcp2Chcp2*	MFE01Δ*hcp2* with wild type *hcp2* gene reintroduced in its original chromosomal location (previously named MFE01Δ*hcp2.R)*	[35]
MFE01Δ*hcp1*	MFE01 with *hcp1* disruption	[36]
MFE01Δ*hcp3*	MFE01 with early stop codon in *hcp3*	This work
MFE01Δ*hcp3*+EV	MFE01Δ*hcp3* with empty pPSV35	This work
MFE01Δ*hcp3+hcp3*	MFE01Δ*hcp3* with pPSV35 containing *hcp3*	This work
MFE01Δ*tssC*	MFE01 with early stop codon in *tssC*	[36]
MFE01Δ*tssC+tssC*	MFE01Δ*tssC* with pPSV35 containing *tssC*	[36]
MFE01Δ*tssC*+EV	MFE01Δ*tssC* with empty pPSV35	This work
MFN1032	Clinical strain	[50]
MFP05	Skin isolate	[52]
MFP05-gfp	MFP05 with pSMC2.1-gfp	[35]
P. aeruginosa H103	Prototrophic derivative of PAO1	[51]
***Agrobacterium tumefaciens* NTI**	Strain with plasmid pZLR4 carrying *traR* and a *traG*::*lacZ* reporter fusion from pTiC58. ß–galactosidase producer in contact with C6- to C12-N-Acyl-Homoserine-Lactones (AHLs).	[43]
Pectobacterium atrosepticum 6276	Isolate from *Solanum tuberosum*, C8-AHLs producer	[44]
Pectobacterium atrosepticum 6276 Δexpl	*Pectobacterium atrosepticum* 6276 with mutation of the N-Acyl-Homoserine-Lactones (AHLs) synthetase gene	[45]
***Chromobacterium violaceum* CV026**	Mini-Tn5 mutant of *Chromobacterium violaceum*. Violacein producer in contact with C4- to C8-AHLs	[42]
***E.coli* S17.1**	RP4-2-Tc::Mu, *aph*::Tn7, *recA*, Sm^R, donor strain for conjugation	[38]
Vectors		
pPSV35	*P. aeruginosa oriV*, *lacIq*, *mob+*, P*lac*UV5, pUC18 MCS, expression vector, Gm^R	[39]
pSMC2.1-gfp	Replicative plasmid, Km^R, *gfp*	[41]
pAKE604	Ap^R, Km^R, oriT *lacZ*, *sacB*	[37]

doi:10.1371/journal.pone.0170770.t001

or the muta3-hcp3-F and muta4-hcp3-R primers (product of about 600 bp) (Table 2). The PCR products obtained corresponded to the upstream and downstream parts of the *hcp3* gene of MFE01, respectively, each carrying an overlapping sequence at the end. The PCR parameters were as follows: 30 cycles with annealing at 61˚C, and extension for 45 s. A third PCR was then carried out with the muta1-hcp3-F and muta4-hcp3-R primers. The PCR parameters were as follows: 35 cycles with annealing at 61˚C and extension for 1 min 45 s. The resulting disrupted *hcp3* was inserted into the pAKE604 suicide vector digested with the blunt-ended restriction enzyme *Sma*I, to which it was ligated with T4 DNA ligase (NEB). This construct was verified by

Table 2. Oligonucleotides used for this study.

Primer name	Primer sequence (54'-3')
Muta1-hcp3-F	TCGACCACAACCATACAACA
Muta2-hcp3-R	ATACTTCGTGGGTCCAGGTGATAAGTCCACTTCAGCTACCG
Muta3-hcp3-F	ATCACCTGGACCCACGAAGTATCACCATGATCTTGTCTTCGC
Muta4-hcp3-R	TGGATCAGCAAGTCCAGATC
hcp3-EcoRI-F	TAATAAGAATTCACTTCATAACTAAGGAGCCA
hcp3-XbaI-R	TAATAATCTAGAGTCGGTCATGCTCAGTTC

doi:10.1371/journal.pone.0170770.t002

sequencing and then introduced into *E. coli* strain S17-1 [38]. The recombinant plasmid was transferred by biparental mating: the recipient strain MFE01 and the S17-1 strain containing pAKE604Δ*hcp3* were mixed in equal amounts, spotted onto LB agar and incubated at 37˚C overnight. The resulting colonies were resuspended in 1 mL sterile saline and 0.1 mL of the cell suspension was spread on LB agar plates supplemented with 50 μg/mL rifampicin (to select MFE01 and kill *E. coli* S17-1) and 200 μg/mL kanamycin (to select cells containing the recombinant plasmid), which were then incubated at 28˚C for 48 h. The resulting colonies were isolated and plated on LB agar plates supplemented with 10% sucrose to select for a second homologous recombination event. The resulting *hcp3* mutant was verified by DNA sequencing and named MFE01Δ*hcp3*.

Insertion of the *hcp3* gene into pPSV35 and the construction of strain MFE01Δ*hcp3*+*hcp3*

The *hcp3* gene was amplified from *P. fluorescens* strain MFE01 with the hcp3-EcoRI-F and hcp3-XbaI-R primers (Table 2). The PCR conditions were as follows: 30 cycles with an annealing temperature of 58˚C and an extension time of 40 s. The Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB) was used. The amplified fragment and the pPSV35 shuttle vector [39] were digested with *Eco*RI and *Xba*I (NEB) to generate cohesive ends, and the *hcp3* gene was inserted into the vector by DNA ligase mediated ligation (NEB). The resulting plasmid, pPSV35-*hcp3*, was used to transform *E. coli* Top10® cells by thermal shock. Plasmid DNA was isolated with the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) and verified by PCR with primers binding to the plasmid. Fresh MFE01Δ*hcp3* colonies were obtained and washed twice with 1 mL cold sterile water before transformation with 5 μL pPSV35-*hcp3* by electroporation in 1 mm electroporation cells at 1.8 KV for 5 milliseconds (Savant GTF100 Gene Transformer). LB was added and the mixture was incubated at 28˚C for 1 h with shaking (180 rpm). Transformed bacteria were then selected by plating on LB agar supplemented with gentamycin and IPTG.

Biofilm formation

Biofilms derived from pure cultures and co-cultures were grown in three-channel flow cells for continuous culture (channel dimensions, 1 by 4 by 40 mm). The system was assembled and prepared as follows: sterilisation with 1.2% bleach for 4 h, followed by rinsing in sterile saline. Before flow chamber inoculation, LB medium was injected into the system at 28˚C. Overnight cultures were centrifuged at 8,000 x *g* for 5 min at room temperature. Pellets were recovered and washed twice in 2 mL sterile saline. For pure-culture biofilm assays, the channels were inoculated with 1 mL pure bacterial suspension at an OD_{580} of 0.1. For co-culture biofilms, MFE01 or mutant suspensions at an OD_{580} of 0.1 were mixed with a bacterial suspension of the competitor (MFP05 strain carrying pSMC2.1-gfp plasmid) at an OD_{580} of 0.1, in a 5:1 ratio. The channel was inoculated by injection of the mixture (1 mL). Bacteria were allowed to attach to the glass surface (microscope coverslip, VWR International, Fontenay sous Bois, France) for 2 h at 28˚C under static conditions. A biofilm was then allowed to grow under a constant flow (Wakson Marlow 205S, 2.5 mL/h) of LB medium, with antibiotics at the appropriate concentration if necessary, for 48 h at 28˚C. Bacteria were used with or without dilution to an OD_{580} of 0.1 in the MFE01 supernatant, to investigate the potential effects of molecules secreted by *P. fluorescens* MFE01 on biofilm formation by *P. fluorescens* MFP05. This experiment was carried out as described by Dheilly *et al.*, without modification [40].

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analysis

Microscopy was performed with an LSM 710 system (Zeiss, Germany), using a 63x oil immersion objective. Co-culture biofilms were observed by monitoring the GFP fluorescence of

competitor MFP05 transformed with pSMC1-2 gfp [41] (excitation wavelength [λ], 488 nm; emission, 510 nm). Biofilm stacks were analysed with COMSTAT software. The calculated parameter was biovolume, defined as the volume of bacteria (in μm^3) per μm^2 of glass. In these conditions only MFP05 transformed with pSMC1-2 gfp were detected.

Biovolume of biofilms from pure cultures (MFE01 and derivatives) were observed and analysed with COMSTAT software after 15 min of incubation with 5 μM Syto 9® green fluorescent nucleic acid stain (Life Technologies; excitation at 488 nm and emission at 510 nm). The results are the means of at least five independent experiments.

Killing assay on solid medium

Killing assays on solid media were performed as described by Decoin *et al.* [35]. In brief, predator and prey bacteria were mixed at a 1:5 ratio unless otherwise stated. Bacteria were spotted on LB plates and incubated at 28˚C for 4 h. Bacteria were resuspended, diluted and plated on LB plates containing appropriate antibiotics for the specific selection of predator or prey.

The competitive index was calculated using the equation: (input attacker/input prey)/(output attacker/output prey).

In silico identification of T6SS loci

The genome of *P. fluorescens* MFE01 (Merieau, unpublished results) was screened for genes displaying sequence identity to those associated with the T6SS, by NCBI Blast (stand-alone) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). The sequences for the *tssA* to *tssM* genes of *P. fluorescens* strains, available from Pseudomonas.com (http://www.pseudomonas.com), were used as bait in Blast searches to identify homologues in the MFE01 genomic sequence (e-value $<10^{-3}$). The genome was also analysed with the SecReT6 (http://db-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/) "CDeasy" tool. Each putative T6SS ORF was subjected to phyre2 analysis (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/).

N-acyl-homoserine lactone (AHL) detection

Chromobacterium violaceum CV026 (CV026) [42] is a mini-Tn5 mutant in which violacein (a purple pigment) production can be restored by incubation with supernatants from the wild-type strain. In CV026, violacein production is inducible by AHL compounds with N-acyl side chains for four to eight carbons (C4-AHL to C8-AHL). This assay was performed by cross-streaking MFE01 against *C. violaceum* CV026 on LB plates, which were then incubated for 72 h at 28˚C.

Agrobacterium tumefaciens NTI [43] was used as a biosensor producing ß-galactosidase (generating a blue colour on X-gal plates) in response to AHLs with N-acyl side chains for six to twelve carbons (C6-AHL to C12-AHL). This assay was performed by cross-streaking MFE01 against *A. tumefaciens* NT1 on LB plates supplemented with X-Gal (40 μg/mL), which were then incubated for 72 h at 28˚C.

Pectobacterium atrosepticum 6276 [44] was used as a positive control for the biosensors. It produces C8-AHLs that activate *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* NT1 biosensors. *Pectobacterium atrosepticum 6276 Δexp1*, impaired in C8-AHL production, was included as a negative control [45].

Statistical analysis

Non-parametric Mann-Whitney tests (two tailed) with GraphPad Prism version 6.0 (La Jolla, CA) were used for statistical analyses. A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results and Discussion

The MFE01 strain has a single T6SS cluster and at least three *hcp* genes

We previously identified two *hcp* genes, *hcp1* and *hcp2*. The expression of *hcp2* contributes to the killing activity of MFE01 against many Gram-negative bacteria, whereas *hcp1* expression is involved in the immobilisation of prey cells. The competitor population was nevertheless reduced slightly by the double mutant, MFE01*Δhcp1Δhcp2*, suggesting the involvement of another factor in T6SS-mediated MFE01 killing activity [36].

Exhaustive studies of the MFE01 draft genome confirmed that it contained only one T6SS cluster. All the T6SS core component genes (*tssA* to *tssM*) were observed in classic synteny, except *tssD* genes (or *hcp*), which were distally located from other T6SS core genes, and *tssI* gene (or *vgrG*), which was present as two copies in opposite orientations (*vgrGc1* and *vgrGc2*), on either side of the cluster. This cluster contains six conserved T6SS-associated genes (*paar*, *sfa2*, *tagU*, *tagH*, *pppA*, and *ppkA*) and two predicted ORFs (*unknown1* and *unknown 2*) (Fig 1A). We identified a third orphan *hcp* gene, *hcp3*, during annotation of the MFE01 genome. The *hcp3* gene is co-localised with a *vgrG gene*, *vgrG3*, and several putative ORFs (Fig 1B). The first ORF downstream from *hcp3* encodes a putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases have been identified as T6SS effectors or Tae (Type 6 amidase effector), and are involved in antibacterial activity [46]. The next gene downstream, *duf2333*, belongs to a conserved but uncharacterised superfamily. The third gene encodes a putative NUDIX hydrolase. Duong-Ly *et al.* showed that a member of the NUDIX hydrolase family from *Streptococcus pneumonia*, UDP-X diphosphatase, hydrolysed UDP-N-acetylmuramic acid and UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine, two substrates for peptidoglycan construction *via* the Mur pathway [47]. This second putative toxin may be a new type of T6SS effector targeting substrates for peptidoglycan construction, although this remains to be confirmed. The next ORF is homologous to *sui1*, encoding a translation initiation factor [48]. A gene encoding a putative arginine decarboxylase was found upstream from *vgrG3*. The *tec3* gene, homologous to the *tec* gene described by Liang *et al.*, was identified downstream from *vgrG3*. Tec proteins (members of the DUF 4123 family) have been shown to act as chaperone proteins [49]. These results suggest that the *hcp3* cluster may be involved in the T6SS-mediated antibacterial activity of MFE01.

Hcp3-mediated T6SS killing activity is prey strain-dependent

We investigated the contribution of Hcp3 to competitor killing by co-culturing MFE01 or various MFE01 T6SS mutants and prey cells on a filter on solid medium for 4 h at 28˚C. The strain MFN1032 is a clinical isolate of *Pseudomonas fluorescens* [50]. The population of *P. fluorescens* MFN1032 prey cells was significantly smaller (4 log) when cultured with MFE01 than when cultured alone (Fig 2A). The size of the MFN1032 population did not differ significantly between co-cultures with MFE01 and co-cultures with MFE01*Δhcp1*. The MFE01*Δhcp2* mutant had significantly weaker antibacterial activity than MFE01 and MFE01*Δhcp1*. We detected no significant killing during co-culture with MFE01*ΔtssC*, indicating that the T6SS was responsible for the observed antibacterial activity. The MFE01*Δhcp3* mutant was less bactericidal than MFE01, but nevertheless significantly reduced the MFN1032 population. Hcp3 is thus responsible for some of the T6SS-mediated killing activities of MFE01 against MFN1032.

We investigated the predation of MFE01 on *Pseudomonas aeruginosa* H103 (Fig 2B) [51]. The results were similar to those obtained for MFN1032, except for co-culture with MFE01*Δhcp3*. The MFE01*Δhcp3* mutant had a similar level of killing activity to the wild-type MFE01 strain.

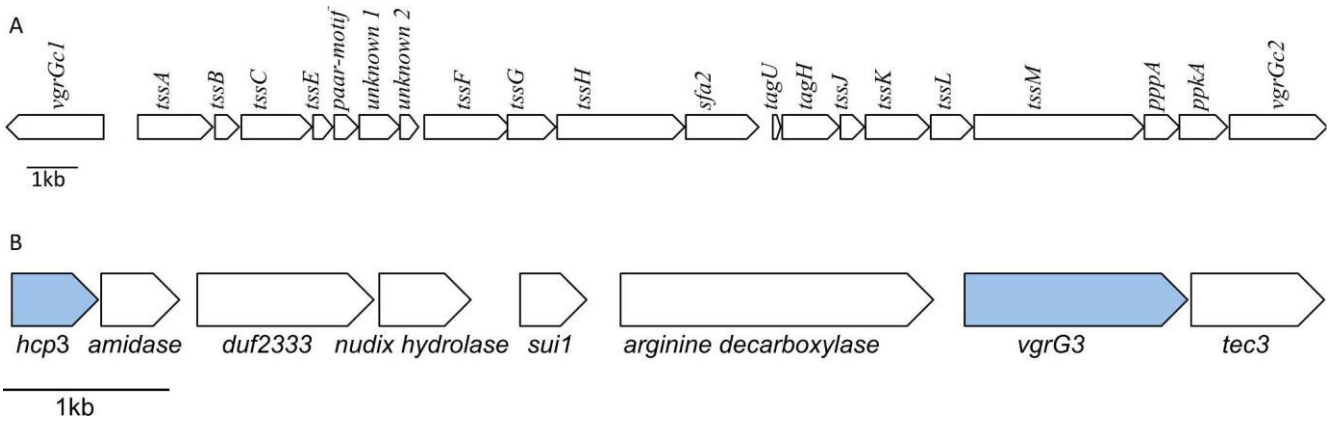


Fig 1. Genomic organisation of the T6SS core component locus and the *hcp3* locus in MFE01. A. Genomic organisation of the T6SS core component locus in MFE01. Genes are represented as arrows, indicating the direction of transcription. The sequences of the T6SS core component genes have been deposited in GenBank under the following accession numbers: *vgrGc1*: KX941475, *tssA*: KX941476, *tssB*: KX941477, *tssC*: KX941478, *tssE*: KX941479, *paar-motif*: KX941480, *unkown1*: KX907122, *unknown2*: KX941481, *tssF*: KX941482, *tssG*: KX941483, *tssH*: KX941484, *sfa2*: KX941485, *tagU*: KX941486, *tagH*: KX941487, *tssJ*: KX941488, *tssK*: KX941489, *tssL*: KX941490, *tssM*: KX941491, *pppA*: KX941492, *ppkA*: KX941493, *vgrGc2*: KX941494. **B. Genomic organisation of the *hcp3* locus.** Genes are represented as arrows, indicating the direction of transcription. The sequences of the *hcp3* locus genes have been deposited in GenBank under the following accession numbers: *hcp3*: KX941495, *vgrG3*: KX941496, *arginine-decarboxylase*: KX941497, *sui1*: KX941498, *nudix-hydrolase*: KX941499, *duf2333*: KX941500, *amidase*: KX941501, *tec3*: KX941502.

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g001

This result suggests that Hcp3 is not required for the killing of H103 mediated by the T6SS of MFE01.

In our previous studies, *P. fluorescens* strain MFP05, isolated from human skin, was killed on a solid surface by MFE01, and was the strain giving the highest assay sensitivity [36,52]. We studied the effect of *tssC* and *hcp3* mutations on this predation (Fig 2C). These mutations totally abolished MFE01 killing activity, which was partially restored by the reintroduction of *tssC* or *hcp3*. Thus, Hcp3 may be critical for the MFE01 T6SS-mediated killing of MFP05.

The involvement of T6SS in the killing activity was confirmed by analysis of competitive index (Fig 3). The MFE01 strain outcompeted MFP05, H103 and MFN1032 ($\log_{10}$ competitive index around -5). On the contrary, the MFE01*ΔtssC* mutant was unable to outcompeted the three prey strains ($\log_{10}$ competitive index around 0). Competitive index of MFE01*Δhcp3* indicated that Hcp3 is not responsible for the MFE01 T6SS-mediated killing of H103, in contrast to that was obtained for MFN1032 and MFP05.

MFE01 abolishes the formation of biofilms by competing bacteria during co-inoculation

During the first step of biofilm formation, bacteria must adhere to a solid surface [53]. MFE01 may kill competitor bacteria in two-species biofilms through the action of the T6SS during this adhesion step. We tested this hypothesis by incubating MFE01, MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp2*, MFE01Δ*hcp3*, *or* MFE01*ΔtssC* with MFP05 on a glass surface in flow chambers. Contact with MFE01 strongly reduced the biovolume of the MFP05 biofilm. By contrast, co-inoculation with MFE01*ΔtssC* did not affect MFP05 biofilm biovolume, which was similar to that obtained with MFP05 alone (Fig 4). Mutation of *hcp1*, *hcp2*, or *hcp3* did not significantly modify the reduction in MFP05 biofilm biovolume relative to co-inoculation with the wild-type MFE01 strain. These results suggest that the T6SS is involved in the decrease in MFP05 biofilm biovolume, but that none of the three *hcp* genes is indispensable for this competition. This result

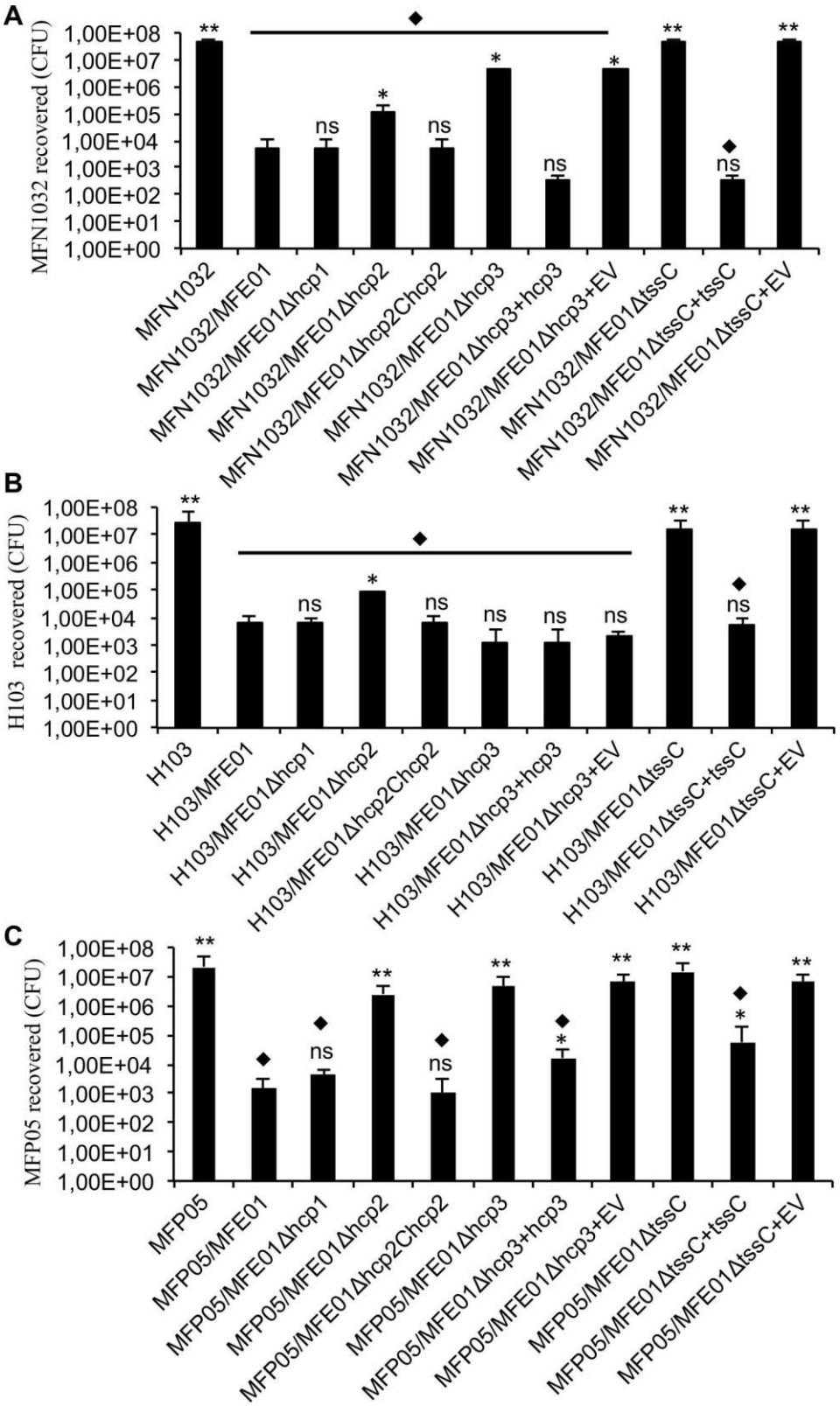

A
MFN1032 recovered (CFU)
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
1,00E+02
1,00E+01
1,00E+00
MFN1032
MFN1032/MFE01
MFN1032/MFE01Δhcp1
MFN1032/MFE01Δhcp2
MFN1032/MFE01Δhcp2Chcp2
MFN1032/MFE01Δhcp3
MFN1032/MFE01Δhcp3+hcp3
MFN1032/MFE01Δhcp3+EV
MFN1032/MFE01ΔtssC
MFN1032/MFE01ΔtssC+tssC
MFN1032/MFE01ΔtssC+EV
B
H103 recovered (CFU)
H103
H103/MFE01
H103/MFE01Δhcp1
H103/MFE01Δhcp2
H103/MFE01Δhcp2Chcp2
H103/MFE01Δhcp3
H103/MFE01Δhcp3+hcp3
H103/MFE01Δhcp3+EV
H103/MFE01ΔtssC
H103/MFE01ΔtssC+tssC
H103/MFE01ΔtssC+EV
C
MFP05 recovered (CFU)
MFP05
MFP05/MFE01
MFP05/MFE01Δhcp1
MFP05/MFE01Δhcp2
MFP05/MFE01Δhcp2Chcp2
MFP05/MFE01Δhcp3
MFP05/MFE01Δhcp3+hcp3
MFP05/MFE01Δhcp3+EV
MFP05/MFE01ΔtssC
MFP05/MFE01ΔtssC+tssC
MFP05/MFE01ΔtssC+EV

Fig 2. Killing activity of MFE01 and mutant strains against *P. fluorescens* MFN1032, *P. aeruginosa* H103, and *P. fluorescens* MFP05 during contact on solid media. Quantitative co-culture assays. **A.** Prey cells (MFN1032 carrying pSMC2.1 gfp) were cultured alone or mixed with *P. fluorescens* MFE01 or various MFE01 T6SS mutants in a 1:5 ratio. After incubation for 4 h at 28˚C, the MFN1032 colonies were counted ($n = 6$, the error bars represent the standard error of the mean). ** indicates a significant difference in the number of MFN1032 cfu (p-value < 0.01) relative to MFN1032 co-cultured with MFE01; * indicates a significant difference in the number of MFN1032 cfu (p-value < 0.05) relative to MFN1032 co-cultured with MFE01; ns indicates no significant difference. ♦ indicates a significant difference in the number of MFN1032 cfu (p-value < 0.05) relative to the MFN1032-alone control assay. EV means empty pPSV35 (plasmid control). **B.** Prey cells (*P. aeruginosa* H103 carrying pSMC2.1 gfp) were cultured alone or mixed with *P. fluorescens* MFE01 or various MFE01 T6SS mutants in a 1:5 ratio. After 4 h at 28˚C, H103 colonies were counted ($n = 6$, the error bars represent the standard error of the mean). ** indicates a significant difference in the number of H103 cfu (p-value < 0.01) relative to H103 co-cultured with MFE01; * indicates a significant difference in the number of H103 cfu (p-value < 0.05) relative to H103 co-cultured with MFE01; ns indicates no significant difference. ♦ indicates a significant difference in the number of H103 cfu (p-value < 0.05) relative to the H103-alone control assay. EV means empty pPSV35 (plasmid control). **C.** Prey cells (MFP05 carrying pSMC2.1 gfp) were cultured alone or mixed with *P. fluorescens* MFE01 or various MFE01 T6SS mutants in a 1:5 ratio. EV indicates empty vector for the pPSV35 control. After 4 h at 28˚C, MFP05 colonies were counted ($n = 6$, the error bars represent the standard error of the mean). ** indicates a significant difference in the number of MFP05 cfu (p-value < 0.01) relative to MFE05 co-cultured with MFE01; * indicates a significant difference in the number of MFE05 cfu (p-value < 0.05) relative to MFE05 co-cultured with MFE01; ns indicates no significant difference. ♦ indicates a significant difference in the number of MFE05 cfu (p-value < 0.05) relative to the MFE05-alone control assay.

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g002

also suggests that another factor leading to antibacterial activity is activated only under biofilm conditions.

A similar inhibition of biofilm formation has already been described for *Pseudoalteromonas*, which was found to predominate over strains of *Paracoccus* sp. or *Vibrio* sp. in two-species biofilms. The supernatant of the *Pseudoalteromonas* liquid culture was devoid of antibacterial activity against free-living *Paracoccus* and *Vibrio* cells, but it impaired the ability of these species to grow as single-species biofilms. It also impaired biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [40]. We treated MFP05 with MFE01 supernatant during the adhesion step of the biofilm experiment in flow chambers to determine whether exoproducts secreted by MFE01

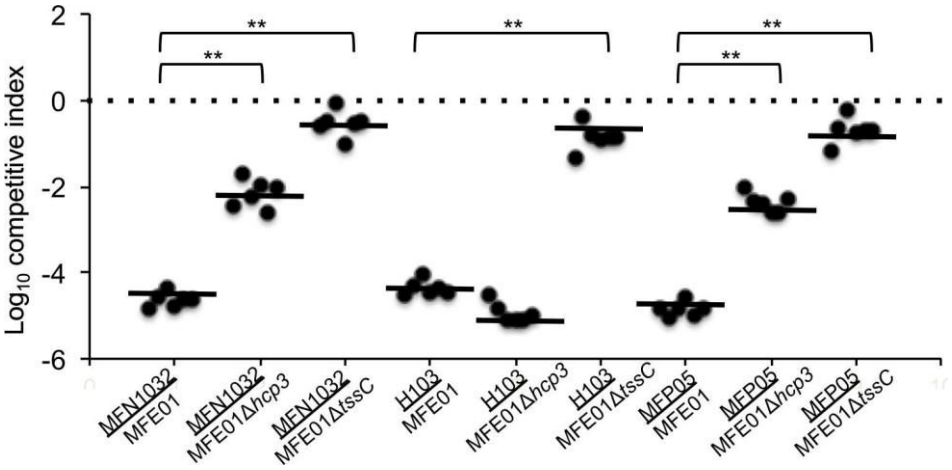


Fig 3. Competitive index of MFE01, MFE01Δt*ssC and M*FE01Δ*hcp3*. MFE01, MFE01Δt*ssC or M*FE01Δ*hcp3* (attackers) were mixed with MFP05, MFN1032 or H103 (preys). The mixture was incubated on nutrient agar for 4 h, and survival were enumerated by plating survivors on appropriate selective plates. The competitive index is calculated using the equation: (input attacker/input prey)/(output attacker/output prey). Horizontal bars indicate the arithmetic mean of log-transformed data. ** indicates statistical significance (Wilcoxon signed rank test, p-value < 0.05), n = 6.

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g003

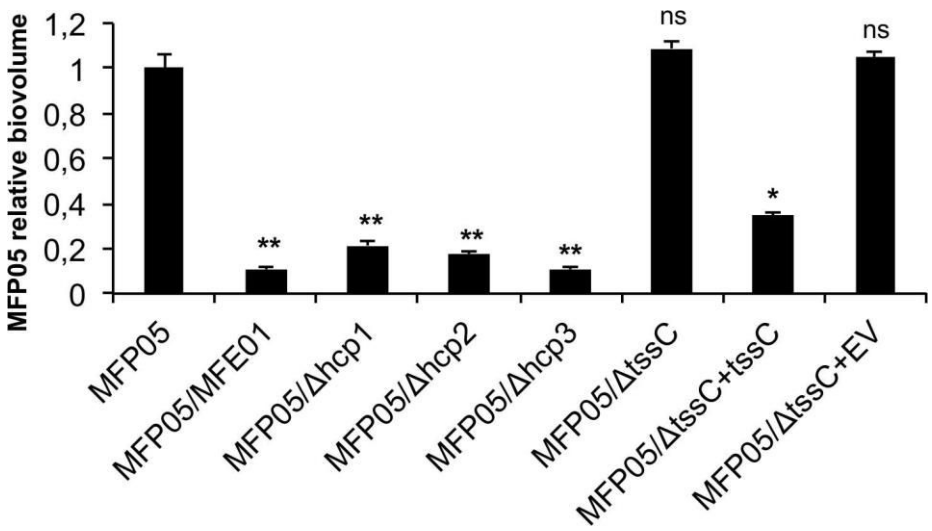


Fig 4. Effect of MFE01 and T6SS mutants on MFP05 biofilm formation. Biofilms were grown on a glass surface, for 48 h at 28˚C, under a flow of LB medium. Biovolumes of fluorescent bacteria were determined by COMSTAT analysis after confocal laser scanning microscopy observation. *P. fluorescens* MFP05 bearing pSMC2.1 *gfp*, encoding green fluorescent protein, was co-cultured alone or with MFE01 or derivatives, in a 1:5 ratio. Each histogram represents the biovolume of fluorescent MFP05, relative to that of fluorescent MFP05 when MFP05-*gfp* is cultivated alone. Comparisons were made with the control MFP05-*gfp*; ** *p*-value < 0.01; * *p*-value < 0.05; ns = non-significant; $n = 6$ (the error bars represent the standard error of the mean).

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g004

inhibited biofilm formation. The MFE01 supernatant had no significant effect on MFP05 biofilm formation (S1 Fig).

The T6SS-mediated inhibition of biofilm formation has been described in two-species biofilms containing *Burkholderia thailandensis* [54]. The threonine phosphorylation pathway (TPP) of *P. aeruginosa* activates the *P. aeruginosa* H1-T6SS cluster, which is involved in antibacterial activity, during culture on a solid surface [55]. The Gac/Rsm pathway upregulates H1-T6SS and biofilm formation, but downregulates H2-T6SS and H3-T6SS [24]. The tight regulation of the T6SS suggests that all *hcp* clusters may be regulated under biofilm conditions, working together to inhibit the formation of biofilms by other species.

T6SS is involved in the structure of MFE01 biofilms

Polysaccharides are an important component of the biofilm matrix [56]. We have already shown that the *hcp1* mutation in *P. fluorescens* MFE01 halves exopolysaccharide (EPS) accumulation and impairs motility (with an absence of flagella), whereas the mutation of *hcp2* does not [36]. We assessed the capacity of MFE01 mutants to form a biofilm in flow cell chambers, to determine whether these characteristics, associated with *hcp1* gene expression, influenced biofilm formation. There was no significant difference in biofilm biovolume between MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp2*, or MFE01Δ*hcp3* and the wild-type MFE01 (Fig 5). MFE01Δ*hcp1* retained the ability to form a biofilm, despite the decrease in EPS accumulation and the absence of flagella. This absence of flagella remains unexplained and is under investigation. Flagella do not seem to be essential for the adhesion of MFE01, and the smaller amount of EPS produced by MFE01Δ*hcp1* was still sufficient to permit adhesion.

Surprisingly, the biofilm biovolume of MFE01Δ*tssC* was significantly smaller than that of wild-type MFE01 (by a factor of 20). However, the wild-type MFE01 and MFE01Δ*tssc* growth

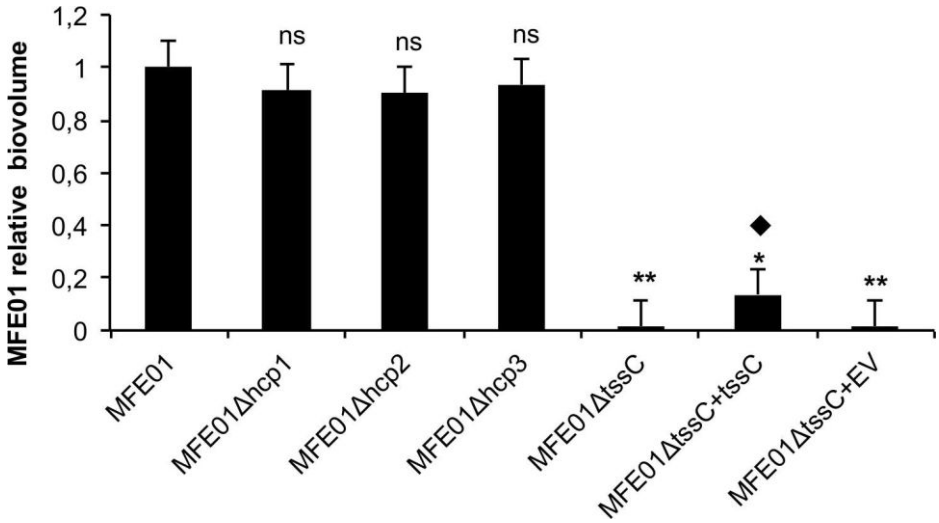


Fig 5. Effects of *hcp and tssC gene* mutations on biofilm biovolume in *P. fluorescens* strain MFE01. Biofilms were grown on a glass surface, for 48 h at 28˚C, under a flow of LB medium. Bacteria were visualised with the Syto 9® green fluorescent nucleic acid stain. Biovolumes were determined by COMSTAT analysis, after confocal laser scanning microscopy observation. The values shown are biofilm biovolumes relative to that of wild-type MFE01. The data presented are the mean values for at least five independent experiments and the error bars represent the standard error of the mean. Statistical analyses were performed with non-parametric Mann-Whitney tests (two-tailed): ns indicates no significant difference in biovolume (p-value > 0.05) relative to the MFE01 biofilm, * and ** indicates significant difference in biovolume relative to the MFE01 biofilm: *p-value < 0.05, ** p-value < 0.01. ♦ indicates a significant difference in biovolume (p-value < 0.05) relative to the MFE01Δ*tssC* biofilm. EV means empty pPSV35 (plasmid control).

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g005

curves were similar, indicating that the *tssC* mutation had no effect on growth kinetics. The reported impacts of T6SS gene cluster mutations on biofilm formation are diverse. In APEC (avian-pathogenic *Escherichia coli*), a mutation of the gene encoding IcmF (TssM), a structural protein of the T6SS, leads to a loss of adhesion to HeLa cells. This T6SS mutant also displays defective biofilm formation on glass [30]. T6SS mutants of *Acidovorax citrulli* also display poor biofilm formation [57]. Conversely, a deletion of *tssM*, encoding the T6SS structural protein TssM in *Acinetobacter baumanii*, reduces Hcp secretion, but does not alter biofilm formation [58]. In *Vibrio alginolyticus*, the phosphatase PppA, encoded by one of the genes of the T6SS gene cluster, downregulates *hcp* gene expression and biofilm formation [59]. Finally, a deletion in *icmF3* (*tssM*-like gene) in *P. aeruginosa* has been shown to enhance biofilm formation [60]. These studies show that the T6SS can affect biofilm formation, but that its role may depend on context.

The measurement of biofilm biovolume provides information about the amount of biofilm, but not its level of maturation. We therefore observed cross-sections of biofilm from MFE01 or the mutants by confocal microscopy, to assess the structure of the biofilm and its degree of maturation (Fig 6). Separately, the mutations of individual *hcp* genes did not abolish biofilm formation. MFE01 biofilms were heterogeneous in appearance, with a slightly hairy surface, and contained cell aggregates but no mushroom-like structures. Although not flat, the MFE01*Δhcp*1 biofilms were more homogeneous, with less evident cell aggregates. MFE01*Δhcp2* biofilms did not have a hairy surface, but they contained early mushroom-like structures. MFE01*Δhcp3* biofilms were flat, homogeneous, and thicker. However, the loss of biofilm structure did not lead to a loss of biomass. Indeed, the biofilms produced by the mutant strains appeared to be more compact than

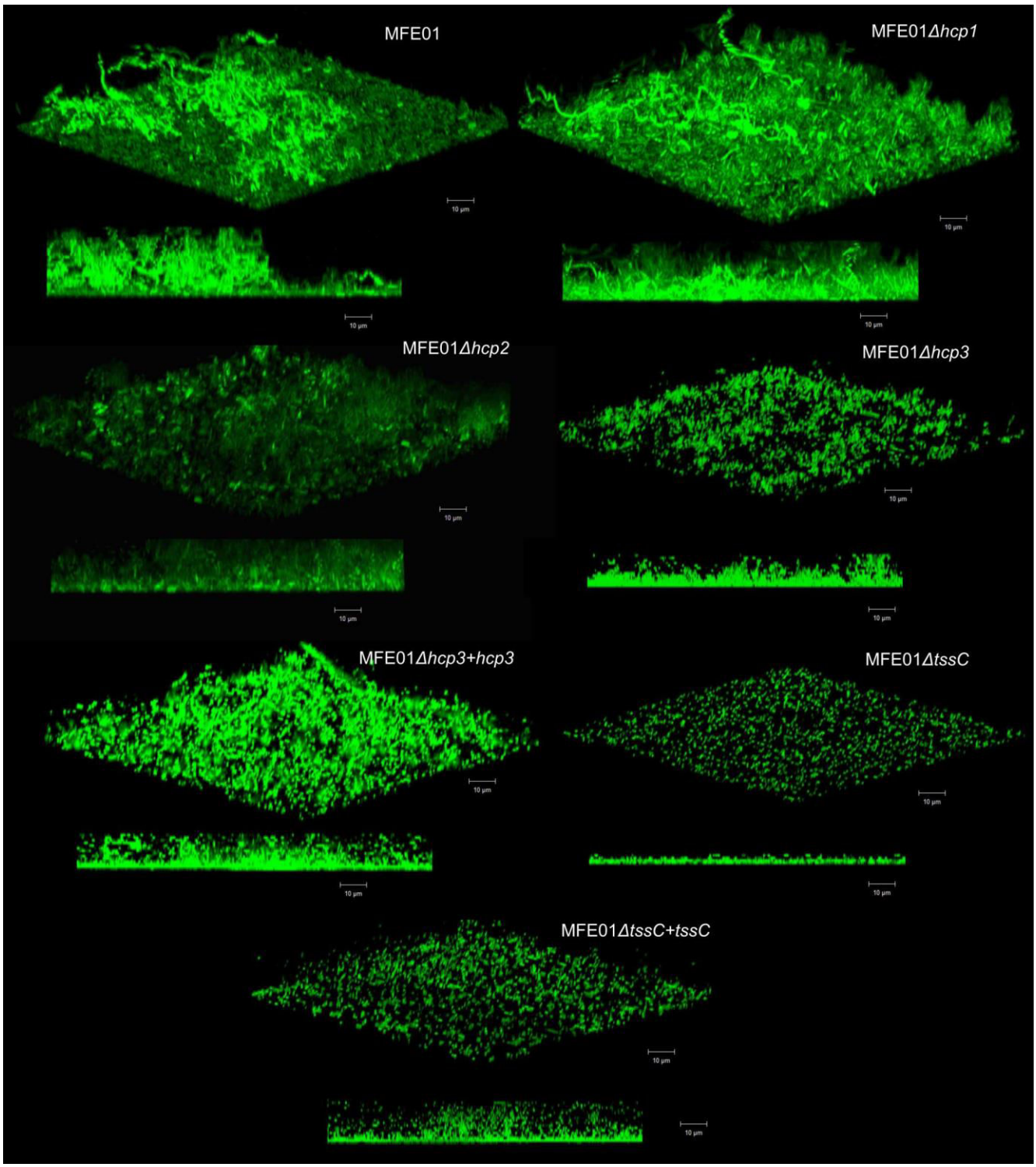


Fig 6. Effect of *hcp and tssC* gene mutations on the maturation of *P. fluorescens* MFE01 biofilms. Biofilms were grown on a glass surface for 48 h at 28°C, under a flow of LB medium. Bacteria were visualised with the Syto 9® green fluorescent nucleic acid stain. A 3D shadow representation and a side-view projection are shown at the top and bottom, respectively, for each strain. Images show representative data from at least five independent biofilm assays. Bars, 10 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g006

the MFE01 biofilm, possibly explaining the lack of decrease in the biovolumes of the biofilms in the mutant strains. These results indicate that the expression of *hcp1*, *hcp2*, and *hcp3* influences the maturation of the biofilm, but not its biovolume. The expression of these genes is required for the formation of a mature biofilm, suggesting synergy between the three *hcp* clusters in the maturation process. These results show that none of the secreted T6SS proteins considered, Hcp1, Hcp2, or Hcp3, is the major factor involved in biofilm formation. The MFE01Δ*tssC* mutant displayed the lowest level of biofilm maturation and the greatest decrease in biofilm biovolume. Our results demonstrate that the adhesion step is unchanged in the mutant strains, contrary to the biofilm maturation.

MFE01 may lack the conventional *Pseudomonas* quorum-sensing pathway

Numerous factors regulate biofilm formation. In *P. aeruginosa*, biofilm formation and T6SS expression are linked to chronic infection and are highly regulated. The sensor RetS downregulates these phenotypes *via* c-di-GMP signalling [61]. Biofilm formation and T6SS expression in *Burkolderia cenocepacia* are upregulated by quorum sensing and downregulated by the sensor kinase AtsR [62]. Many studies in *P. fluorescens* have described the regulation of biofilm formation through quorum sensing (QS), biosurfactants, and the C-di-GMP or Gac/Rsm pathway [25]. Contrary to *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* species, *Pseudomonas ffuorescens* species seems devoid of quinolone-based QS system [63]. As described by Martins *et al.* [64], quorum sensing systems based on N-acyl-homoserine lactone (AHL) signalling molecules have been identified in a few *P. fluorescens* strains [37,65–68]. Several studies have shown that other strains of *P. fluorescens* do not produce AHLs [64,69,70]. Standalone blast analyses of the MFE01 draft genome indicated that it did not contain any genes encoding a protein corresponding to the conserved AHL synthase (WP_044464955.1). We screened for AHL production, using biosensor strains to verify the absence of AHL synthesis. *Pectobacterium atrosepticum 6276* and *Pectobacterium atrosepticum 6276 ΔexpI* were used as positive and negative controls for AHL production, respectively [71]. We screened for short-chain AHL production with the biosensor *Chromobacterium* violaceum CV026. This biosensor responds to C4-C8 AHLs by producing a purple pigment (violacein) after overnight incubation at 28˚C. No purple pigmentation was observed around CV026 streak when MFE01 was cross-streaked with CV026 (Fig 7A). We screened for AHL production with *Agrobacterium tumefaciens* NTI. This biosensor responds to C6-C12 AHLs by producing ß-galactosidase, the activity of which generates a blue colour on X-gal plates after overnight incubation at 28˚C. No blue colour was observed around *Agrobacterium tumefaciens* NTI streak after overnight incubation following cross-streaking with MFE01 (Fig 7B). This preliminary screening indicates that, like many other *P. fluorescens* strains, MFE01 does not produce short- or long-chain AHLs recognised by the two used biosensors. The T6SS system may act as a quorum-sensing pathway in MFE01. Vettiger *et al.* demonstrated that T6SS substrates (*i.e.* Hcp, VgrG, and effectors) were transferred between and reused in sister cells [71]. The amount of T6SS substrate received by a cell depends on cell density and seems to follow the same principle as the auto-inducer accumulation mechanism responsible for quorum sensing.

Conclusion

We describe here several characteristics of the T6SS of the environmental *P. fluorescens* strain MFE01. We show that Hcp1, Hcp2, and Hcp3 may be involved in T6SS-mediated competition with other *Pseudomonas* strains on solid media, depending on the prey cell. MFE01 also impaired the formation of biofilms by *P. fluorescens* MFP05, a strain isolated from skin. Our

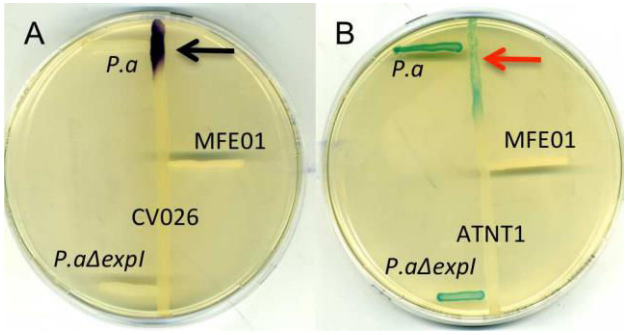


Fig 7. Detection of AHLs with biosensor strains. *P.a* indicates *Pectobacterium atrosepticum 6276* strain, which produces C_8- NAHLs, used as positive control. *P.aΔexp1* means *Pectobacterium atrosepticum* 6276 mutant strain, which does not produce AHLs, used as negative control. **A.** Detection of short-chain AHLs with *Chromobacterium violaceum* CV026 (CV026). CV026 indicates *C.violaceum CV026* strain, which produces violacein in contact with C_4-C_8 NAHLs, used as biosensor strain. Black arrow indicates violacein production by *C.violaceum CV026* strain. LB plates were incubated for 72 h at 37˚C ($n = 3$). **B.** Detection of long-chain AHLs with *Agrobacterium tumefaciens* NTI (ANTI1). ANT1 means *Agrobacterium tumefaciens* NT1 strain, which produces β-galactosidase in contact with C_6-C_{12} NAHLs, used as biosensor strain. Red arrow indicates β-galactosidase production by *Agrobacterium tumefaciens* strain. LB plates containing X-Gal (40 μg/mL) were incubated for 72 h at 28˚C ($n = 3$).

doi:10.1371/journal.pone.0170770.g007

findings highlight the potential of MFE01 as a biocontrol agent for preventing biofilm formation by another *Pseudomonas* strain isolated from skin. The protective barrier provided by human skin can be breached by burn wounds, which render the patient susceptible to bacterial infection. *P. aeruginosa* is frequently isolated from burn patients and causes serious infection [72,73], accounting for more than 50% of all deaths of these patients from infection [74]. Infections with multidrug-resistant strains of *P. aeruginosa* may also be untreatable with antibiotics, highlighting the need to develop new therapies [75]. For this reason, the ability of *Lactobacillus* to inhibit the growth of harmful bacteria in burn wounds has been investigated [76].

Although the inhibition of biofilm formation was related to T6SS integrity, we were unable to demonstrate a predominant role for any of the three Hcp proteins. Moreover, a mutant defective in the *tss*C gene of the unique T6SS core component could not inhibit biofilm formation or produce a biofilm under our conditions. We hypothesise that T6SS effectors may be used as a cell-to-cell signal among sister cells in this strain, which seems to be devoid of the classical AHL quorum-sensing pathway.

Supporting Information

S1 Fig. Effect of MFE01 and T6SS mutants on MFP05 biofilm formation. To investigate the effects of *MFE01* exoproducts on biofilm formation by MFEP05, MFP05-*gfp* bacteria, bearing pSMC2.1 *gfp*, were diluted to an OD580 of 0.25 in a supernatant of MFE01. This supernatant is obtained from a liquid culture of MFE01 grown overnight that was sterilized by filtration through a membrane with pores with a 0.22-μm diameter. MFP05-*gfp* bacteria diluted in supernatant of MFE01 were then inoculated in flow cell channels, and the 2-h adhesion step under static conditions followed by biofilm growth under a flow of fresh LB medium was performed for 48 h at 28˚C. Biovolumes of fluorescent bacteria were determined by COMSTAT analysis after confocal laser scanning microscopy observation. MFP05+S histogram represents the biovolume of fluorescent MFP05 exposed to the supernatant of MFE01, relative to that of fluorescent MFP05 when MFP05-*gfp* is diluted in LB.*ns = non-significant; $n = 6$ (the error bars represent the standard error of the mean).
(PDF)

Acknowledgments

We thank Yoan Konto and Alex Edelman & Associates for linguistic support.

Author Contributions

Formal analysis: MG VD AM.

Funding acquisition: NO MF AM.

Investigation: MG VD AM CB TR.

Methodology: AM MG.

Project administration: AM.

Resources: AM MG.

Supervision: AM.

Validation: MG VD AM CB.

Visualization: MG VD AM.

Writing – original draft: MG VD AM.

Writing – review & editing: MG VD AM CB.

References

1. Coulthurst SJ. The Type VI secretion system—a widespread and versatile cell targeting system. Res Microbiol. 2013; 164: 640–654. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.017 PMID: 23542428
2. Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, Trinidad RRS, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host Microbe. 2010; 7: 25–37. doi: 10.1016/j.chom.2009.12.007 PMID: 20114026
3. Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen M-S, Logger L, Douzi B, et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. Biochim Biophys Acta. 2014; 1843: 1664–1673. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.018 PMID: 24681160
4. Alcoforado Diniz J, Coulthurst SJ. Intraspecies Competition in *Serratia marcescens* Is Mediated by Type VI-Secreted Rhs Effectors and a Conserved Effector-Associated Accessory Protein. J Bacteriol. 2015; 197: 2350–2360. doi: 10.1128/JB.00199-15 PMID: 25939831
5. Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. Curr Opin Microbiol. 2016; 29: 81–93. doi: 10.1016/j.mib.2015.11.006 PMID: 26722980
6. Bonemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. Mol Microbiol. 2010; 76: 815–821. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07171.x PMID: 20444095
7. Cascales E, Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012; 367: 1102–1111. doi: 10.1098/rstb.2011.0209 PMID: 22411981
8. Kanamaru S. Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106: 4067–4068. doi: 10.1073/pnas.0901205106 PMID: 19276114
9. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106: 4154–4159. doi: 10.1073/pnas.0813360106 PMID: 19251641
10. Bonemann G, Pietrosiuk A, Diemand A, Zentgraf H, Mogk A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. EMBO J. 2009; 28: 315–325. doi: 10.1038/emboj.2008.269 PMID: 19131969
11. Brunet YR, Henin J, Celia H, Cascales E. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. EMBO Rep. 2014; 15: 315–321. doi: 10.1002/embr.201337936 PMID: 24488256
12. Kudryashev M, Wang RY-R, Brackmann M, Scherer S, Maier T, Baker D, et al. Structure of the type VI secretion system contractile sheath. Cell. 2015; 160: 952–962. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.037 PMID: 25723169

13. Flaugnatti N, Le TTH, Canaan S, Aschtgen M-S, Nguyen VS, Blangy S, et al. A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. Mol Microbiol. 2016; 99: 1099–1118. doi: 10.1111/mmi.13292 PMID: 26714038

14. Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y, Filloux A. The VgrG proteins are "a la carte" delivery systems for bacterial type VI effectors. J Biol Chem. 2014; 289: 17872–17884. doi: 10.1074/jbc.M114.563429 PMID: 24794869

15. Unterweger D, Miyata ST, Bachmann V, Brooks TM, Mullins T, Kostiuk B, et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. Nat Commun. 2014; 5: 3549. doi: 10.1038/ncomms4549 PMID: 24686479

16. Lossi NS, Manoli E, Forster A, Dajani R, Pape T, Freemont P, et al. The HsiB1C1 (TssB-TssC) complex of the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system forms a bacteriophage tail sheathlike structure. J Biol Chem. 2013; 288: 7536–7548. doi: 10.1074/jbc.M112.439273 PMID: 23341461

17. Kapitein N, Mogk A. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. Curr Opin Microbiol. 2013; 16: 52–58. doi: 10.1016/j.mib.2012.11.009 PMID: 23290191

18. Lin J-S, Ma L-S, Lai E-M. Systematic dissection of the *Agrobacterium* type VI secretion system reveals machinery and secreted components for subcomplex formation. PloS One. 2013; 8: e67647. doi: 10.1371/journal.pone.0067647 PMID: 23861778

19. Brunet YR, Espinosa L, Harchouni S, Mignot T, Cascales E. Imaging type VI secretion-mediated bacterial killing. Cell Rep. 2013; 3: 36–41. doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.027 PMID: 23291094

20. Zheng J, Leung KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. Mol Microbiol. 2007; 66: 1192–1206. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05993.x PMID: 17986187

21. Silverman JM, Agnello DM, Zheng H, Andrews BT, Li M, Catalano CE, et al. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. Mol Cell. 2013; 51: 584–593. doi: 10.1016/j.molcel.2013.07.025 PMID: 23954347

22. Brunet YR, Zoued A, Boyer F, Douzi B, Cascales E. The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. PLoS Genet. 2015; 11: e1005545. doi: 10.1371/journal.pgen.1005545 PMID: 26460929

23. Bondage DD, Lin J-S, Ma L-S, Kuo C-H, Lai E-M. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113: E3931–3940. doi: 10.1073/pnas.1600428113 PMID: 27313214

24. Bernard CS, Brunet YR, Gueguen E, Cascales E. Nooks and crannies in type VI secretion regulation. J Bacteriol. 2010; 192: 3850–3860. doi: 10.1128/JB.00370-10 PMID: 20511495

25. Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. Environ Microbiol. 2014; 16: 1961–1981. doi: 10.1111/1462-2920.12448 PMID: 24592823

26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284: 1318–1322. PMID: 10334980

27. Trostrup H, Thomsen K, Christophersen LJ, Hougen HP, Bjarnsholt T, Jensen PO, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm aggravates skin inflammatory response in BALB/c mice in a novel chronic wound model. Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. 2013; 21: 292–299.

28. Hinsa SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL, O'Toole GA. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. Mol Microbiol. 2003; 49: 905–918. PMID: 12890017

29. Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. Mol Microbiol. 2010; 75: 815–826. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06793.x PMID: 19602146

30. de Pace F, Boldrin de Paiva J, Nakazato G, Lancellotti M, Sircili MP, Guedes Stehling E, et al. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. Microbiol Read Engl. 2011; 157: 2954–2962.

31. Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2007; 189: 2531–2539. doi: 10.1128/JB.01515-06 PMID: 17220224

32. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987; 41: 435–464. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251 PMID: 3318676

33. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol Lett. 1998; 167: 179–184. PMID: 9867469

34. Chan C, Burrows LL, Deber CM. Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides. J Pept Res Off J Am Pept Soc. 2005; 65: 343–351.

35. Decoin V, Barbey C, Bergeau D, Latour X, Feuilloley MGJ, Orange N, et al. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. PloS One. 2014; 9: e89411. doi: 10.1371/journal.pone.0089411 PMID: 24551247

36. Decoin V, Gallique M, Barbey C, Le Mauff F, Poc CD, Feuilloley MG, et al. A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. BMC Microbiol. 2015; 15: 72. doi: 10.1186/s12866-015-0405-9 PMID: 25886496

37. El-Sayed AK, Hothersall J, Thomas CM. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. Microbiol Read Engl. 2001; 147: 2127–2139.

38. Simon R, Priefer U, Puhler A. A Broad Host Range Mobilization System for I*n Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotech. 1983; 1: 784–791.

39. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 8006–8011. doi: 10.1073/pnas.0503005102 PMID: 15911752

40. Dheilly A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, et al. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. Appl Environ Microbiol. 2010; 76: 3452–3461. doi: 10.1128/AEM.02632-09 PMID: 20363799

41. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. 2003; 185: 1027–1036. doi: 10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003 PMID: 12533479

42. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiol Read Engl. 1997; 143 (Pt 12): 3703–3711.

43. Farrand SK, Hwang I, Cook DM. The tra region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. J Bacteriol. 1996; 178: 4233–4247. PMID: 8763953

44. Smadja B, Latour X, Faure D, Chevalier S, Dessaux Y, Orange N. Involvement of N-acylhomoserine Lactones Throughout Plant Infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). Mol Plant Microbe Interact. 2004; 17: 1269–1278. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.11.1269 PMID: 15553252

45. Latour X, Diallo S, Chevalier S, Morin D, Smadja B, Burini J-F, et al. Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 4078–4081. doi: 10.1128/AEM.02681-06 PMID: 17468275

46. Russell AB, Singh P, Brittnacher M, Bui NK, Hood RD, Carl MA, et al. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. Cell Host Microbe. 2012; 11: 538–549. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.007 PMID: 22607806

47. Duong-Ly KC, Woo HN, Dunn CA, Xu W, Babic A, Bessman MJ, et al. A UDP-X diphosphatase from *Streptococcus pneumoniae* hydrolyzes precursors of peptidoglycan biosynthesis. PloS One. 2013; 8: e64241. doi: 10.1371/journal.pone.0064241 PMID: 23691178

48. Kyrpides NC, Woese CR. Universally conserved translation initiation factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 224–228. PMID: 9419357

49. Liang X, Moore R, Wilton M, Wong MJQ, Lam L, Dong TG. Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112: 9106–9111. doi: 10.1073/pnas.1505317112 PMID: 26150500

50. Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerillon J, et al. Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. Can J Microbiol. 2008; 54: 19–27. doi: 10.1139/w07-110 PMID: 18388968

51. Hancock RE, Carey AM. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J Bacteriol. 1979; 140: 902–910. PMID: 118160

52. Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairoir-Poc C, Chevalier S, et al. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. Int J Mol Sci. 2013; 14: 12186–12204. doi: 10.3390/ijms140612186 PMID: 23743829

53. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. 2013; 14: 20983–21005. doi: 10.3390/ijms141020983 PMID: 24145749

54. Schwarz S, West TE, Boyer F, Chiang W-C, Carl MA, Hood RD, et al. *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. PLoS Pathog. 2010; 6: e1001068. doi: 10.1371/journal.ppat.1001068 PMID: 20865170

55. Silverman JM, Austin LS, Hsu F, Hicks KG, Hood RD, Mougous JD. Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion activation. Mol Microbiol. 2011; 82: 1277–1290. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07889.x PMID: 22017253

56. Decker E-M, Klein C, Schwindt D, von Ohle C. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. Int J Oral Sci. 2014; 6: 195–204. doi: 10.1038/ijos.2014.38 PMID: 25059251

57. Tian Y, Zhao Y, Wu X, Liu F, Hu B, Walcott RR. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of A*cidovorax citrulli* on melon. Mol Plant Pathol. 2015; 16: 38–47. doi: 10.1111/mpp.12159 PMID: 24863458

58. Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S, et al. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. PloS One. 2013; 8: e55142. doi: 10.1371/journal.pone.0055142 PMID: 23365692

59. Sheng L, Lv Y, Liu Q, Wang Q, Zhang Y. Connecting type VI secretion, quorum sensing, and c-di-GMP production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* through phosphatase PppA. Vet Microbiol. 2013; 162: 652–662. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.009 PMID: 23021863

60. Lin J, Cheng J, Chen K, Guo C, Zhang W, Yang X, et al. The icmF3 locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Front Cell Infect Microbiol. 2015; 5: 70. doi: 10.3389/fcimb.2015.00070 PMID: 26484316

61. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. Environ Microbiol. 2011; 13: 3128–3138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x PMID: 21955777

62. Aubert DF, O'Grady EP, Hamad MA, Sokol PA, Valvano MA. The *Burkholderia cenocepacia* sensor kinase hybrid AtsR is a global regulator modulating quorum-sensing signalling. Environ Microbiol. 2013; 15: 372–385. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02828.x PMID: 22830644

63. Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. Microbes Environ JSME. 2013; 28: 13–24.

64. Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MCD, Mantovani HC, de Araujo EF. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol. 2014; 45: 1039–1046.

65. Khan SR, Mavrodi DV, Jog GJ, Suga H, Thomashow LS, Farrand SK. Activation of the phz operon of *Pseudomonas fluorescens* 2–79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting phz box. J Bacteriol. 2005; 187: 6517–6527. doi: 10.1128/JB.187.18.6517-6527.2005 PMID: 16159785

66. Cui S, Xiao J, Wang Q, Zhang Y. H-NS binding to evpB and evpC and repressing T6SS expression in fish pathogen *Edwardsiella piscicida*. Arch Microbiol. 2016; 198: 653–661. doi: 10.1007/s00203-016-1226-4 PMID: 27125651

67. Wei H-L, Zhang L-Q. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006; 89: 267–280. doi: 10.1007/s10482-005-9028-8 PMID: 16710638

68. Liu M, Wang H, Griffiths MW. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. J Appl Microbiol. 2007; 103: 2174–2184. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03488.x PMID: 18045400

69. Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Mol Plant-Microbe Interact MPMI. 1998; 11: 1119–1129. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.11.1119 PMID: 9805399

70. de Bruijn I, Raaijmakers JM. Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in P*seudomonas fluorescens*. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 4753–4761. doi: 10.1128/AEM.00575-09 PMID: 19447950

71. Vettiger A, Basler M. Type VI Secretion System Substrates Are Transferred and Reused among Sister Cells. Cell. 2016; 167: 99–110.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.023 PMID: 27616061

72. McVay CS, Velasquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 1934–1938. doi: 10.1128/AAC.01028-06 PMID: 17387151

73. Liu Y, Zhou Q, Wang Y, Liu Z, Dong M, Wang Y, et al. Negative pressure wound therapy decreases mortality in a murine model of burn-wound sepsis involving *Pseudomonas aeruginosa* infection. PloS One. 2014; 9: e90494. doi: 10.1371/journal.pone.0090494 PMID: 24587379

74. McManus AT, Mason ADJ, McManus WF, Pruitt BAJ. Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. Eur J Clin Microbiol. 1985; 4: 219–223. PMID: 3924612

75. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. 2011; 2: 65. doi: 10.3389/fmicb.2011.00065 PMID: 21747788

76. Brachkova MI, Marques P, Rocha J, Sepodes B, Duarte MA, Pinto JF. Alginate films containing *Lactobacillus plantarum* as wound dressing for prevention of burn infection. J Hosp Infect. 2011; 79: 375–377. doi: 10.1016/j.jhin.2011.09.003 PMID: 22000853

III. Mini-Revue

The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?

Mathias Gallique, Mathilde Bouteiller and Annabelle Merieau

Contexte et intérêt de la rédaction d'une mini-revue

Au cours de l'article 2, nous avions émis l'hypothèse que le SST6 pourrait être impliqué dans la communication bactérienne au sein d'un biofilm et permettrait ainsi de coordonner un mouvement collectif de population, nécessaire à la formation d'un biofilm. Plusieurs articles mettent en évidence que le SST6 n'est pas qu'un mécanisme impliqué dans l'activité antibactérienne ou dans la virulence envers les cellules eucaryotes. En effet, ce système permet entre autre de sécréter dans le milieu extracellulaire des effecteurs permettant l'import d'ions, par exemple le zinc ou bien le fer, et est donc impliqué dans la compétition bactérienne. Au cours de cette revue, nous décrivons l'assemblage du SST6, en intégrant le recyclage des protéines Hcp, VgrG et des effecteurs provenant d'une bactérie isogénique, le rôle de TssA ou bien celui de l'enzyme MltE durant la biogénèse du complexe membranaire. Nous référençons plusieurs cas d'implication de ce système dans le comportement social, par exemple la perception du soi et du non-soi chez *Proteus mirabilis*. De même, il nous semblait important de rappeler que la régulation du SST6 chez *Pseudomonas aeruginosa* est étroitement liée avec le quorum sensing, qui permet la communication bactérienne. Or certaines bactéries, dont MFE01, semblent dépourvues de molécules classiques du quorum sensing tout en montrant des comportements sociaux. L'objectif de cette revue est donc de souligner que le SST6 n'est pas limité à l'activité antibactérienne ou bien à la virulence envers les cellules eucaryotes, mais participe aussi à l'acquisition de facteurs limitant, à l'adaptation, au comportement social et probablement à la communication.

frontiers in Microbiology

MINI REVIEW
published: 28 July 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.01454

The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?

*Mathias Gallique, Mathilde Bouteiller and Annabelle Merieau**

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA 4312, l'Institut Universitaire de Technologie d'Evreux (IUT), Université de Rouen, Normandy University, Evreux, France

Numerous studies in Gram-negative bacteria have focused on the Type VI Secretion Systems (T6SSs), Quorum Sensing (QS), and social behavior, such as in biofilms. These interconnected mechanisms are important for bacterial survival; T6SSs allow bacteria to battle other cells, QS is devoted to the perception of bacterial cell density, and biofilm formation is essentially controlled by QS. Here, we review data concerning T6SS dynamics and T6SS–QS cross-talk that suggest the existence of inter-bacterial communication via T6SSs.

Keywords: type six secretion system, quorum sensing, communication, social behavior, membrane perturbation

OPEN ACCESS

Edited by:
Mickael Desvaux, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France

Reviewed by:
Efstathios D. Giaouris, University of the Aegean, Greece
Sophie Bleves, Aix-Marseille University, France

***Correspondence:**
Annabelle Merieau
annabelle.merieau@univ-rouen.fr

Specialty section:
This article was submitted to Microbial Physiology and Metabolism, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *12 May 2017*
Accepted: *18 July 2017*
Published: *28 July 2017*

Citation:
Gallique M, Bouteiller M and Merieau A (2017) The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? Front. Microbiol. 8:1454. doi: 10.3389/fmicb.2017.01454

INTRODUCTION

Bacteria are perpetually at war against multiple competitors and thus require weapons to conquer new territory or persist in an ecological niche. Among the mechanisms that aid in the struggle against other bacterial species are the Type VI Secretion Systems (T6SSs) (Hood et al., 2010). The T6SSs of Gram-negative bacteria are effector translocation apparatuses, resembling an inverted bacteriophage-puncturing device, composed of at least 13 proteins called core-components (TssA-M, for Type six secretion) (Boyer et al., 2009; Silverman et al., 2012). Auxiliary components can be associated with these conserved proteins (Tag, for Type six secretion associated genes) (Shalom et al., 2007). T6SSs participate in a broad variety of functions, including virulence and antibacterial activity (Pukatzki et al., 2006, 2007; Ma et al., 2009; Coulthurst, 2013; Sana et al., 2016). T6SSs also participate in metal ion uptake, such as that of iron, manganese, and zinc (Wang et al., 2015; Chen et al., 2016; Lin et al., 2017; Si et al., 2017), conferring an advantage during bacteria–bacteria competition. In this review, we provide an overview of the data on T6SS assembly and emphasize connections between T6SSs and bacterial communication.

T6SS DYNAMICS

The Global Scenario

Type VI Secretion System contractile nanomachines allow bacteria to inject toxins directly into prey cell membranes or cytoplasm. The machinery of the T6SS is assembled in an orderly manner. It starts with membrane complex formation, allowing baseplate positioning. The baseplate serves as a platform for contractile tail elongation. Contraction of the sheath propels effectors across membranes. Finally, the ATPase, TssH (ClpV), recycles the sheath and probably other T6SS components such as TssA, whereas the membrane-anchoring complex can be used to fire a new salvo (**Figure 1**).

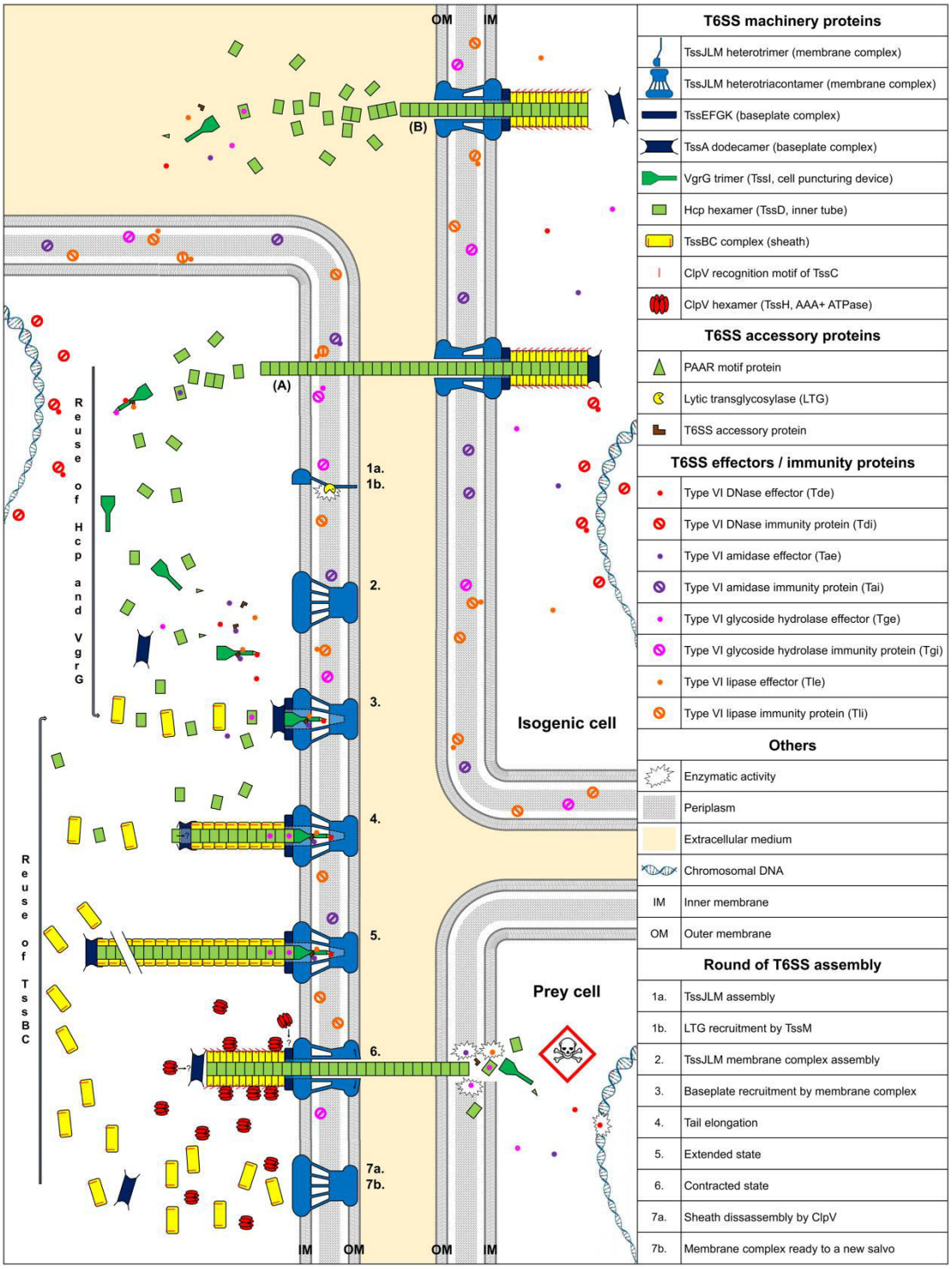


FIGURE 1 | Model of T6SS assembly and Hcp/VgrG/effector translocation and recycling. The membrane complex is anchored to the cell envelope with the help of a lytic transglycosylase (1a, 1b, and 2). While effectors are loaded onto their respective Hcp, VgrG, or PAAR proteins, the baseplate platform is positioned (3), aiding inner tube and sheath assembly (4 and 5). TssA interacts with the membrane complex, allowing contractile tail polymerization (3). Hcp or sheath components can be individually added during elongation (4 and 5). Following sheath contraction, Hcp, VgrG/PAAR, with their associated effectors, are pushed out and delivered into prey cells (6). ClpV disassembles the sheath and probably other T6SS components (7a) and the membrane complex may be used for a new assembly cycle using recycled components (7b). **(A)** Indicates exogenous Hcp and VgrG that can be recycled after isogenic T6SS aggression. **(B)** Indicates secretion of Hcp and VgrG into the culture medium. The question mark indicates a hypothesis.

Membrane Complex Assembly

Type VI Secretion Systems are anchored to the cell envelope by a membrane core complex (Durand et al., 2015), which serves as a T6SS docking station and platform for baseplate assembly and prevents membrane cell damage during effector injection. The membrane core complex is a 1.7 MDa structure with a fivefold symmetry composed of 10 heterotrimeric complexes containing the three proteins TssJ, TssL, and TssM. Hierarchical biogenesis of this complex is initiated by the insertion of the lipoprotein TssJ in the outer membrane (Aschtgen et al., 2008; Zoued et al., 2014). TssJ then interacts with the large periplasmic domain of the inner membrane protein TssM (Felisberto-Rodrigues et al., 2011; Nguyen et al., 2015). The cytoplasmic domain of TssM interacts with the inner membrane protein TssL and the cytoplasmic domain of another TssM subunit, thus enabling oligomerization (Logger et al., 2016). Similarly, the cytoplasmic domain of TssL mediates self-polymerization (Durand et al., 2012; Zoued et al., 2016a). The TssM periplasmic domain recruits a lytic transglycosylase (LTG), which is required for local peptidoglycan layer degradation, necessary for proper assembly of the 1.7 MDa TssJLM complex (**Figure 1**, assembly steps 1 and 2) (Weber et al., 2016; Santin and Cascales, 2017). Associated proteins with a peptidoglycan-binding domain, such as TagL, which can bind to truncated TssL, can associate with the membrane complex. TagL corresponds in this case to an "ancestral TssL" domain (Aschtgen et al., 2010a,b).

Baseplate Complex Positioning

The T6SS baseplate complex, composed of TssA, TssE, TssF, TssG, TssK, and Valine-glycine repeat protein G (VgrG or TssI) proteins (Brunet et al., 2015), is recruited by the membrane complex (Zoued et al., 2013). This structure serves as a platform for contractile sheath assembly and is essential for the correct assembly of the inner tube, comprised of hexameric rings of Hemolysin-coregulated protein (Hcp or TssD) (Brunet et al., 2015). TssA forms a dodecamer complex, which first binds to the membrane complex (Zoued et al., 2016b) (**Figure 1**, assembly step 3). Positioning of the baseplate complex may be initiated by recruitment of TssE, TssK, and VgrG via TssA (Planamente et al., 2016; Zoued et al., 2016b). The cytoplasmic domains of TssM and TssL, located at the base of the membrane complex, interact with the TssG/TssK and TssK/TssE baseplate subunits, respectively (Zoued et al., 2013, 2016a; Logger et al., 2016). The baseplate complex thus forms an interface between the membrane complex and the T6SS tail: both the Hcp and TssC sheath subunits interact with baseplate components (Brunet et al., 2015) (**Figure 1**, assembly step 4). After TssE recruitment, TssA likely properly attaches the sheath onto the baseplate and/or stabilizes the sheath structure (Planamente et al., 2016).

Elongation of the Contractile Tail

The TssE baseplate component may initiate sheath assembly and anchors the sheath to the baseplate (Kudryashev et al., 2015). Hcp proteins assemble into hexameric rings, stacked head-to-tail, under the control of baseplate components (Brunet et al., 2014, 2015). The TssBC sheath component then wraps around the inner Hcp tube (Zoued et al., 2016b). Formation of the inner tube precedes TssBC assembly and is primordial for proper stacking of the subunits (Basler et al., 2012; Kapitein et al., 2013; Brunet et al., 2014). The Hcp tube has an inner diameter of ∼40 Å (Mougous et al., 2006), forming a lumen with a neutral surface, suggesting passive effector translocation into the Hcp tube (Ge et al., 2015). The diameter of the internal sheath, measuring approximately 100–110 Å (Bönemann et al., 2009), coincides with the ∼80–85 Å outer diameter of the Hcp hexamer (Cascales and Cambillau, 2012). The TssA dodecamer is located at the distal end of the tail in *Escherichia coli* (Zoued et al., 2016b), whereas TssA1 is a component of the baseplate/tail subcomplex in *Pseudomonas aeruginosa* (Planamente et al., 2016). The TssA complex appears to possess short, flexible arm-like extensions, which may grasp TssBC or Hcp and incorporate them, one by one, at the distal end of the contractile tail (Zoued et al., 2016b). Moreover, the diameter of the central channel of the ring-shaped TssA structure measures approximately 100 Å (Planamente et al., 2016), comparable to the dimension of the Hcp hexamers. Hcp components perhaps pass through the large central lumen of the TssA dodecamer (**Figure 1**, assembly step 4) and are added to the growing structure. Contrary to bacteriophages, the length of the T6SS tail does not appear to be controlled by a specialized protein (Zoued et al., 2014; Vettiger and Basler, 2016). The length of the T6SS tail can exceed 1 μm (Basler et al., 2012). It is possible that contact with the opposite cell membrane is the physical signal to stop tail elongation (**Figure 1**, assembly step 5).

Contraction and Sheath Disassembly

Clemens et al. (2015) demonstrated that the sheath of *Francisella tularensis* has a quaternary structure with handedness opposite to that of the contracted sheath of T4 phage tails. The sheath contracts within a few milliseconds (Basler et al., 2012), propelling the Hcp-VgrG spike and effectors, punching either indiscriminately or in a focused manner into neighboring bacteria. The sheath contracts and becomes shorter and wider than in the extended state (Basler et al., 2012). Once the sheath is contracted, the ClpV recognition motif of TssC, which is buried in the elongated state, becomes accessible (Bönemann et al., 2009; Pietrosiuk et al., 2011; Basler and Mekalanos, 2012; Kapitein et al., 2013; Kube et al., 2014; Douzi et al., 2016), permitting TssBC recycling by the ATPase. Thus, TssB and TssC can be reused for a new round of sheath elongation (**Figure 1**, assembly steps 6 and 7). An alternative mode of sheath disassembly may involve the TagJ accessory protein (Forster et al., 2014). TagJ is structurally related to particular TssA C-terminal extensions (Planamente et al., 2016). In this case, TagJ interacts with TssB and recruits ClpV to the sheath (Forster et al., 2014). ClpV can also interact with TssA and may be involved in recycling TssA rings (Planamente et al., 2016).

Effector Translocation

The puncturing device, consisting of the VgrG trimer, is located at the top of the inner tube and may be crucial for piercing the prey cell envelope. The VgrG trimer sometimes terminates with a Pro-Ala-Ala-Arg (PAAR)-repeat-containing protein, sharpening the tip (Shneider et al., 2013; Bondage et al., 2016).

Effectors transported by T6SS fall into two groups: "specialized" effectors and "cargo" effectors (Cianfanelli et al., 2016). Specialized effectors are extension domains of a structural component, whereas cargo effectors interact directly with VgrG, PAAR, or Hcp proteins (Silverman et al., 2013), with or without the help of accessory proteins (Alcoforado Diniz and Coulthurst, 2015; Liang et al., 2015; Unterweger et al., 2015). Four main classes of antibacterial effectors have been described, according to the target (**Figure 1**). Peptidoglycan targeting effectors are comprised of both Type six amidase effectors (Tae) and Type six glycoside hydrolase effectors (Tge) (Whitney et al., 2013). Type six lipase effectors (Tle) hydrolyse membrane phospholipids (Russell et al., 2013; Flaugnatti et al., 2016), whereas Type six DNase effectors (Tde) have nuclease activity (Ma et al., 2014). Some toxins do not belong to any of these four main classes. Pore-forming toxins, such as VasX from *Vibrio cholerae*, disrupt the inner membrane integrity of target cells (Miyata et al., 2013). Whitney and collaborators identified a $NAD(P)^+$ glycohydrolase toxin in *P. aeruginosa* (Whitney et al., 2015). This toxin depletes cellular $NAD(P)^+$ levels and induces bacteriostasis. The T6SS is not only an injection mechanism, it also enables the release of a proteinaceous metallophore into the extracellular medium and plays a role in the transport of Mn^{2+} under conditions of oxidative stress (Si et al., 2017) and iron uptake (Chen et al., 2016; Lin et al., 2017).

Bacteria that secrete antibacterial toxins also produce immunity proteins, which interact with toxic effectors, to allow self-protection and prevent the killing of sibling cells (called Tai, Tgi, Tli, and Tdi, corresponding to their effector family). Immunity proteins and effector targets are located within the same cellular compartment (Russell et al., 2013). Therefore, *tli* genes encoding outer membrane lipoproteins or periplasmic exposed lipoproteins, the Tle, should act in the periplasm (**Figure 1**).

Some other proteins secreted by the T6SS are involved in self-recognition, allowing communication between bacteria (Wenren et al., 2013; Cardarelli et al., 2015; Saak and Gibbs, 2016). In bacteria, secreted proteins are involved in many functions and are essential for bacterial fitness (Maffei et al., 2017). In some strains, the T6SS is activated in response of T6SS aggression by neighboring bacteria during cell–cell contact. Thus, the T6SS can modulate the fitness of other bacteria. In addition, T6SSs can be active, even in pure culture, and the presence of Hcp and VgrG in the culture medium is often used as evidence of a functional T6SS (Pukatzki et al., 2006, 2009). What purpose, however, does a functional T6SS serve in the absence of a competitor or prey?

IS THE T6SS INVOLVED IN CELL-TO-CELL SIGNALING AND COMMUNICATION?

Prelude

Pseudomonas aeruginosa is a widely-used model for T6SS studies. *P. aeruginosa* possesses three T6SS clusters comprised of TssA-M core component proteins. They are called H1-T6SS, H2-T6SS, and H3-T6SS. Among them, the H1-T6SS machinery is the most widely studied and is involved in antibacterial activity (Hood et al., 2010). The H2-T6SS and H3-T6SS are involved in virulence in eukaryotes (Lesic et al., 2009; Sana et al., 2012, 2015) but also display antibacterial activity by secreting trans-kingdom effectors, such as PldA and TplE via the H2-T6SS or PldB via the H3-T6SS machinery (Russell et al., 2013; Jiang et al., 2014, 2016).

"Dueling" and "Tit-for-Tat"

Two types of T6SS behavior can be distinguished: that of defensive (targeted firing) and offensive cells (arbitrarily firing). *P. aeruginosa* can discern T6SS-mediated aggression of neighboring sister cells (Basler and Mekalanos, 2012). Similarly, *P. aeruginosa* can perceive T6SS attacks coming from *V. cholerae* or *Acinetobacter baylyi* cells (Basler et al., 2013). In both cases, *P. aeruginosa* is first assaulted by a nearby bacterium and then attacks, in turn, the aggressive cell. This mechanism is called "T6SS dueling" and is mediated by the H1-T6SS. Thus, *P. aeruginosa* only counterattacks in response to T6SS firing of *V. cholerae* or *A. baylyi*. In general, *P. aeruginosa* does not target T6SS-defective bacteria, suggesting that it is a defensive bacterium, in contrast to offensive *V. cholerae* and *A. baylyi* strains. However, *P. aeruginosa* strains affected in the hybrid sensor kinase RetS, can attack T6SS-defective bacteria in a H1-T6SS-dependent manner (Hachani et al., 2013, 2014). The perception of a T6SS attack involves the TagQRST threonine phosphorylation pathway, following envelope perturbation after T6SS-mediated perforation (Basler et al., 2013; Casabona et al., 2013; Ho et al., 2013) (**Figure 2**). Indeed, Polymyxin B, which alters cell membranes of Gram-negative bacteria, mediates activation of the T6SS, confirming that envelope perturbation triggers the T6SS counterattack (Ho et al., 2013). The TagQRST trans-membrane signaling cascade, essential for activation of the H1-T6SS of *P. aeruginosa*, is composed of four proteins. The ABC transporter complex TagST, anchored to the inner membrane, has ATPase activity (Casabona et al., 2013). In this complex, TagT is required for T6SS activation after cell membrane perturbation (Ho et al., 2013). TagQ, an outer membrane lipoprotein, is necessary for outer membrane localisation of TagR, which is required for protein kinase PpkA phosphorylation (Hsu et al., 2009). PpkA phosphorylates, in turn, Fha1 (which has a forkhead-associated domain), thus activating H1-T6SS assembly (**Figure 2**). The phosphatase PppA counteracts the role of PpkA by dephosphorylating Fha1 (Mougous et al., 2007). T6SS dueling appears to be an indirect means of communication, in which the occurrence of T6SS attacks may correlate with cell density. As the population increases, the likelihood of targeting sister cells also intensifies. In other words, as the population grows, the incidence of T6SS aggression rises. Thus, the perception of T6SS attacks provides an overall view of bacterial density and a form of social interaction (**Figure 2**).

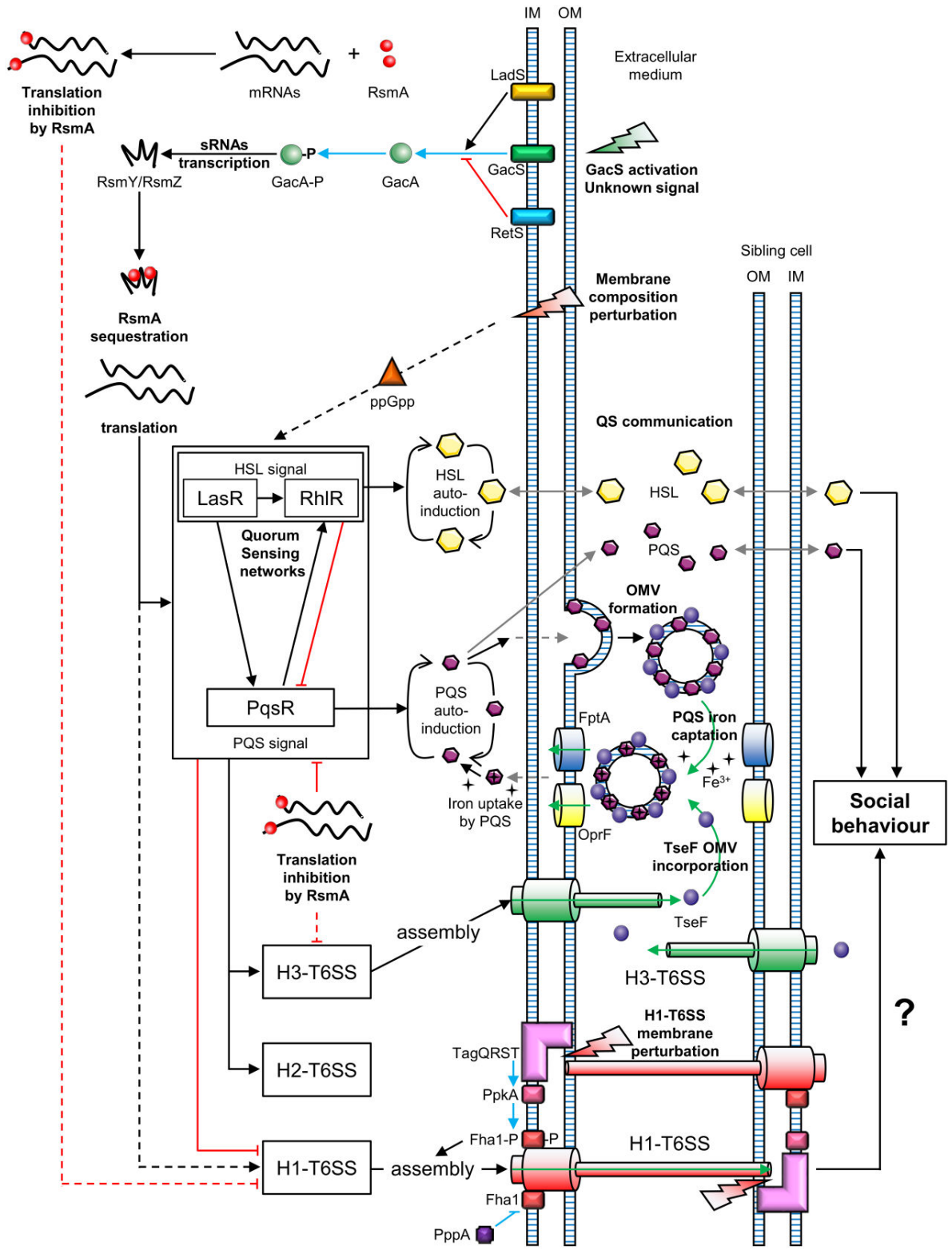


FIGURE 2 | Connections between T6SSs and bacterial communication in *Pseudomonas aeruginosa*. OM, outer membrane; IM, inner membrane; OMV, outer membrane vesicle; P, phosphate; QS, quorum sensing. Green arrows represent molecule transport or uptake; black arrows indicate positive regulation; red blunt lines represent negative regulation; gray arrows represent diffusion; blue arrows indicate phosphorylation and blue blunt lines represent dephosphorylation; uncharacterized regulations are indicated by dotted lines. The question mark indicates a hypothesis.

The GacS/GacA System and the Interplay between the T6SS and Quorum Sensing in *P. aeruginosa*

Two-Component Signal Transduction systems (TCSTs) are involved in external signal perception via a "sensor" and translate the signal via a "response regulator." Thus, TCSTs play a key role in adaptive responses during environmental stress. GacS/GacA is a TCST in *P. aeruginosa* that perceives unknown signals and regulates numerous networks (Reimmann et al., 1997). The GacS/GacA cascade activates the transcription of the small RNAs (sRNAs) RsmZ and RsmY. RsmZ has a high affinity for the RNA-binding protein RsmA and can sequester it, permitting the translation of genes encoding H1-T6SS mRNAs. A *rsm*Z mutation results in downregulation of the transcription of genes encoding the H1-T6SS and H3-T6SS of *P. aeruginosa* (Brencic et al., 2009; Moscoso et al., 2011). The GacS/GacA system is under the control of two hybrid sensors, RetS and LadS. The hybrid sensor kinase RetS decreases RsmZ/RsmY transcription via the inhibition of GacS/GacA phospho-relay (Goodman et al., 2004). In contrast, LadS, enhances GacA phosphorylation via GacS (Chen et al., 2015). In summary, H1-T6SS is upregulated by the GacS/GacA/RsmZ regulatory pathway, which depends on the balance between RetS and LadS activation from external signals, unlike the H2-T6SS and H3-T6SS (**Figure 2**).

Quorum Sensing (QS) is a system that allows social synchronization, based on the perception of population density, according to signal molecule concentration. QS is crucial for collective adaptive responses (similar to a social behavior) and regulates both bacterial virulence and biofilm formation (Deng et al., 2011). *P. aeruginosa* has four QS networks consisting of three classes of diffusible auto-inducers (Lee and Zhang, 2015). The first class includes two types of Homoserine Lactones (HSLs): *N*-(3-oxododecanoyl)-Homoserine Lactones (odDHL, 3-oxo-C12-HSL) and *N*-butyrylhomoserine Lactones (BHL, C4-HSL) controlled by the Las and Rhl cascades, respectively (Schuster and Greenberg, 2007). *P. aeruginosa* also produces *P*seudomonas Quinolone Signal (PQS), 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, of which the production is regulated by the PqsR cascade (also known as MvfR) (Cao et al., 2001). The last QS system consists of 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, which is involved in the Integrated Quorum Sensing system (IQS) (Lee et al., 2013). The IQS can enhance PQS production depending on the *P. aeruginosa* strain (Lee et al., 2013; Sun et al., 2016). These QS networks are all interconnected and positively regulated by the Las cascade (Pessi et al., 2001; Lee et al., 2013). At the same time, RsmA is a negative post-transcriptional regulator of both 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL production, affecting the Las/Rhl quorum sensing cascades (Pessi et al., 2001). Similarly, PqsR is post-transcriptionally repressed by RsmA (Kulkarni et al., 2014). However, the PQS system and Rhl cascade are upregulated via the Las pathway and PQS positively regulates the Rhl cascade (Rasamiravaka et al., 2015). In summary, the GacS/GacA system is a global activator of QS communication, because the action of the RNA-binding protein RsmA is jointly antagonized by RsmY and RsmZ (Kay et al., 2006) (**Figure 2**). At the same time, QS positively regulates H2-T6SS and H3-T6SS, whereas it suppresses H1-T6SS associated gene expression (Lesic et al., 2009).

A study published by Lin et al. (2017) revealed a link between the H3-T6SS and cell–cell signaling in *P. aeruginosa.* The cell–cell signaling compound PQS contributes to the formation of Outer Membrane Vesicles (OMVs) and associates with vesicle membranes. The PQS in OMVs can capture iron from the extracellular medium. In parallel, the protein TseF, secreted by the H3-T6SS, associates with OMVs containing PQS. The TseF from the OMVs then interacts with the Fe(III)-pyochelin receptor FptA and the porin OprF. This enables the delivery of PQS, associated with iron, into bacterial cells. Thus, the effector TseF delivered by the H3-T6SS is involved in the PQS pathway (**Figure 2**).

T6SS and Social Behavior in *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis strains are able to recognize isogenic cells, coordinate multicellular swarming motility, and form macroscopic boundaries with non-sister cell swarms (Alteri et al., 2013). Macroscopic demarcation, called Dienes lines, can be observed between swarming *P. mirabilis* strains. Functional T6SSs are involved in this recognition phenomenon in the region of inter-strain contact. This visible boundary requires physical cell–cell interactions and is the result of T6SS recognition. Indeed, cells at the intersection between two swarming populations of *P. mirabilis* appear to kill each other using their T6SS effectors (Alteri et al., 2013). The T6SSs appear to assemble and fire deeply beyond the inter-strain boundary into the opposing swarming cells, thus enhancing T6SS effector injection (Alteri et al., 2013). Some Identification of self (Ids) proteins, involved in self-recognition and territorial behavior, are exported by the T6SS (Wenren et al., 2013). For example, IdsD mediates identity recognition between neighboring cells in a T6SS-dependant manner. IdsD interacts specifically with the cognate IdsE protein on the surface of recipient cells. The specific interaction between the two membrane-bound self-recognition proteins IdsD and IdsE drives social behavior (Cardarelli et al., 2015). These binding interactions contribute to the definition of strain identity and discrimination between self and neighboring non-self cells. The lack of binding between IdsD and IdsE correlates with the formation of the visible boundary. The authors speculate that IdsE itself contributes to the repression of swarm colony expansion. Interaction between the two cognate proteins reduces swarm restriction (Saak and Gibbs, 2016). IdsD and IdsE proteins may constitute a lethal effector-immunity (toxin–antitoxin) system. Contrary to QS, which is based on contact-independent recognition, T6SS-associated recognition generally requires cell-to-cell contact (Saak and Gibbs, 2016). *P. mirabilis* uses the T6SS to discriminate between strains, coordinate multicellular swarming behavior, and direct its collective movement. Thus, the T6SS is essential for boundary formation and mediates cell–cell communication of swarming *P. mirabilis* via specific self-identity determinants.

The T6SS of the *P. fluorescens* MFE01 Strain

The *P. fluorescens* MFE01 strain, like numerous other *P. fluorescens* strains, does not produce the QS signals of *P. aeruginosa* (no HSL or PQS) (Gallique et al., 2017). MFE01 is an aggressive T6SS strain which contains a unique T6SS core component cluster and three orphan *hcp* genes (Decoin et al., 2014, 2015). The MFE01 T6SS is involved in biofilm formation and maturation (Gallique et al., 2017), as shown for other T6SSs (de Pace et al., 2011; Sheng et al., 2013; Lin et al., 2015; Tian et al., 2015). Indeed, *P. fluorescens* MFE01 is unable to form biofilms once the T6SS machinery is inactive (in a *tssC* mutant), whereas individual mutations of the three *hcp* genes affect biofilm maturation, but not formation. Intra-bacterial cooperation in conditions of biofilm formation via T6SS dueling could occur. Indeed, alterations of membrane phospholipid composition increase the ppGpp stress-response signal, which in turn causes the premature production of HSL-QS signals, including in *P. aeruginosa* (Baysse et al., 2005) (**Figure 2**). Similarly, communicating pathways could be activated following membrane perturbation due to T6SS perforation in MFE01 strain during "tit-for-tat" interactions.

CONCLUSION

A recent study showed that bacteria can reuse T6SS components from attacking cells for new T6SS assembly (Vettiger and Basler, 2016) (**Figure 1**). This suggests that an increase in cell density increases the concentration of T6SS components in bacteria and the ability of the cell to fire again, forming a positive feedback loop. We postulate that T6SS could be a cell-to-cell signal between sibling cells, depending on cell density, similar to the QS pathway, especially in bacteria devoid of QS signals.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Writing, review, and editing: MG, AM, MB.

FUNDING

This study was supported by GRR CBS funds from the Region Haute-Normandie, SFR Normandie Végétale (NORVEGE) funds, GEA (grand Evreux agglomeration) funds, and FEDER funds.

REFERENCES

Alcoforado Diniz, J., and Coulthurst, S. J. (2015). Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *J. Bacteriol.* 197, 2350–2360. doi: 10.1128/JB.00199-15

Alteri, C. J., Himpsl, S. D., Pickens, S. R., Lindner, J. R., Zora, J. S., Miller, J. E., et al. (2013). Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathog.* 9:e1003608. doi: 10.1371/journal.ppat.1003608

Aschtgen, M.-S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Lloubès, R., and Cascales, E. (2008). SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 7523–7531. doi: 10.1128/JB.00945-08

Aschtgen, M.-S., Gavioli, M., Dessen, A., Lloubès, R., and Cascales, E. (2010a). The SciZ protein anchors the enteroaggregative *Escherichia coli* type VI secretion system to the cell wall. *Mol. Microbiol.* 75, 886–899. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07028.x

Aschtgen, M.-S., Thomas, M. S., and Cascales, E. (2010b). Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP...what else? *Virulence* 1, 535–540.

Basler, M., Ho, B. T., and Mekalanos, J. J. (2013). Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell* 152, 884–894. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.042

Basler, M., and Mekalanos, J. J. (2012). Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science* 337:815. doi: 10.1126/science.1222901

Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, P. G., Jensen, J. G., and Mekalanos, J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483, 182–186. doi: 10.1038/nature10846

Baysse, C., Cullinane, M., Dénervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., et al. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151(Pt 8), 2529–2542. doi: 10.1099/mic.0.28185-0

Bondage, D. D., Lin, J.-S., Ma, L.-S., Kuo, C.-H., and Lai, E.-M. (2016). VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E3931–E3940. doi: 10.1073/pnas.1600428113

Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., and Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J.* 28, 315–325. doi: 10.1038/emboj.2008.269

Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 10:104. doi: 10.1186/1471-2164-10-104

Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., et al. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* 73, 434–445. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x

Brunet, Y. R., Hénin, J., Celia, H., and Cascales, E. (2014). Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Rep.* 15, 315–321. doi: 10.1002/embr.201337936

Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., and Cascales, E. (2015). The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the TssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization. *PLoS Genet.* 11:e1005545. doi: 10.1371/journal.pgen.1005545

Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., and Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14613–14618. doi: 10.1073/pnas.251465298

Cardarelli, L., Saak, C., and Gibbs, K. A. (2015). Two proteins form a heteromeric bacterial self-recognition complex in which variable subdomains determine allele-restricted binding. *mBio* 6:e00251-15. doi: 10.1128/mBio.00251-15

Casabona, M. G., Silverman, J. M., Sall, K. M., Boyer, F., Couté, Y., Poirel, J., et al. (2013). An ABC-transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 15, 471–486. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02816.x

Cascales, E., and Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 1102–1111. doi: 10.1098/rstb.2011.0209

Chen, L., Zou, Y., She, P., and Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* 172, 19–25. doi: 10.1016/j.micres.2015.01.004

Chen, W.-J., Kuo, T.-Y., Hsieh, F.-C., Chen, P.-Y., Wang, C.-S., Shih, Y.-L., et al. (2016). Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Sci. Rep.* 6:32950. doi: 10.1038/srep32950

Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., and Coulthurst, S. J. (2016). Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends Microbiol.* 24, 51–62. doi: 10.1016/j.tim.2015.10.005

Clemens, D. L., Ge, P., Lee, B.-Y., Horwitz, M. A., and Zhou, Z. H. (2015). Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell* 160, 940–951. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.005

Coulthurst, S. J. (2013). The type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* 164, 640–654. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.017

de Pace, F., Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M. P., Guedes Stehling, E., et al. (2011). Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology* 157(Pt 10), 2954–2962. doi: 10.1099/mic.0.050005-0

Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., et al. (2014). A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS ONE* 9:e89411. doi: 10.1371/journal.pone.0089411

Decoin, V., Gallique, M., Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C. D., Feuilloley, M. G. J., et al. (2015). A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. *BMC Microbiol.* 15:72. doi: 10.1186/s12866-015-0405-9

Deng, Y., Wu, J., Tao, F., and Zhang, L.-H. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem. Rev.* 111, 160–173. doi: 10.1021/cr100354f

Douzi, B., Brunet, Y. R., Spinelli, S., Lensi, V., Legrand, P., Blangy, S., et al. (2016). Structure and specificity of the type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 6:34405. doi: 10.1038/srep34405

Durand, E., Nguyen, V. S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M.-S., et al. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature* 523, 555–560. doi: 10.1038/nature14667

Durand, E., Zoued, A., Spinelli, S., Watson, P. J. H., Aschtgen, M.-S., Journet, L., et al. (2012). Structural characterization and oligomerization of the TssL protein, a component shared by bacterial type VI and type IVb secretion systems. *J. Biol. Chem.* 287, 14157–14168. doi: 10.1074/jbc.M111.338731

Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., et al. (2011). Towards a structural comprehension of bacterial type VI secretion systems: characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar. *PLoS Pathog.* 7:e1002386. doi: 10.1371/journal.ppat.1002386

Flaugnatti, N., Le, T. T. H., Canaan, S., Aschtgen, M.-S., Nguyen, V. S., Blangy, S., et al. (2016). A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* 99, 1099–1118. doi: 10.1111/mmi.13292

Forster, A., Planamente, S., Manoli, E., Lossi, N. S., Freemont, P. S., and Filloux, A. (2014). Coevolution of the ATPase ClpV, the sheath proteins TssB and TssC, and the accessory protein TagJ/HsiE1 distinguishes type VI secretion classes. *J. Biol. Chem.* 289, 33032–33043. doi: 10.1074/jbc.M114.600510

Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., et al. (2017). Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS ONE* 12:e0170770. doi: 10.1371/journal.pone.0170770

Ge, P., Scholl, D., Leiman, P. G., Yu, X., Miller, J. F., and Zhou, Z. H. (2015). Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 377–382. doi: 10.1038/nsmb.2995

Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., and Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* 7, 745–754. doi: 10.1016/j.devcel.2004.08.020

Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., and Filloux, A. (2014). The VgrG proteins are "a la carte" delivery systems for bacterial type VI effectors. *J. Biol. Chem.* 289, 17872–17884. doi: 10.1074/jbc.M114.563429

Hachani, A., Lossi, N. S., and Filloux, A. (2013). A visual assay to monitor T6SS-mediated bacterial competition. *J. Vis. Exp.* 73:e50103. doi: 10.3791/50103

Ho, B. T., Basler, M., and Mekalanos, J. J. (2013). Type 6 secretion system-mediated immunity to type 4 secretion system-mediated gene transfer. *Science* 342, 250–253. doi: 10.1126/science.1243745

Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., et al. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25–37. doi: 10.1016/j.chom.2009.12.007

Hsu, F., Schwarz, S., and Mougous, J. D. (2009). TagR promotes PpkA-catalyzed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72, 1111–1125. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06701.x

Jiang, F., Wang, X., Wang, B., Chen, L., Zhao, Z., Waterfield, N. R., et al. (2016). The *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion PGAP1-like effector induces host autophagy by activating endoplasmic reticulum stress. *Cell Rep.* 16, 1502–1509. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.012

Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., and Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe* 15, 600–610. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.010

Kapitein, N., Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Seyffer, F., Hausser, I., Locker, J. K., et al. (2013). ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Mol. Microbiol.* 87, 1013–1028. doi: 10.1111/mmi.12147

Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., et al. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 6026–6033. doi: 10.1128/JB.00409-06

Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A., and Wendler, P. (2014). Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. *Cell Rep.* 8, 20–30. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.034

Kudryashev, M., Wang, R. Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., et al. (2015). Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell* 160, 952–962. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.037

Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkering, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., et al. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 42, 6811–6825. doi: 10.1093/nar/gku309

Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., et al. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat. Chem. Biol.* 9, 339–343. doi: 10.1038/nchembio.1225

Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x

Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., and Rahme, L. G. (2009). Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155, 2845–2855. doi: 10.1099/mic.0.029082-0

Liang, X., Moore, R., Wilton, M., Wong, M. J. Q., Lam, L., and Dong, T. G. (2015). Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9106–9111. doi: 10.1073/pnas.1505317112

Lin, J., Cheng, J., Chen, K., Guo, C., Zhang, W., Yang, X., et al. (2015). The icmF3 locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:70. doi: 10.3389/fcimb.2015.00070

Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., et al. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat. Commun.* 8:14888. doi: 10.1038/ncomms14888

Logger, L., Aschtgen, M.-S., Guérin, M., Cascales, E., and Durand, E. (2016). Molecular dissection of the interface between the type VI secretion TssM cytoplasmic domain and the TssG baseplate component. *J. Mol. Biol.* 428, 4424–4437. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.032

Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J. J. (2009). Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5, 234–243. doi: 10.1016/j.chom.2009.02.005

Ma, L.-S., Hachani, A., Lin, J.-S., Filloux, A., and Lai, E.-M. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe* 16, 94–104. doi: 10.1016/j.chom.2014.06.002

Maffei, B., Francetic, O., and Subtil, A. (2017). Tracking proteins secreted by bacteria: what's in the toolbox? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:221. doi: 10.3389/fcimb.2017.00221

Miyata, S. T., Unterweger, D., Rudko, S. P., and Pukatzki, S. (2013). Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 9:e1003752. doi: 10.1371/journal.ppat.1003752

Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ. Microbiol.* 13, 3128–3138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x

Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., et al. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526–1530. doi: 10.1126/science.1128393

Mougous, J. D., Gifford, C. A., Ramsdell, T. L., and Mekalanos, J. J. (2007). Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9, 797–803. doi: 10.1038/ncb1605

Nguyen, V. S., Logger, L., Spinelli, S., Desmyter, A., Le, T. T. H., Kellenberger, C., et al. (2015). Inhibition of type VI secretion by an anti-TssM Llama nanobody. *PLoS ONE* 10:e0122187. doi: 10.1371/journal.pone.0122187

Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Cámara, M., et al. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 6676–6683. doi: 10.1128/JB.183.22.6676-6683.2001

Pietrosiuk, A., Lenherr, E. D., Falk, S., Bonemann, G., Kopp, J., Zentgraf, H., et al. (2011). Molecular basis for the unique role of the AAA^+ chaperone ClpV in type VI protein secretion. *J. Biol. Chem.* 286, 30010–30021. doi: 10.1074/jbc.M111.253377

Planamente, S., Salih, O., Manoli, E., Albesa-Jové, D., Freemont, P. S., and Filloux, A. (2016). TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. *EMBO J.* 35, 1613–1627. doi: 10.15252/embj.201694024

Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15508–15513. doi: 10.1073/pnas.0706532104

Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., et al. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1528–1533. doi: 10.1073/pnas.0510322103

Pukatzki, S., McAuley, S. B., and Miyata, S. T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 11–17. doi: 10.1016/j.mib.2008.11.010

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Res. Int.* 2015:759348. doi: 10.1155/2015/759348

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., et al. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* 24, 309–319.

Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., et al. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496, 508–512. doi: 10.1038/nature12074

Saak, C. C., and Gibbs, K. A. (2016). The self-identity protein IdsD is communicated between cells in swarming *Proteus mirabilis* colonies. *J. Bacteriol.* 198, 3278–3286. doi: 10.1128/JB.00402-16

Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., et al. (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. *mBio* 6:e00712-15. doi: 10.1128/mBio.00712-15

Sana, T. G., Flaugnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., et al. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E5044–E5051. doi: 10.1073/pnas.1608858113

Sana, T. G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., et al. (2012). The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 287, 27095–27105. doi: 10.1074/jbc.M112.376368

Santin, Y. G., and Cascales, E. (2017). Domestication of a housekeeping transglycosylase for assembly of a type VI secretion system. *EMBO Rep.* 18, 138–149. doi: 10.15252/embr.201643206

Schuster, M., and Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* 8:287. doi: 10.1186/1471-2164-8-287

Shalom, G., Shaw, J. G., and Thomas, M. S. (2007). In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* 153(Pt 8), 2689–2699. doi: 10.1099/mic.0.2007/006585-0

Sheng, L., Lv, Y., Liu, Q., Wang, Q., and Zhang, Y. (2013). Connecting type VI secretion, quorum sensing, and c-di-GMP production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* through phosphatase PppA. *Vet. Microbiol.* 162, 652–662. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.009

Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., and Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature* 500, 350–353. doi: 10.1038/nature12453

Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., et al. (2017). Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E2233–E2242. doi: 10.1073/pnas.1614902114

Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., et al. (2013). Haemolysin co-regulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol. Cell* 51, 584–593. doi: 10.1016/j.molcel.2013.07.025

Silverman, J. M., Brunet, Y. R., Cascales, E., and Mougous, J. D. (2012). Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 453–472. doi: 10.1146/annurev-micro-121809-151619

Sun, S., Zhou, L., Jin, K., Jiang, H., and He, Y.-W. (2016). Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. *Sci. Rep.* 6:30352. doi: 10.1038/srep30352

Tian, Y., Zhao, Y., Wu, X., Liu, F., Hu, B., and Walcott, R. R. (2015). The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol. Plant Pathol.* 16, 38–47. doi: 10.1111/mpp.12159

Unterweger, D., Kostiuk, B., Otjengerdes, R., Wilton, A., Diaz-Satizabal, L., and Pukatzki, S. (2015). Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* 34, 2198–2210. doi: 10.15252/embj.201591163

Vettiger, A., and Basler, M. (2016). Type VI secretion system substrates are transferred and reused among sister cells. *Cell* 167, 99.e–110.e. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.023

Wang, T., Si, M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., et al. (2015). Type VI secretion system transports Zn^{2+} to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS Pathog.* 11:e1005020. doi: 10.1371/journal.ppat.1005020

Weber, B. S., Hennon, S. W., Wright, M. S., Scott, N. E., de Berardinis, V., Foster, L. J., et al. (2016). Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. *mBio* 7:e01253-16. doi: 10.1128/mBio.01253-16

Wenren, L. M., Sullivan, N. L., Cardarelli, L., Septer, A. N., and Gibbs, K. A. (2013). Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *mBio* 4:e00374-13. doi: 10.1128/mBio.00374-13

Whitney, J. C., Chou, S., Russell, A. B., Biboy, J., Gardiner, T. E., Ferrin, M. A., et al. (2013). Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair. *J. Biol. Chem.* 288, 26616–26624. doi: 10.1074/jbc.M113.488320

Whitney, J. C., Quentin, D., Sawai, S., LeRoux, M., Harding, B. N., Ledvina, H. E., et al. (2015). An interbacterial $NAD(P)^+$ glycohydrolase toxin requires elongation factor Tu for delivery to target cells. *Cell* 163, 607–619. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.027

Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., et al. (2014). Architecture and assembly of the type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1664–1673. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.018

Zoued, A., Cassaro, C. J., Durand, E., Douzi, B., España, A. P., Cambillau, C., et al. (2016a). Structure-function analysis of the TssL cytoplasmic domain reveals

a new interaction between the type VI secretion baseplate and membrane complexes. *J. Mol. Biol.* 428, 4413–4423. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.030

Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y. R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., et al. (2016b). Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature* 531, 59–63. doi: 10.1038/nature17182

Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y. R., Douzi, B., Cambillau, C., et al. (2013). TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *J. Biol. Chem.* 288, 27031–27041. doi: 10.1074/jbc.M113.499772

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Gallique, Bouteiller and Merieau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IV. Article 3

En préparation: Relation between Type VI secretion system and flagellar class IV genes in *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain

Gallique et al., en préparation

La liste définitive des auteurs est encore à définir car cet article est en préparation. Chaque co-auteur doit lire, modifier et faire une analyse critique de l'article avant sa soumission. A cette étape de la rédaction de l'article et du manuscrit de thèse, tous les co-auteurs potentiels ne l'ont pas encore lu. Ainsi cette liste des auteurs apparaît sous forme masquée dans ce mémoire de thèse.

Contexte et importance de l'article 3 :

Lors de l'article 1 portant sur l'inhibition de mobilité liée à la présence de la protéine Hcp1 (Decoin et al., 2015), nous avons montré que MFE01 empêche la souche MFN1032 de se déplacer par « swarming ». Nous avions supposé qu'une toxine pourrait s'accumuler dans le cytoplasme du mutant MFE01Δ*hcp1* ce qui provoquerait la perte de mobilité chez ce mutant. Cependant, le mécanisme d'action de cette inhibition de mobilité restait à élucider. C'est pourquoi nous avons envisagé d'étudier l'impact des mutations de gènes *hcp1* et *tssC* chez MFE01. Aussi au cours de ces travaux, nous étudions en parallèle les phénotypes des mutants MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC*. Ces deux mutants ne sécrètent plus de flagelline, et ont donc perdu leur capacité à se déplacer. D'ailleurs, nous avons montré que l'introduction en *trans* du gène *tssC* chez le MFE01Δ*tssC* ne permet pas de restaurer les phénotypes de mobilité et de mucoïdie mais permet la sécrétion de protéines Hcp. Ceci souligne que la non restauration du phénotype sauvage n'est pas un problème d'expression ou de mutation en dehors du gène *tssC* mais semble plus complexe, comme par exemple un problème de niveau d'expression du gène *tssC* (non suffisant pour secréter le surplus de toxine). Des images de microscopies électroniques obtenues ont été réalisées sur la plateforme de de Microscopie de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM, FR 3479), sous la responsabilité d'Artemis Kosta lors de ma collaboration avec Eric Cascales en Juin-Juillet 2016. La souche sauvage MFE01 possède plusieurs flagelles polaires (jusqu'à trois) tout comme les mutants

MFE01Δ*hcp2* et MFE01Δ*hcp3*, contrairement à MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC* qui sont dépourvus de flagelles. La surproduction du régulateur sigma FliA permet de restaurer la mobilité chez MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC*, qui sont d'ailleurs hyper-mobile sur gélose 0.3% agar (le diamètre de « swim » est plus important par rapport à celui de la souche sauvage). L'expression de *fliA* augmente l'expression du gène codant pour la flagelline ainsi que celle d'autres gènes indispensables à l'assemblage du filament flagellaire, non exprimés chez MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC*. Ces résultats, si l'on considère l'hypothèse de départ, signifieraient que la toxine accumulée dans le cytoplasme des deux mutants inhiberait la production de certaines protéines du filament et/ou l'assemblage de ce dernier, et donc perturberait l'expression des gènes de classe IV du flagelle. Cette phase IV correspond à l'assemblage du filament, appendice extracellulaire propulsant la bactérie. De plus, nous montrons que l'expression du gène codant pour la flagelline est fortement atténuée, voire totalement réprimée chez le mutant MFE01Δ*hcp1*. Enfin, cette étude permet d'expliquer la perte de mucoïdie chez MFE01Δ*hcp1 et* MFE01Δ*tssC*. En effet, chez MFE01 la mutation du gène *fliA* entraîne la perte de la mobilité et du caractère mucoide alors que la surexpression du gène *fliA* chez les mutants MFE01Δ*tssC*, MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*fliA* restaure la mucoïdie et la mobilité. Dans cet article, nous formulons un certain nombre d'hypothèses sur l'action des toxines associées à Hcp1.

Association between the Type VI secretion system and expression of flagellar class IV genes in the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain

Gallique Mathias[1], [redacted] Merieau Annabelle[1]

Author information:
1 : LMSM, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA 4312, IUT d'Evreux, Université de Rouen, Normandy University, Evreux, France
[redacted]

Key words
Type VI secretion system, flagella, FliA, Hcp, motility inhibition, *Pseudomonas fluorescens*

Abstract
Type VI secretion systems (T6SSs) are multiprotein contractile nanomachines that inject toxic effectors into prey bacteria. Several T6SS effectors with antibacterial properties have been described. We previously reported that the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain can protect potato tubers against phytopathogen maceration. We demonstrated that the MFE01 strain has antibacterial activity and can immobilize competitive bacteria through the T6SS. Hcp1 (hemolysin co-regulated protein 1) is involved in the inhibition of motility. Disruption of *hcp1* or the contractile tail gene *tssC* in MFE01 results in the loss of mucoid and motile phenotypes. Here, we established that the MFE01Δ*tssC* mutant is unable to secrete flagellar proteins into the supernatant. Electronic microscopy revealed the absence of flagellar filaments for MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC*. Introduction of the FliA class IV flagellar regulator restored motile and mucoid phenotypes in both MFE01Δ*hcp1*+*fliA* and MFE01Δ*tssC*+*fliA*. Moreover, a *fliA* mutant displayed the same phenotype as MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC*. Transcriptomic analysis showed perturbation of class IV flagellar assembly in these T6SS mutants. Hcp1-associated toxins involved in the immobilization of prey bacteria may accumulate in MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* cytoplasm and specifically perturb class IV flagellar assembly. Hcp1-associated toxins may enable biocontrol by preventing rhizosphere colonization by phytopathogens, as flagella are essential for colonization.

Introduction
Environmental strains must adapt to and conquer ecological niches to survive. During this war, secretion apparatuses are essential for such competition and adaptation. Among these mechanisms, the Type VI Secretion System (T6SS), an inverted bacteriophage like structure (Ho, Dong, and Mekalanos 2014; Leiman et al. 2009), allows bacteria to defend against or

attack target cells using various secreted effectors. T6SS confers a competitive advantage to the producing bacteria by killing target bacteria (Basler, Ho, and Mekalanos 2013; Coulthurst 2013; Hood et al. 2010), recognizing of isogenic cells (Alteri et al. 2013; Cardarelli, Saak, and Gibbs 2015; Wenren et al. 2013) or immobilizing adjacent antagonism (Decoin et al. 2015). T6SS is also involved the uptake of metal ions such as iron, zinc or manganese (Chen et al. 2016; Lin et al. 2017; Si, Zhao, et al. 2017; Si, Wang, et al. 2017; Wang et al. 2015) and probably in bacterial communication (Gallique, Bouteiller, and Merieau 2017). The T6SS apparatus is composed of at least 13 essential conserved proteins (named TssA to TssM, for type six secretion), which constitute the "core component" (Boyer et al. 2009; Silverman et al. 2012). Membrane complex TssJLM anchors T6SS into the bacterial envelope and positions the baseplate complex (Durand et al. 2015). This structure allows a proper contractile tail assembly (Brunet et al. 2015) and may initiate sheath contraction similarly to bacteriophage. Contraction of the sheath surrounding the inner-Hcp proteins tube propels effectors into prey cells or extracellular medium. A ClpV ATPase then recycles sheath sub-units for new firing and the membrane complex can be used to fire a new salvo (Durand et al. 2015).

We previously described *Pseudomonas fluorescens* MFE01, a strain that secretes large amounts of Hcp proteins, a marker of T6SS functionality (Decoin et al. 2014). MFE01 has antibacterial activity against a wide range of competitor bacteria that is associated with the T6SS. Genomic analysis has revealed the existence of a unique T6SS core component locus and at least three orphan *hcp* genes, named *hcp1*, *hcp2* and *hcp3* (Gallique et al., 2017a). The Hcp2 and Hcp3 proteins are directly involved in the killing activity of MFE01 (Decoin et al. 2014; Gallique et al. 2017a). Hcp1 proteins of MFE01 are essential for inhibiting the swarming of prey cells (Decoin et al 2015). Indeed, MFE01 can sequester prey bacteria, under swimming and swarming conditions, whereas the *hcp1* mutant of MFE01, MFE01Δ*hcp1*, cannot. Surprisingly, mutation of *hcp1* has pleiotropic effects on the phenotype of MFE01, affecting its mucoidy and motility (Decoin et al. 2015). It is possible that several effectors that inhibit competitor motility may accumulate in the cytoplasm MFE01*Δhcp1* cells in the absence of Hcp1, inhibiting motility of the mutant strain. Here, we studied the effects of a dysfunctional T6SS on flagellar assembly in the strain MFE01 to better understand the immobilization activity of Hcp1-associated toxins. We thus focused on the association between the T6SS and flagellar filaments in *P. fluorescens* MFE01.

Results and discussion

A functional T6SS and Hcp1 are crucial for inhibiting the swarming of prey bacteria

The clinical *P. fluorescens* MFN1032 strain is motile on 0.6% LB agar medium, in contrast to MFE01, which lacks surfactants essential for swarming (Rossignol et al. 2009).

Figure 1: Effects of *P. fluorescens* MFE01 and its mutants on swarming of competing bacteria. Co-cultures were performed on swarming medium (LB in 0.6% agar) at 28°C for 24 h. MFN1032 can swarm on this medium, but ME01 cannot. Prey cells (MFN1032) were mixed, or not, with *P. fluorescens* MFE01 or its derivatives at a ratio of 1:5. Images shown are representative of three assays.

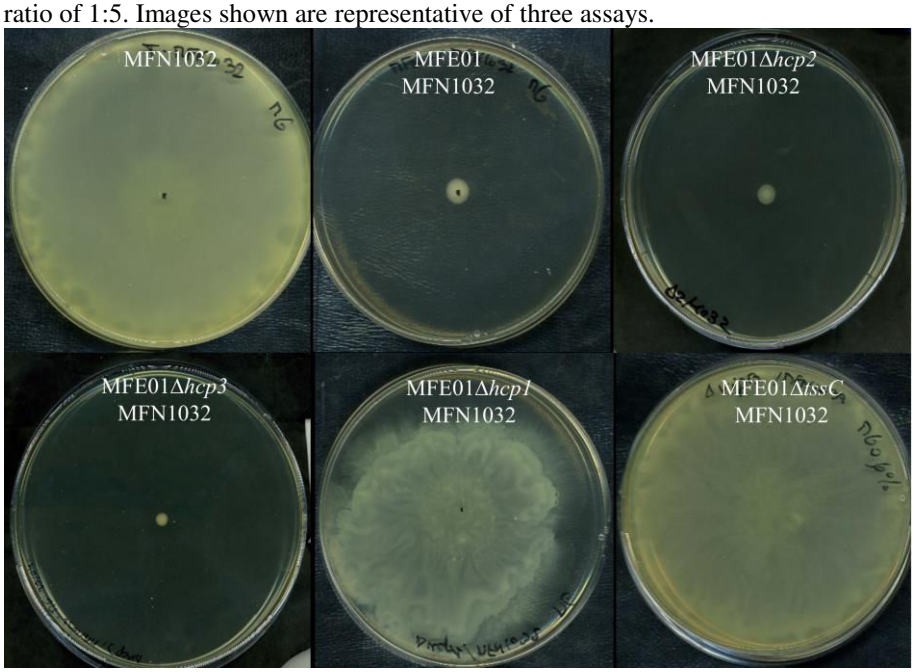
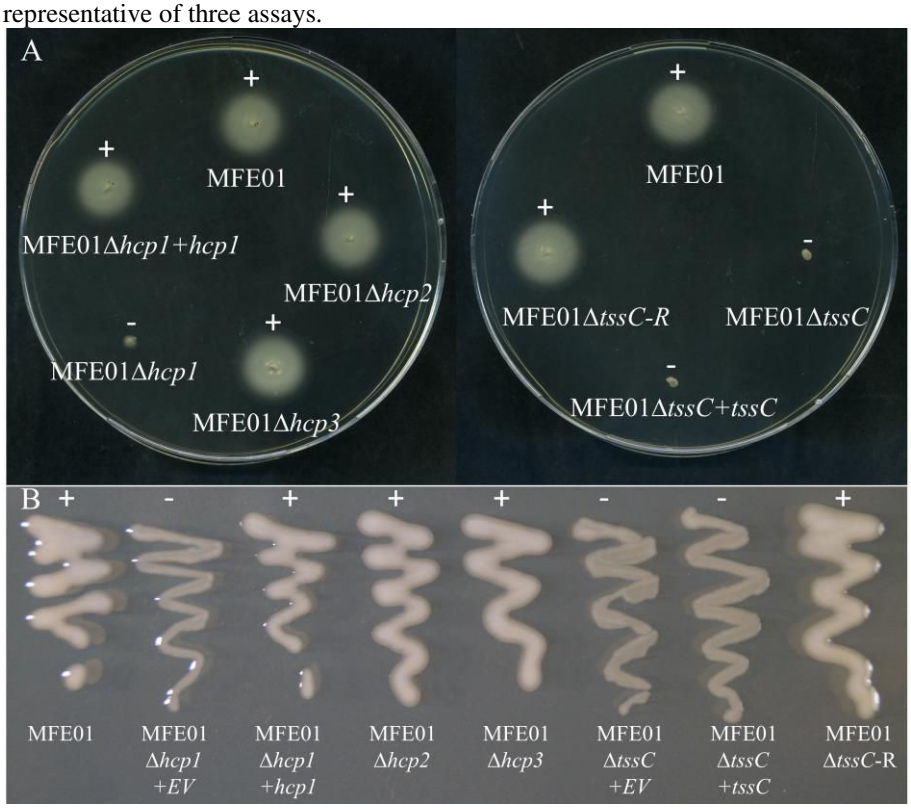


Figure 2: Motility and mucoidy of *P. fluorescens* MFE01 and mutants
A: Swimming motility: Swimming assays were performed on LB in 0.3% agar at 28°C. (n = 3). +: motile, −: non-motile, ++:hypermotile. The images shown are representative of three assays. **B: Mucoid phenotype:**Mucoidy was assessed on LB agar at 28°C. +: mucoid, −: non-mucoid. The images shown are representative of three assays.



Wild type MFE01 inhibited MFN1032 strain swarming. Deletion of *hcp2* did not affect the inhibition of MFN1032 swarming by MFE01, whereas MFE01Δ*hcp1* displayed reduced inhibition of swarming, as previously described (Decoin et al. 2015). Disruption of the *hcp3* gene also did not affect the inhibition of swarming

(Figure 1). The swarming diameter of MFN1032 co-cultured with MFE01Δ*hcp1* was smaller than that of the MFN1032 control because MFE01Δ*hcp1* still has bactericidal activity associated with Hcp2 and Hcp3 proteins (Decoin et al. 2014; Gallique et al. 2017a), slowing the growth of MFN1032 cells. This is consistent with MFN1032/MFE01Δ*tssC* mixed culture results, in which the MFN1032 swarming diameter was identical to that of control. Indeed, we previously demonstrated that the T6SS is non-functional in MFE01Δ*tssC* and that this mutant lacks antibacterial activity (Gallique et al., 2017a; Decoin et al., 2015). These results show a synergistic effect of the three Hcp proteins, which are essential for bacterial competition. However, only Hcp1-associated toxins affected the motility of competing bacteria

MFE01 motility and mucoidy are dependent on Hcp1 secretion

We studied motility on 0.3% LB agar medium and mucoidy of MFE01 mutants. Disruption of the *hcp1* gene caused the loss of both mucoid and motile phenotypes, as previously described (Decoin et al. 2015), which were restored by the *in trans* introduction of *hcp1* into MFE01Δ*hcp1*. Similarly, the T6SS defective strain MFE01Δ*tssC* was nonmotile under swimming conditions and non-mucoid, whereas MFE01Δ*hcp2* and MFE01Δ*hcp3* exhibited wild type phenotypes (motile and mucoid) (Figure 2A and 2B). In MFE01Δ*hcp1*, which is unable to immobilize prey cells during swarming, does not secrete Hcp1-associated toxins into their cytoplasm. It is possible that upon disruption of *hcp1*, Hcp1-related toxins cannot translocate into prey cells, accumulate in the MFE01*Δhcp1* cytoplasm, and inhibit motility. If the loss of motility in MFE01Δ*hcp1* is due to toxin accumulation in the cytoplasm, then Hcp1-associated toxins may target a cytoplasmic protein (Figure 3A and 3B). The phenotypes observed in MFE01Δ*tssC* may also result from the accumulation of Hcp1-associated toxins, similarly to those of the MFE01Δ*hcp1* mutant (Figure 3C). However, insertion of the *tssC* gene *in trans* in MFE01Δ*tssC* did not restore either the motile or mucoid phenotypes (Figure 2). We verified the absence of another mutation outside the *tss*C gene in MFE01Δ*tssC* by reintroducing the native *tssC* gene at its usual chromosomal location to obtain the revertant strain MFE01Δ*tssC*-R. MFE01Δ*tssC*-R was motile and mucoid, demonstrating that an unidentified mutation was not responsible for the complementation failure (Figure 2). It is possible that contraction events may be less active in the MFE01Δ*tssC*+*tssC* than wild type strain. Indeed, Basler et collaborators (Basler, Ho, and Mekalanos 2013) estimated that one T6SS sheath is composed of approximately 1500 sheath subunits. The expression of *tss*C *in trans* in MFE01Δ*tssC*+*tssC* may be insufficient to ensure secretion of all Hcp1-associated toxins.

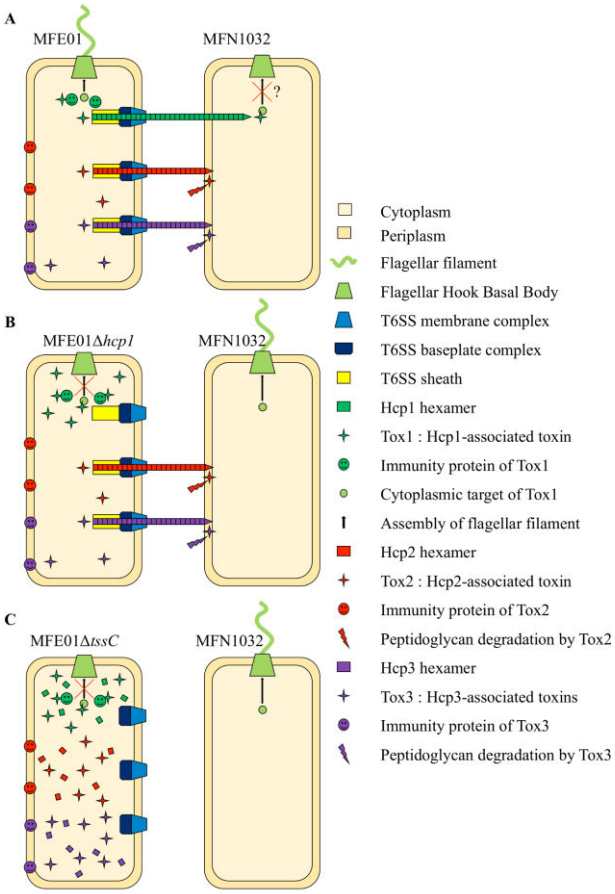
Inactivation of the T6SS apparatus has already been shown to correlate with the loss of motility of enterobacteria, such as the *Escherichia coli* APEC SEPT362 and

.

Figure 3: Hypothetical model for Hcp1-associated toxin accumulation in MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC*.

A: *Pseudomonas fluorescens* MFE01 can kill the competing *P. fluorescens* MFN1032 strain in a T6SS-dependent manner. Both Hcp2 and Hcp3 are involved in the delivery of peptidoglycan-targeting toxins and participate in the antibacterial activity against MFN1032. Hcp1 protein is associated with the inhibition of motility of prey cells. MFE01 immobilizes and kills MFN1032 on 0.6% LB agar medium. **B:** Disruption of *hcp1* abolishes secretion of Hcp1-associated toxins that may accumulate in MFE01Δ*hcp1* cytoplasm. MFE01Δ*hcp1* produces proteins that confer resistance against Hcp1-associated toxins, but their quantity is probably very small relative to the level of the toxins. This may inhibit its own flagellar filament assembly and motility. MFE01Δ*hcp1* is unable to immobilize MFN1032 on 0.6% LB agar medium, but MFE01Δ*hcp1* may still secrete toxins associated with Hcp2 and Hcp3 and thus kill prey cells. This would explain why the swarming diameter of MFN1032 in contact with MFE01Δ*hcp1* is higher than that of the MFN1032/MFE01 control.

C: Inactivation of T6SS abolishes secretion of all T6SS components, including effectors, VgrG, and Hcp proteins. All T6SS-dependent toxins accumulate and only Hcp1-assciated toxins, which may target cytoplasmic proteins, would have a harmful effect on MFE01Δ*tssC*. Although MFE01Δ*tssC* produces proteins that confer resistance against Hcp1-associated toxins, their quantity may be very small relative to the level of the toxins. MFE01Δ*tssC* is consequently unable to immobilize and kill prey bacteria on 0.6% LB agar medium, explaining the similar swarming diameter between MFN1032 in contact with MFE01Δ*tssC* and that of the MFN1032 control.



Citrobacter freundii CF74 strains (Liu et al. 2015; de Pace et al. 2011). The authors of the *E. coli* APEC study concluded that TssM is essential for bacterial motility, but did not provide an explanation for this mechanism (de Pace et al. 2011). Liu *et al.* observed that T6SS mutations, particularly a mutation in the *hcp2* gene, affected the motility of *C. freundii* (Liu et al. 2015). The loss of motility of these two strains may also have been caused by effector accumulation and not only by defects of the T6SS apparatus.

Disruptions of *hcp1* or *tssC* genes abolish both flagellin secretion and filament assembly

We separated supernatant proteins of MFE01 mutants by SDS-PAGE. The MFE01 strain secreted large amounts of Hcp proteins into the supernatant, revealing a functional T6SS (Figure 4). We separated supernatant proteins of MFE01 mutants by SDS-PAGE. The MFE01 strain secreted large amounts of Hcp proteins into the supernatant, revealing a functional

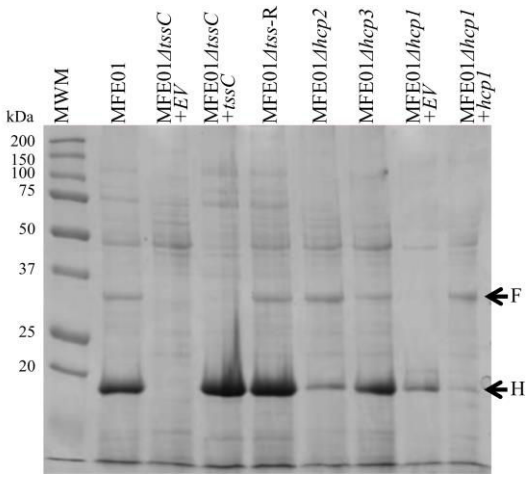


Figure 4: Hcp and flagellin secretion of *P. fluorescens* MFE01 and mutants. Concentrated supernatants of late exponential phase cultures, grown at 28°C, were analysed by SDS-PAGE (15% separation gel) and Coomassie staining. Bands, indicated by arrows and labelled H and F, were identified by Mass spectrometry as Hcp and flagellin proteins, respectively. MWM: molecular weight marker.

T6SS. Surprisingly, overproduction of Hcp1 in MFE01Δ*hcp1+hcp1* reduced secretion of all Hcp proteins, as we observed less Hcp proteins in the supernatant than for the MFE01Δ*hcp1* mutant (Figure 4). This suggests that Hcp1 overproduction affects Hcp protein secretion. It is possible that a high concentration of Hcp1 protein in the cytoplasm perturbs T6SS assembly. Hcp proteins were not secreted by the MFE01Δ*tssC* mutant (Figure 4). The T6SS was functional in MFE01Δ*tssC+tssC* because Hcp proteins were normally secreted. This is consistent with the restoration of antibacterial activity we already described for this strain (Gallique et al. 2017a).

As previously described, an approximately 30kDa band was identified in MFE01 supernatant as flagellin by Mass spectrometry and was absent from the supernatant of MFE01Δ*hcp1* (Decoin et al. 2015). We did not detect flagellin in either MFE01Δ*tssC* or MFE01Δ*tssC+tssC* strain supernatants (Figure 4). Flagellin is the major component of flagella, extracellular appendices anchored to bacteria, which provide motility Flagellin was properly secreted by both MFE01Δ*hcp2* and MFE01Δ*hcp3* mutants into the supernatant, emphasizing that perturbation of flagellin secretion was specific to Hcp1 protein secretion (Figure 4). These results are consistent with the loss of motility of MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* under swimming conditions, in contrast to MFE01Δ*hcp2* and MFE01Δ*hcp3* (Figure 2). Although Hcp secretion was perturbed in the MFE01Δ*hcp1+hcp1* strain, flagellin was properly secreted (Figure 4). This appears to contradict the absence of flagellin secretion in the absence of Hcp1-associated toxin secretion in MFE01Δ*hcp1*. However, Hcp1 production in the MFE01Δ*hcp1+hcp1* strain may be sufficient to allow a direct interaction of Hcp1-associated toxins with the Hcp1-ring lumen (Silverman et al. 2013), inhibiting their detrimental effect on the flagellar filament assembly. We examined the various mutants by electron microscopy to confirm the perturbation of flagellar assembly (Figure 5). The MFE01 wild type strain had up to three polar flagella and disruption of *hcp2* or *hcp3* did not affect their number. As expected, we observed no flagella in MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*tssC*, or MFE01Δ*tssC+tssC*. However, MFE01Δ*hcp1+hcp1* had the same number of flagella as MFE01.

FliA restores motility and mucoidy of MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* mutants

Schulz and coworkers demonstrated that there is crosstalk among sigma factor-associated networks in *Pseudomonas*

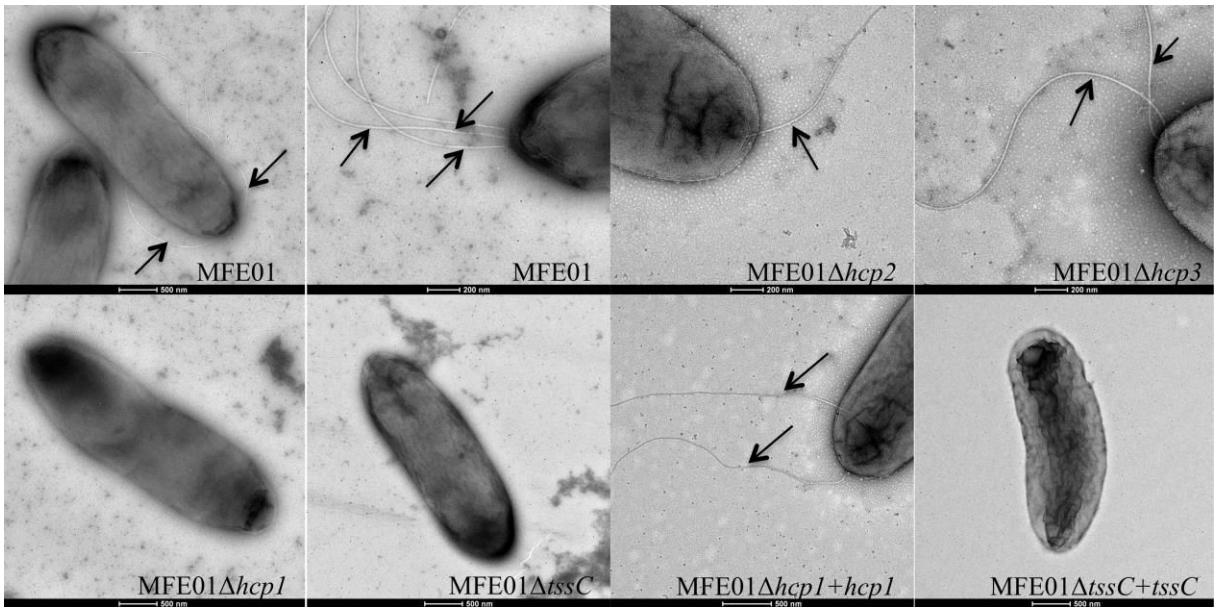


Figure 5: Flagella of *P. fluorescens* MFE01 and derivatives. Transmission electron microscopy images of bacteria grown at 28°C on LB medium (negative stain). Arrows indicate flagellum.

aeruginosa (Schulz et al. 2015). FliA controls the expression of genes in several functional categories, including chemotaxis, motility, and attachment, as well as secreted factors whose alginate.

Over-expression of *fliA* restored both motile and mucoid phenotypes in MFE01Δ*tssC* and MFE01Δ*hcp1* mutants (Figure 6A and 6B) and its overproduction conferred a hyper-motile phenotype in both mutants and wild type strain (Figure 6 B). Moreover flagellin secretion was restored in MFE01Δ*hcp1*+*fliA* (Figure 6C) and in MFE01Δ*tssC*+*fliA* (Figure S1). There are two possible explanations for these phenotypes: (i) the flagella of the over-expressing stains are more active than in wild type, as FliA controls the expression of chemotaxis genes (which control flagellar activity and rotation) and those of the flagellar proton channel MotA/MotB (flagellar rotation is fueled by the proton motive force) or (ii) FliA overexpression increases the number of flagella. Electron microscopy observation confirmed an increase in the number of flagella upon FliA overproduction in MFE01, MFE01Δ*hcp1,* or MFE01Δ*tssC* (Figure 6D*)*. We thus focused on the effect of *fliA* disruption in the MFE01 strain. As expected, MFE01Δ*fliA* was non-motile and non-mucoid and both phenotypes were restored after introduction of *fliA* into this mutant (Figure 7 A and 7B). Moreover, supernatants of MFE01Δ*fliA*+*fliA* showed flagellin secretion whereas supernatants of MFE01Δ*fliA* did not (Fig 7C).

FliA-dependent flagellar assembly may be attenuated in MFE01Δ*hcp1*

Flagellar gene expression in *P. aeruginosa* is controlled in a four-tiered (called classes I to IV) hierarchy of transcriptional regulation (Dasgupta et al. 2003). Transcriptional regulators, including RpoN, FliA, FleR and FleQ, finely control the expression of flagellar genes needed for the coordinated assembly of flagella. FliA, also called sigma factor σ28, acts as checkpoint permitting the transition of flagella from class III (hook-based-body)

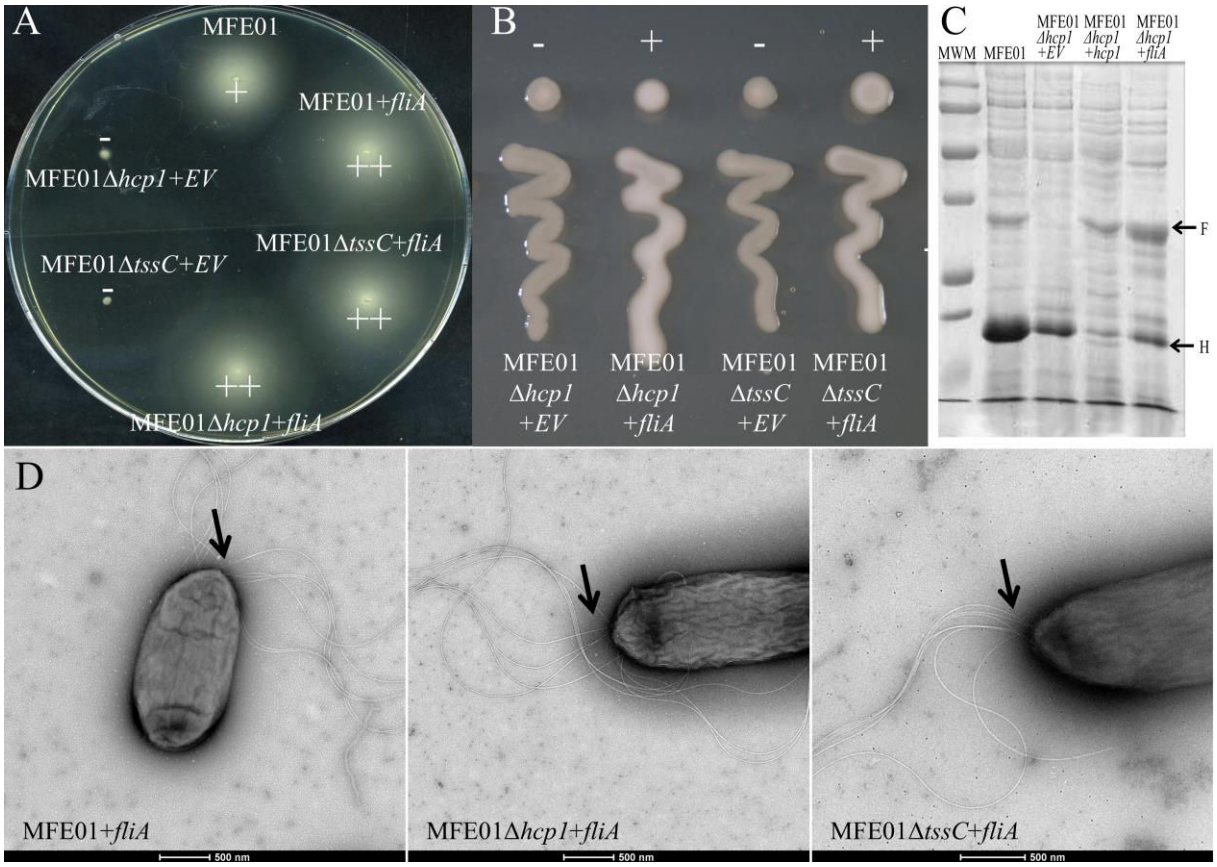


Figure 6: Phenotypes of MFE01 and derivatives after *fliA* introduction. A: Swimming motility. Swimming assays were performed on LB in 0.3% agar at 28°C. (n = 3). +: motile, −: non-motile, ++:hypermotile. The images shown are representative of three assays. **B: Mucoid phenotypes.** Mucoidy was assessed on LB agar at 28°C. +: mucoid, −: non-mucoid. The images shown are representative of three assays. **C: Hcp and flagellin secretion by *P. fluorescens* MFE01 Δ*hcp1* after *fliA* introduction.** Concentrated supernatants of late exponential phase cultures, grown at 28°C, were analysed by SDS-PAGE (15% separation gel) and Coomassie staining. Bands, indicated by arrows and labelled H and F, were identified by Mass spectrometry as Hcp and flagellin proteins, respectively. MWM: molecular weight marker. **D: Flagella of *P. fluorescens* MFE01 and derivatives after *fliA* introduction**.Transmission electron microscopy images of bacteria grown at 28°C on LB medium (negative stain). Arrows indicate multiple flagella.

to class IV (filament) (Figure S2). The sigma factor FliA binds to RNA polymerase and recognizes sites 35 and 10 base pairs upstream of target genes. Thus, FliA specifically activates expression of flagellar class IV genes located downstream of specific promoters. FliA allows control of flagellar filament assembly by regulating, for example, expression of genes coding for flagellin (*flaA* or *fliC*), the chaperone FlgN, the antisigma FlgM and MotA and MotB (stator). In contrast, in the *P.aeruginosa* PAK strain, the transcription of genes coding for flagellin export chaperone FliS and capping protein FliD (and its chaperone FliT also named FliS') is not controlled by FliA, but by both RpoN and FleQ (Dasgupta et al. 2003). In the *Pseudomonas putida* KT2440 strain, FliS and FliD are produced under the control of FliA, and *fliS* and *fliD* are down-reglated in a *fliA* mutant(Rodríguez-Herva et al. 2010). These examples highlight the

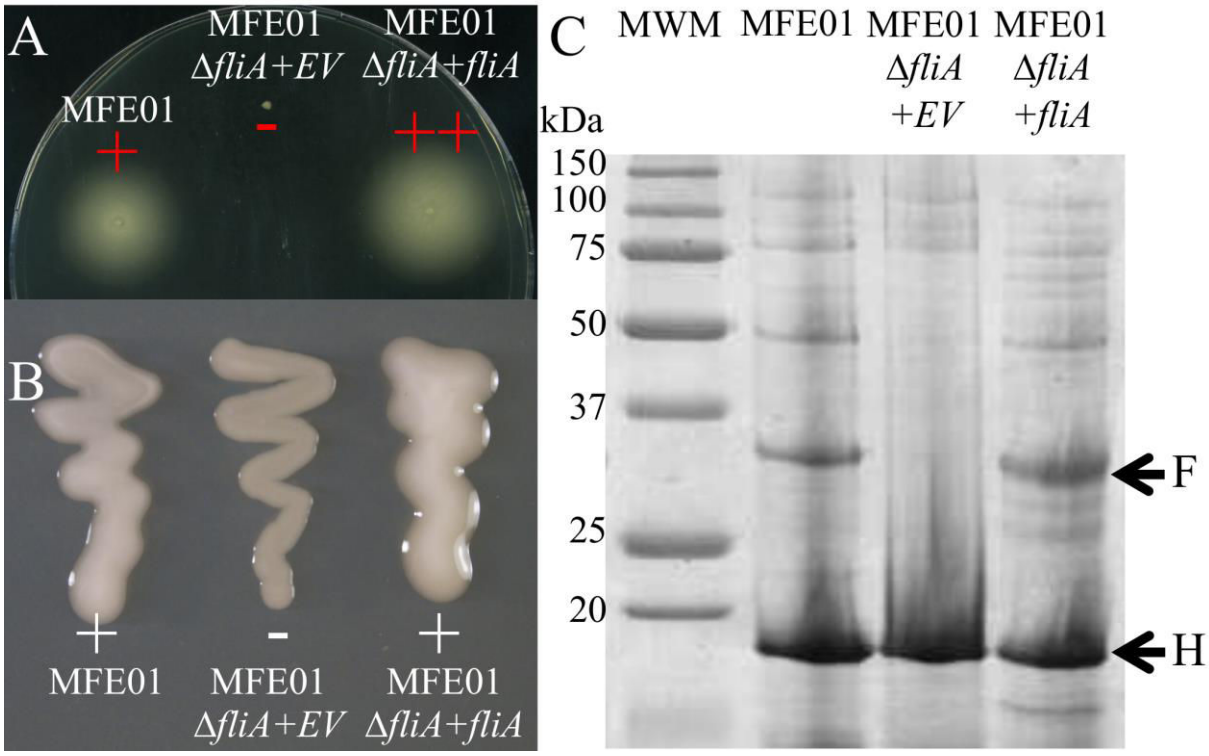


Figure 7: Phenotypes of MFE01 after *fliA* deletion

A: Swimming motility. assays were performed on LB in 0.3% agar at 28°C. (n = 3). +: motile, −: non-motile, ++: hypermotile. Images shown are representative of three assays. **B: Mucoid phenotypes.** Mucoidy was assessed on LB agar at 28°C. +: mucoid, −: non-mucoid. The images shown are representative of three assays. **C: Hcp and flagellin secretion**.Concentrated supernatants of late exponential phase cultures, grown at 28°C, were analysed by SDS-PAGE (15% separation gel) and Coomassie staining. Bands indicated by arrows and labelled H and F were identified by Mass spectrometry as Hcp and flagellin proteins respectively. MWM: molecular weight marker.

differences in regulation of FliS, FliD, and FliT production by *P. aeruginosa* and *P. putida.*

In *P. aeruginosa*, the antisigma factor FlgM negatively regulates class IV gene expression, interacting directly with FliA (Frisk et al. 2002). Such sequestration of FliA by FlgM leaves no free FliA available for class IV gene expression. Upon proper assembly of the flagellar hook basal body, FlgM is secreted and FliA is free to interact with RNA polymerase and promote class IV gene expression. Flagellin protein is encoded by the *flaA* gene, which corresponds to a class IV hierarchy gene of which the expression is controlled by the FliA sigma factor. . Little information is available concerning flagellar assembly in *Pseudomonas fluorescens* species. In the *Pseudomonas fluorescens* F113 strain, Redondo-Nieto and collaborators studied the transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament (Redondo-Nieto et al. 2008).They concluded that *fliC* (f*laA*) transcription is regulated both by FliA and RpoN /FleQ. In this study, no putative fliA promoter were found upstream of the *fliS* and *fliT* genes. FliA controls the expression of *flgZ* in the F113 strain (Martinez-Granero et al. 2014).

If the regulation of flagellar assembly is the same in *P. fluorescens* MFE01 as in *P. aeruginosa*, the restoration of motility in MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* by

overexpression of *fliA* would suggest specific class IV protein perturbation upon disruption of *hcp1* or *tssC*. Thus, disruption of Hcp1-dependent secretion may have no impact on hook basal body assembly (class III), as FliA controls only class IV gene expression.

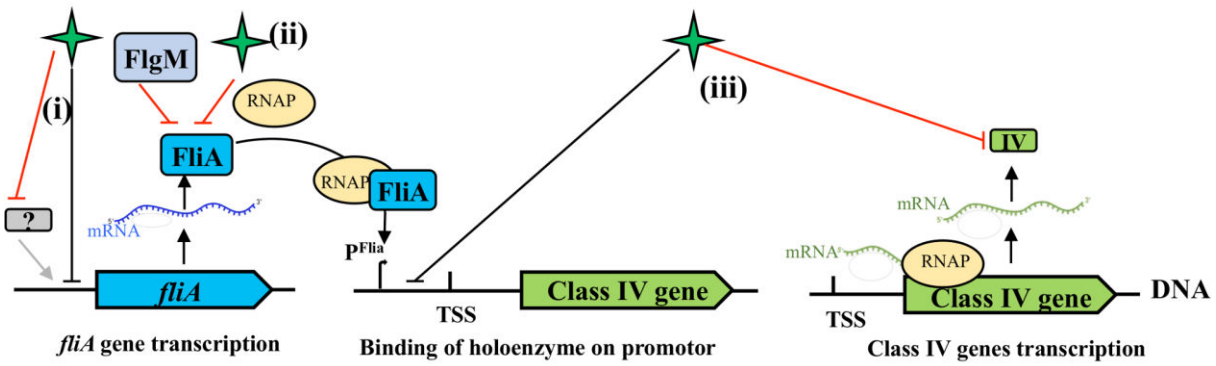


Figure 8: Putative model of the action of Hcp1-associated toxins on a hypothetical target. (i) Hcp1-associated toxins may inhibit transcription of *fliA,* the regulator of class IV flagellar genes, either by inhibiting the FliA activator or by binding to the *fliA* promoter region. Without FliA, there is no transcription of genes encoding proteins essential for flagellar filament assembly. (ii) Hcp1-associated toxins may directly interact with FliA proteins as an anti-sigma factor, such that there is no free FliA, and the class IV genes are not transcribed. (iii) Hcp1-associated toxins may inhibit transcription of class IV genes by interacting with a FliA-dependent promoter locus or directly with class IV protein(s). Overexpression of *fliA in trans* can counteract toxin perturbation if its level is sufficiently high. Green star: Hcp1-associated toxin; IV: a class IV protein; RNAP: RNA polymerase; TSS: Transcriptional Start Site; P^{FliA}: FliA-dependent promoter. Black lines represent a binding to DNA and red lines a protein-protein interaction. Grey arrows represent transcriptional activation by the unknown FliA activator (grey box). Black arrows represent both transcription and translation.

Thus, it is possible that: (i) Hcp1-associated toxins inhibit *fliA* transcription by inactivation of a *fliA* transcriptional activator or by binding to the *fliA* promotor locus, (ii) Hcp1-associated toxins interact directly with FliA proteins, impairing class IV flagellar gene transcription, or (iii) Hcp1-associated toxins act on one class IV flagellar protein (Figure 8).

FliA activates transcription of flagellar class IV genes in MFE01 strain

Flagellar biosynthesis is differently regulated in different *Pseudomonas* strains (Redondo-Nieto et al., 2008). We studied the relative expression of several flagellar genes between MFE01 and MFE01Δ*fliA* to elucidate FliA-dependant gene transcription in *P. fluorescens* MFE01. The functions of the proteins encoded by these genes are listed in Table S1. We used the consensus motif (TAAAGTTT-N11-GCCGATAA), corresponding to promoters recognized by FliA (Frisk et al. 2002)), to search for putative promoters upstream of flagellar genes in MFE01. Sequences corresponding to putative consensus sequences of FliA promoters were found upstream of the *flaA*, *fliS*, *flgM* and *motA* genes (Figure 9A). A sequence logo corresponding to the four putative promoters using Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) is show Figure 9B.

Disruption of the *fliA* gene significantly decreased transcription of *flgM*, *flaA*, *flaG*, *flgN*, *flgZ* and *motA* (Figure 9 C). In this

experiment, the primers used for *fliA* were located downstream of the *fliA* deletion, explaining the absence of decrease in *fliA* transcription in MFE01Δ*fliA*. Introduction of *fliA* in MFE01Δ*fliA* increased the expression of the previously cited genes as well as *fleQ*, *fliA*, *flgE*, *fliD, fliT,* and *motA*, relative to the mutant strain.

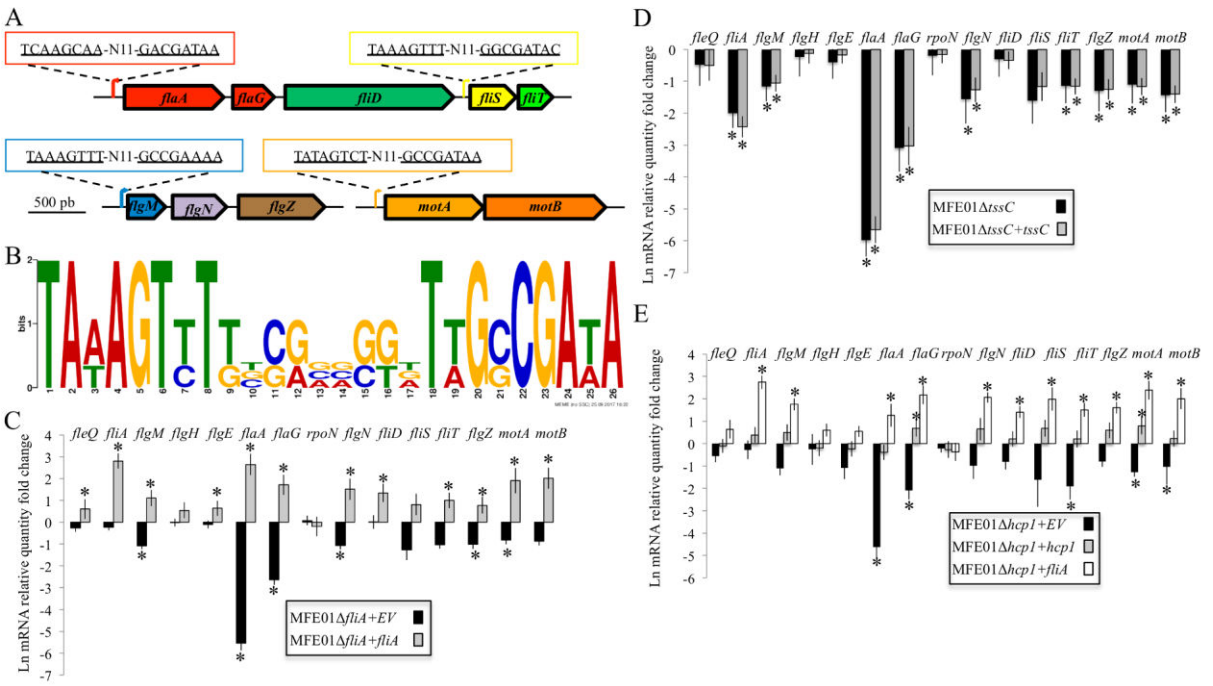


Figure 9: Transcription of flagellar genes in MFE01 and derivatives

A: Putative promoters upstream flagellar genes. A consensus motif (TAAAGTTT-N11-GCCGATAA) corresponding to promoters recognized by FliA (Frisk et al. 2002) was used to search for promoter upstream of flagellar genes in MFE01. Sequences corresponding to putative promoters are indicated.

B: MEME sequence logo of the four putative promoters motif. The sequence logo generated by Multiple Em for Motif Elicitation (MEME), corresponding to the four putative promoters, is shown. **C: Flagellar gene expression in MFE01Δ*fliA* and MFE01Δ*fliA*+*fliA*. D: Flagellar genes expression in MFE01Δ*tssC* and MFE01Δ*tssC*+*tssC*. E: Flagellar gene expression in MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp1*+*fliA*, and MFE01Δ*hcp1*+*fliA*.**

mRNA levels are relative to those obtained in MFE01. Relative levels of gene expression were calculated using DataAssistTM software (v3.01) and are based on the comparative CT (2–ΔΔCT) method. The ln of the relative levels was calculated to optimize the representation. Statistical analyses were performed on relative level differences > two-fold (ln approx. 0.7) using the two-tailed t-test: $*P < 0.02$; n = 6

Their relative transcription was considerably higher that of the wild type strain. Overexpression of *fliA in trans* promoted strong class IV genes expression, which could explain the hypermotile phenotype observed for MFE01Δ*fliA*+*fliA*. Such FliA-dependent class IV gene expression is required for flagellar filament assembly, explaining the loss of motility of the MFE01Δ*fliA* mutant. Deletion of *fliA* also affected the mucoid phenotype, suggesting FliA regulation of mucoidy-associated genes in the MFE01 strain, as described for *P. aeruginosa* (Schulz et al. 2015).

The T6SS core component is associated with the motility phenotype and affects the expression of flagellar genes in *C. freundii*

and *E.coli* APEC (Liu et al. 2015; de Pace et al. 2011). Thus, we assessed whether flagellar gene expression was affected in MFE01Δ*tssC* (Figure 9D). The flagellar assembly cascade is differently regulated between enterobacteria (lateral flagella) and *Pseudomonadaceae* (polar flagella) (Soutourina and Bertin 2003). In *E. coli*, FliA positively regulates the transition to class III and FlhC and FlhD are transcriptional activators of the class II gene expression. De Pace *et al.* showed that, *fliA*, as well as *flhC* and *flhD,* gene expression was decreased in a Δ*icmF E. coli* strain (a *tssM* mutant) (de Pace et al. 2011). Here, disruption of *tssC strongly* decreased class IV genes transcription in MFE01Δ*tssC*, including *fliA*. In *Pseudomonas aeruginosa*, FleQ is the master regulator of flagellar biogenesis and RpoN controlled transition from class II to class III (Dasgupta et al. 2003). The expression of *fleQ* and *rpoN* genes was not affected in MFE01Δ*tssC,* suggesting specific perturbation of class IV gene expression. The profile of flagellar gene expression was comparable to that of MFE01Δ*fliA*. This suggests that TssC is required for proper filament assembly, but not that of the hook basal body. There are two possible mechanisms to explain the inhibition of *fliA* transcription: (i) inactivation of the T6SS machinery indirectly affects flagellar regulation or (ii) an Hcp-1 dependent toxin inhibits *fliA* transcription. Introduction of the *tssC* gene in MFE01Δ*tssC* did not reestablish wild type transcription of all class IV flagellar genes, consistent with phenotypic observations.

Transcription of the *flaA* gene, encoding flagellin, was strongly reduced in *MFE01Δhcp1* as was that of *flaG, fliT, motA, and motB,* but not as strongly (Figure 9E). Introduction of the *hcp1* gene restored gene expression, consistent with the recovery of motility of MFE01Δ*hcp1*+*hcp1*. The expression of class IV genes also increased in MFE01Δ*hcp1*+*fliA*, confirming that transcription of these genes was controlled by the FliA factor. There was no decrease of *fliA* transcription in MFE01Δ*hcp1*. It is possible that one of the Hcp1-associated toxins, which perhaps accumulates in MFE01Δ*hcp1* cytoplasm, may be a protein that specifically interacts with FliA, thus preventing the RNA polymerase from transcribing class IV flagellar genes.

Conclusion

Here, we focused on the correlation between T6SS and flagella. The MFE01 strain produces toxins that can inhibit the swarming of competing prey cells. Inactivation of Hcp1 production or T6SS function abolishes the ability of MFE01 to immobilize MFN1032 and renders them non-motile. We highlight the putative impact of Hcp1-associated toxins on flagellar class IV expression. These toxins have yet to be identified.

Several *Pseudomonad* strains have been shown to be potential biocontrol agents (Weller 2007). *P. fluorescens* MFE01 and *P. putida* KT2440 can protect plants in a T6SS-dependant manner against several phytopathogens, including *Pectobacterium atrosepticum* or *Xanthomonas campestris* under *in planta* conditions (Bernal et al. 2017; Decoin et al. 2014). MFE01 is responsible for suppressing tuber soft rot caused by *P. atrosepticum* (Decoin et al. 2014). The MFE01 strain has antibacterial activity due to its Hcp2 and Hcp3 proteins (Decoin et al. 2014; Gallique et al. 2017a) and can immobilise prey cells through the control of the Hcp1 proteins of the T6SS.

In the rhizosphere, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) protect plant roots from phytopathogens and are beneficial for root growth (Haas and Défago 2005). The root system produces several exudates which provide nutrients and a rich source of energy for bacteria. Bacterial motility is important for colonization and flagella are crucial for root colonization for both PGPR (Barahona et al. 2016; Capdevila et al. 2004; De Weger et al. 1987) and for phytopathogens (Jahn, Willis, and Charkowski 2008). Hcp1-associated toxins that inhibit motility would be a strategical weapon in the protection of plants from phytopathogens preventing colonization via their flagella.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

All the strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All strains were grown in LB (Luria Bertani) medium with shaking (180 rpm). *P. fluorescens* strains were grown at 28°C. *E. coli* strains were grown at 37°C. Media were supplemented with antibiotics, as appropriate: 15 µg/ml tetracycline (Tc); 15 µg/ml (*E. coli*) or 50 µg/ml (*P. fluorescens*) gentamycin (Gt), 50 µg/ml (*E. coli*) or 200 µg/ml (*P. fluorescens*) kanamycin (Km), 30 µg/ml chloramphenicol (Cm) (*E.coli*), or 100 µg/ml ampicillin (Amp) (*E. coli*).

Culture supernatant proteins analysis

Overnight cultures (25 ml) were centrifuged at 7,000 x *g* for 5 min at room temperature and the supernatants filtered through a Millipore membrane with 0.22-µm pores. Trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich) was added to the filtered supernatants to a final concentration of 10% and they were incubated overnight at 4°C. The supernatant was removed by centrifugation at 13,000 x *g*, for 30 min at 4°C. The pellet was washed twice with 5 ml cold 100% acetone (Merck) (without resuspending the pellet) and centrifuged at 13,000 x *g*, for 30 min at 4°C. The protein pellet was dried for 30 min at 4°C and resuspended with distilled water. Supernatant proteins were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Samples were mixed with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer with β-mercaptoethanol before loading.

Swimming motility

Strains were grown overnight and centrifuged at 7 000 x *g*, for 5 minutes at room temperature. Biomass was spotted onto 0.3% agar LB plates with a sterile toothpick and incubated at 28°C overnight.

Swarming inhibition assay

After overnight culture, the OD_{580nm} of the cells was adjusted to 0.5. Then, MFE01 or mutants were mixed with the MFN1032 strain at a ratio of 5:1 and 5 µl spotted onto 0.6% agar LB plates. The plates were incubated at 28°C overnight.

Antibacterial competition assay

The antibacterial competition assay was performed as described by Decoin *et al.* (Decoin et al. 2015).

Disruption of the *fliA* gene in *P. fluorescens* MFE01 strain

Each PCR was performed under standard conditions using Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). *fliA in-frame* disruption, obtained by central deletion of 411 bp, was achieved by PCR with muta1-fliA-F and muta2-fliA-ecoRI-R primers (named amplicon A, > 650-bp product) or muta3-fliA-EcoRI-F and muta4-fliA-R primers (named amplicon B, > 700-bp product) (Table 2). The PCR products corresponded to the upstream and downstream parts of the MFE01*fliA* gene, each carrying an *EcoRI* restriction site at the end. PCR parameters were as follows: 55°C for X s, 72°C for 45 s; 30 cycles. Both A and B amplicons were digested by *EcoRI* (NEB) and ligated with T4 DNA ligase (NEB). A third PCR was then carried out with muta1-fliA-F and muta4-fliA-R primers. The PCR parameters were as follows: 55°C for X s, 72°C for 90 s; 35 cycles. The resulting disrupted *fliA* construct was introduced into the pAKE604 suicide vector, previously digested by *SmaI* (blunt-ended), and ligated with T4 DNA ligase (NEB). This construction was verified by sequencing and introduced into the *E. coli* S17-1 strain (Simon et al., 1983). The recombinant plasmid was transferred by biparental mating: recipient MFE01 and the S17-1 strain containing pAKE604Δ*fliA* were mixed at a 1:1 ratio and spotted onto LB agar medium and incubated at 37°C overnight. The biomass mixture was resuspended in 1 ml sterile physiological saline and 0.1 ml of the cell suspension spread on LB agar plates supplemented with rifampicin (50 µg/ml, for

MFE01 selection and *E. coli* S17-1 killing) and kanamycin (200 µg/ml, for selection of cells containing recombinant plasmid) and incubated at 28°C for 48 h. Colonies were isolated on LB agar plates supplemented with 10% sucrose to select the second homologous recombinants. The resulting *fliA* mutant was verified by DNA sequencing and named MFE01Δ*fliA*.

Table 1: Strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Reference/source
P. fluorescens		
MFE01	Air isolate, Rif^R	(Decoin et al. 2014)
MFE01+*fliA*	MFE01 with pPSV35 carrying the wild-type *fliA* gene, Gm^R	This study
MFE01Δ*hcp1*+EV	MFE01 with *hcp1* disruption carrying the empty pPSV35, Tc^R and Gm^R	(Decoin et al. 2015)
MFE01Δ*hcp1*+*hcp1*	MFE01Δ*hcp1* with pPSV35 carrying the wild-type *hcp1* gene, Tc^R and Gm^R	(Decoin et al. 2015)
MFE01Δ*hcp1*+*fliA*	MFE01Δ*hcp1* with pPSV35 carrying the wild-type *hcp1* gene, Tc^R and Gm^R	This study
MFE01Δ*hcp2*	MFE01 with early stop codon in *hcp2*	(Decoin et al. 2014)
MFE01Δ*hcp3*	MFE01 with central disruption in *hcp3* gene	(Gallique et al. 2017a)
MFE01Δ*tssC*+EV	MFE01 with *tssC* central disruption carrying the empty pPSV35, Tc^R and Gm^R	(Gallique et al. 2017a)
MFE01Δ*tssC*+*tssC*	MFE01Δ*tssC* with pPSV35 carrying the wild-type *tssC* gene, Gm^R	(Gallique et al. 2017a)
MFE01Δ*tssC*+*fliA*	MFE01Δ*tssC* with pPSV35 carrying the wild-type *fliA* gene, Gm^R	This study
MFE01Δ*fliA*+EV	MFE01 with *fliA* central disruption carrying the empty pPSV35, Gm^R	This study
MFE01Δ*fliA*+*fliA*	MFE01Δ*fliA* with pPSV35 carrying the wild-type *fliA* gene, Gm^R	This study
MFN1032	Clinical strain	(Chapalain et al. 2007)
E. coli		
S17.1	RP4-2-Tc::Mu, *aph*::Tn7, recA, SmR, donor strain for conjugation	(Simon, Priefer, and Pühler 1983)
Top10®	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ *lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*araleu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G	ThermoFischer Scientific
Plasmid		
pPSV35	*P. aeruginosa oriV*, *lacIq mob*+, P*lac*UV5, pUC18 MCS, expression vector, Gm^R	(Rietsch et al. 2005)
pAKE604	Conjugative suicide vector, Ap^R, Km^R, oriT, *lacZ*, *sacB*	(El-Sayed, Hothersall, and Thomas 2001)

Insertion of the *fliA* gene into pPSV35

The *fliA* gene was amplified from the *P. fluorescens* strain MFE01 using Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB) and fliA-EcoRI-F and fliA-XbaI-R primers (Table 2) under the following PCR conditions: 60°C for X s, 72°C for 50 s; 30 cycles. The amplified fragment and the pPSV35 shuttle vector (Rietsch et al., 2005) were digested with *Eco*RI and *Xba*I (NEB), to generate cohesive ends, and the *fliA* gene inserted into pPSV35 by ligation. The resulting plasmid, pPSV35-*fliA*, was used to transform *E. coli* Top10® cells by thermal shock. Plasmid DNA was isolated using the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) and verified by PCR with plasmid-specific primers.

Construction of strains MFE01Δ*fliA*+*fliA*, MFE01+*fliA* MFE01Δ*hcp1*+*fliA* or MFE01Δ*tssC*+*fliA*

Fresh colonies of MFE01, MFE01Δ*fliA*, MFE01Δ*hcp1* or MFE01Δ*tssC* were washed twice with 1 mL cold sterile water before transformation with 5 µL pPSV35-*fliA* by electroporation in 1-mm electroporation cells at 1.8 KV for 5 milliseconds (Savant GTF100 Gene Transformer). LB was added and the mixture incubated at 28°C for 1 h with shaking (180 rpm). Transformed bacteria were then selected by plating on LB agar supplemented with gentamycin and IPTG.

Table 2: Oligonucleotides used in this work

Mutagenesis primers	**Primer sequence (5'→3')**
muta1-fliA-F	ACACTGGCCGACGTTATC
muta2-fliA-EcoRI-R	TAATAAGAATTCGTAAAGATTCATGCCACTGG
muta3-fliA-EcoRI-F	TAATAAGAATTCCTGTTCAGTTTCGACGAC
muta4-fliA-R	CTTCAGCAGTCACCATCAA
muta1-tssC-F	CTGAGACTCCAGTAGCCAAG
muta4-tssC-R	ATGTCATTGAGATCGGGCAA
fliA-EcoRI-F	TAATAAGAATTCGGCATCTGGAATTTTTCGT
fliA-XbaI-R	TAATAATCTAGATCCCCACACTGCCTTCA
qRT-Primers	**Primer sequence (5'→3')**
qRT-PCR-RecA-F	AAGGGTGCCGTAATGCGTAT
qRT-PCR-RecA-R	ATATCCAGACCCAGAGAGCCAGTA
qRT-PCR-FleQ-F	CATCGCGAACCCAATCTGT
qRT-PCR-FleQ-R	GGCCACTTGCTGCATCATCT
qRT-PCR-FlgH-F	TCACCATCACCCTGAACGAA
qRT-PCR-FlgH-R	GCCGAACAACGAGGTCAGA
qRT-PCR-FlgE-F	AGCACGCCGATCTATGACACT
qRT-PCR-FlgE-R	TTCCAGGTATTCTCGCCAGTCT
qRT-PCR-FliA-F	CTGGTGTTGGCGCTGTACTAC
qRT-PCR-FliA-R	GCCAAGGACTTCACCGATTT
qRT-PCR-FlgM-F	GTACCAGCAACGCCAAGGAA
qRT-PCR-FlgM-R	TGTACCGACTCCCCGCTTT
qRT-PCR-FlaA-F	ACACCCAGGCCATCCAGAA
qRT-PCR-FlaA-R	TGCAGGATGTCGGTCGAA
qRT-PCR-FlaG-F	GCTGCCAAGAGACAGGATACG
qRT-PCR-FlaG-R	AACTCCAGATTACGCTTGATCGA
qRT-PCR-RpoN-F	ACTGGTCGCAGCGGAAAAT
qRT-PCR-RpoN-R	ATGCCTTGTGCCTCCAGTAAA
qRT-PCR-FliD-F	CATCGACGGTCTGACGGTTA
qRT-PCR-FliD-R	ACTGATCGCGCCGCTTA
qRT-PCR-FliS-F	GATGTTAGCCCTTCGGCAGTAC
qRT-PCR-FliS-R	CACCTTCCATCAACATTTGCA
qRT-PCR-FliT-F	AATTGCCGATACCCGTGAAG
qRT-PCR-FliT-R	CAGGAACGGCAAGCCAGAT
qRT-PCR-FlgZ-F	CACCACGCCACTGGAAATC
qRT-PCR-FlgZ-R	GGATCGTGGCTGTCTTGCA
qRT-PCR-MotA-F	GCGTTCGTCTGCGATTACCT
qRT-PCR-MotA-R	CGTGCGGAGCCATGTTG
qRT-PCR-MotB-F	TCGATATTGTCGTACTGACCAAA
qRT-PCR-MotB-R	GGACCCTGCGCACCTT
qRT-PCR-FlgN-F	TGCAACTGATCAACGACGACTT
qRT-PCR-FlgN-R	TGCAAAGCGAGGGATTCG

Construction of the revertant strain MFE01Δ*tssC*-R

Each PCR was performed under standard conditions using Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The *tssC* amplicon (wild type gene and environment) was amplified from *P. fluorescens* strain MFE01 with muta1-tssC-F and muta4-tssC-R primers (Table 2) using the following PCR parameters: 61°C for X s, 72°C for 2 min; 30 cycles. The resulting *tssC* amplicon was introduced into the pAKE604 suicide vector, previously digested by *SmaI* (blunt-ended), and ligated with T4 DNA ligase. The construct was verified by sequencing and then introduced into *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983). The recombinant plasmid was transferred by biparental mating: recipient MFE01Δ*tssC* and the S17-1 strain containing pAKE604-*tssC* were mixed at the same ratio and spotted onto LB agar medium and incubated at 37°C overnight. The biomass mixture was resuspended in 1 ml sterile physiological saline and 0.1 ml of the cell suspension spread on LB agar plates supplemented with rifampicin (50 µg/ml, for MFE01Δ*tssC* selection and *E. coli* S17-1 killing) and kanamycin (200 µg/ml, for the selection of cells containing the recombinant plasmid) and incubated at 28°C for 48 h. Colonies were isolated on LB agar plates supplemented with 10% sucrose to select the second homologous recombinants. The resulting revertant strain was verified by DNA sequencing and named MFE01Δ*tssC*-R

Extraction of total RNA from *P. fluorescens* MFE01

Total RNA was extracted using the hot acid-phenol protocol described by Bouffartigues *et al.* (Bouffartigues et al. 2012) with modifications. Bacteria were lysed in lysis buffer (0.02 M sodium acetate, pH 5.5, 0.5% (w/v) SDS, 1 mM EDTA) in early exponential growth (OD_{580nm} = 1). An acid-phenol solution (Sigma-Aldrich) was heated to 60°C. The lysate was mixed with the hot acid-phenol solution and incubated at 60°C for 3 min. The aqueous phase was then removed after centrifugation at 13 000 x g for 5 min and mixed two times with the acid-phenol solution and once with choloroform/isoamyl alcohol 24:1 (Sigma-Aldricht). Total RNA was precipitated with 100% ethanol (2:1, v/v) containing 1 M sodium acetate (1:10, v/v), washed with ethanol, dried at room temperature for 2 h, and dissolved in RNase free water. DNA was digested with Turbo™ DNase (ThermoFisher Scientific) and the DNase inactivated by adding 1 µl 0.5 M EDTA and incubating at 75°C for 10 min. The absence of DNA was verified by PCR. RNA extraction was verified on a 2% agarose gel and the concentration determined by measuring the OD ratios A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} by Nanodrop.

Putative FliA promoters and consensus motif

The consensus motif (TAAAGTTT-N11-GCCGATAA), corresponding to promoters recognized by FliA (Frisk et al. 2002) was used to search for promoters upstream of flagellar genes in MFE01. The sequence logo, corresponding to four genes, was generated using Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) (Bailey et al. 2006).

cDNA amplification

Total cDNA was amplified from total RNA extracts with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. The 50-µl reaction containing 25 µL RNA was incubated at 37°C for 2 h and inactivated for 5 min at 85°C.

Quantitative Reverse Transcription-PCR experiments

qRT-PCR was performed in triplicate using the protocol described by Guyard-Nicodème *et al.*(Guyard-Nicodeme et al. 2008). The primers (Table 3) were designed using Primer Express 3 software. A single PCR product for each primer pair was verified prior to use. The 20-µL reaction contained 6.5 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 µM primers, and 3 µl cDNA. PCR reactions were performed with the 7300 Real Time PCR System apparatus (Applied Biosystems). We used *recA* as a gene expression control. Relative quantification of the mRNAs was obtained by comparison with wild type expression.

Transmission electron microscopic

This work was aided by the facilities and expertise of the Platform for Microscopy of IMM. Bacteria were grown on LB medium at 28°C for 48 h. 100 µL cell suspension was drawn into a pipette tip which had been cut. Bacteria were gently centrifuged (500 x g for 3 min) and resuspended in HEPES buffer pH

7.2 and 5 µl dropped onto a hydrophobic carbon-coated Formvar copper grid (300 mesh). The samples were air dried for 3 min, stained with a 1% aqueous solution of uranyl acetate, pH 4·5, air dried for 1 min, and examined with a FEI Tecnai G2 20 TWIN (200KV), LaB6, Eagle 2k camera.

References

Alteri, Christopher J., Stephanie D. Himpsl, Shannon R. Pickens, Jonathon R. Lindner, Jonathan S. Zora, Jessa E. Miller, Peter D. Arno, Samuel W. Straight, and Harry L. T. Mobley. 2013. "Multicellular Bacteria Deploy the Type VI Secretion System to Preemptively Strike Neighboring Cells." *PLoS Pathogens* 9 (9): e1003608. doi:10.1371/journal.ppat.1003608.

Bailey, Timothy L., Nadya Williams, Chris Misleh, and Wilfred W. Li. 2006. "MEME: Discovering and Analyzing DNA and Protein Sequence Motifs." *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server issue): W369-373. doi:10.1093/nar/gkl198.

Barahona, Emma, Ana Navazo, Daniel Garrido-Sanz, Candela Muriel, Francisco Martínez-Granero, Miguel Redondo-Nieto, Marta Martín, and Rafael Rivilla. 2016. "Pseudomonas Fluorescens F113 Can Produce a Second Flagellar Apparatus, Which Is Important for Plant Root Colonization." *Frontiers in Microbiology* 7 (September). doi:10.3389/fmicb.2016.01471.

Basler, Marek, Brian T. Ho, and John J. Mekalanos. 2013. "Tit-for-Tat: Type VI Secretion System Counterattack during Bacterial Cell-Cell Interactions." *Cell* 152 (4): 884–94. doi:10.1016/j.cell.2013.01.042.

Bernal, Patricia, Luke P. Allsopp, Alain Filloux, and María A. Llamas. 2017. "The Pseudomonas Putida T6SS Is a Plant Warden against Phytopathogens." *The ISME Journal* 11 (4): 972–87. doi:10.1038/ismej.2016.169.

Bouffartigues, Emeline, Gwendoline Gicquel, Alexis Bazire, Manjeet Bains, Olivier Maillot, Julien Vieillard, Marc G. J. Feuilloley, et al. 2012. "Transcription of the oprF Gene of Pseudomonas Aeruginosa Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced." *Journal of Bacteriology* 194 (16): 4301–11. doi:10.1128/JB.00509-12.

Boyer, Frédéric, Gwennaële Fichant, Jérémie Berthod, Yves Vandenbrouck, and Ina Attree. 2009. "Dissecting the Bacterial Type VI Secretion System by a Genome Wide in Silico Analysis: What Can Be Learned from Available Microbial Genomic Resources?" *BMC Genomics* 10 (March): 104. doi:10.1186/1471-2164-10-104.

Brunet, Yannick R., Abdelrahim Zoued, Frédéric Boyer, Badreddine Douzi, and Eric Cascales. 2015. "The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization." *PLoS Genetics* 11 (10): e1005545. doi:10.1371/journal.pgen.1005545.

Capdevila, Silvia, Francisco M. Martínez-Granero, María Sánchez-Contreras, Rafael Rivilla, and Marta Martín. 2004. "Analysis of Pseudomonas Fluorescens F113 Genes Implicated in Flagellar Filament Synthesis and Their Role in Competitive Root Colonization." *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 11): 3889–97. doi:10.1099/mic.0.27362-0.

Cardarelli, Lia, Christina Saak, and Karine A. Gibbs. 2015. "Two Proteins Form a Heteromeric Bacterial Self-Recognition Complex in Which Variable Subdomains Determine Allele-Restricted Binding." *mBio* 6 (3). doi:10.1128/mBio.00251-15.

Chapalain, A., G. Rossignol, O. Lesouhaitier, A. Merieau, C. Gruffaz, J. Guerillon, J.-M. Meyer, N. Orange, and M.G.J. Feuilloley. 2007. "Comparative Study of 7 Fluorescent Pseudomonad Clinical Isolates." *Canadian Journal of Microbiology* 54 (1): 19–27. doi:10.1139/W07-110.

Chen, Wen-Jen, Tzu-Yen Kuo, Feng-Chia Hsieh, Pi-Yu Chen, Chang-Sheng Wang, Yu-Ling Shih, Ying-Mi Lai, Je-Ruei Liu, Yu-Liang Yang, and Ming-Che Shih. 2016. "Involvement of Type VI Secretion System in Secretion of Iron Chelator Pyoverdine in Pseudomonas Taiwanensis." *Scientific Reports* 6 (September): 32950. doi:10.1038/srep32950.

Coulthurst, Sarah J. 2013. "The Type VI Secretion System - a Widespread and Versatile Cell Targeting System." *Research in Microbiology* 164 (6): 640–54. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.017.

Dasgupta, Nandini, Matthew C. Wolfgang, Andrew L. Goodman, Shiwani K. Arora, Jeevan Jyot, Stephen Lory, and Reuben Ramphal. 2003. "A Four-Tiered Transcriptional Regulatory Circuit Controls Flagellar Biogenesis in Pseudomonas Aeruginosa." *Molecular Microbiology* 50 (3): 809–24.

De Weger, L. A., C. I. van der Vlugt, A. H. Wijfjes, P. A. Bakker, B. Schippers, and B. Lugtenberg. 1987. "Flagella of a Plant-Growth-Stimulating Pseudomonas Fluorescens Strain Are Required for Colonization of Potato Roots." *Journal of Bacteriology* 169 (6): 2769–73.

Decoin, Victorien, Corinne Barbey, Dorian Bergeau, Xavier Latour, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange, and Annabelle Merieau. 2014. "A Type VI Secretion System Is Involved in Pseudomonas Fluorescens Bacterial Competition." *PloS One* 9 (2): e89411. doi:10.1371/journal.pone.0089411.

Decoin, Victorien, Mathias Gallique, Corinne Barbey, Francois Le Mauff, Cecile Duclairoir Poc, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange, and Annabelle Merieau. 2015. "A Pseudomonas Fluorescens Type 6 Secretion System Is Related to Mucoidy, Motility and Bacterial Competition." *BMC Microbiology* 15 (March): 72. doi:10.1186/s12866-015-0405-9.

Durand, Eric, Van Son Nguyen, Abdelrahim Zoued, Laureen Logger, Gérard Péhau-Arnaudet, Marie-Stéphanie Aschtgen, Silvia Spinelli, et al. 2015. "Biogenesis and Structure of a Type VI Secretion Membrane Core Complex." *Nature* 523 (7562): 555–60. doi:10.1038/nature14667.

El-Sayed, A. Kassem, Joanne Hothersall, and Christopher M. Thomas. 2001. "Quorum-Sensing-Dependent Regulation of Biosynthesis of the Polyketide Antibiotic Mupirocin in Pseudomonas Fluorescens NCIMB 10586." *Microbiology* 147 (8): 2127–39. doi:10.1099/00221287-147-8-2127.

Evans, Lewis D. B., Colin Hughes, and Gillian M. Fraser. 2014. "Building a Flagellum Outside the Bacterial Cell." *Trends in Microbiology* 22 (10): 566–72. doi:10.1016/j.tim.2014.05.009.

Frisk, A., J. Jyot, S. K. Arora, and R. Ramphal. 2002. "Identification and Functional Characterization of flgM, a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in Pseudomonas Aeruginosa." *Journal of Bacteriology* 184 (6): 1514–21.

Gallique, Mathias, Mathilde Bouteiller, and Annabelle Merieau. 2017. "The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?" *Frontiers in Microbiology* 8: 1454. doi:10.3389/fmicb.2017.01454.

Gallique, Mathias, Victorien Decoin, Corinne Barbey, Thibaut Rosay, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange, and Annabelle Merieau. 2017. "Contribution of the Pseudomonas Fluorescens MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation." *PloS One* 12 (1): e0170770. doi:10.1371/journal.pone.0170770.

Guyard-Nicodeme, Muriel, Alexis Bazire, Gaelle Hemery, Thierry Meylheuc, Daniel Molle, Nicole Orange, Laurene Fito-Boncompte, et al. 2008. "Outer Membrane Modifications of Pseudomonas Fluorescens

MF37 in Response to Hyperosmolarity." *Journal of Proteome Research* 7 (3): 1218–25. doi:10.1021/pr070539x.
Haas, Dieter, and Geneviève Défago. 2005. "Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent Pseudomonads." *Nature Reviews. Microbiology* 3 (4): 307–19. doi:10.1038/nrmicro1129.
Herlihey, Francesca A., and Anthony J. Clarke. 2017. "Controlling Autolysis During Flagella Insertion in Gram-Negative Bacteria." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 925: 41–56. doi:10.1007/5584_2016_52.
Ho, Brian T., Tao G. Dong, and John J. Mekalanos. 2014. "A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System." *Cell Host & Microbe* 15 (1): 9–21. doi:10.1016/j.chom.2013.11.008.
Hood, Rachel D., Pragya Singh, Fosheng Hsu, Tüzün Güvener, Mike A. Carl, Rex R. S. Trinidad, Julie M. Silverman, et al. 2010. "A Type VI Secretion System of Pseudomonas Aeruginosa Targets a Toxin to Bacteria." *Cell Host & Microbe* 7 (1): 25–37. doi:10.1016/j.chom.2009.12.007.
Jahn, Courtney E., David K. Willis, and Amy O. Charkowski. 2008. "The Flagellar Sigma Factor fliA Is Required for Dickeya Dadantii Virulence." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 21 (11): 1431–42. doi:10.1094/MPMI-21-11-1431.
Leiman, Petr G., Marek Basler, Udupi A. Ramagopal, Jeffrey B. Bonanno, J. Michael Sauder, Stefan Pukatzki, Stephen K. Burley, Steven C. Almo, and John J. Mekalanos. 2009. "Type VI Secretion Apparatus and Phage Tail-Associated Protein Complexes Share a Common Evolutionary Origin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4154–59. doi:10.1073/pnas.0813360106.
Lin, Jinshui, Weipeng Zhang, Juanli Cheng, Xu Yang, Kaixiang Zhu, Yao Wang, Gehong Wei, Pei-Yuan Qian, Zhao-Qing Luo, and Xihui Shen. 2017. "A Pseudomonas T6SS Effector Recruits PQS-Containing Outer Membrane Vesicles for Iron Acquisition." *Nature Communications* 8 (March): 14888. doi:10.1038/ncomms14888.
Liu, Liyun, Shuai Hao, Ruiting Lan, Guangxia Wang, Di Xiao, Hui Sun, and Jianguo Xu. 2015. "The Type VI Secretion System Modulates Flagellar Gene Expression and Secretion in Citrobacter Freundii and Contributes to Adhesion and Cytotoxicity to Host Cells." *Infection and Immunity* 83 (7): 2596–2604. doi:10.1128/IAI.03071-14.
Martinez-Granero, Francisco, Ana Navazo, Emma Barahona, Miguel Redondo-Nieto, Elena Gonzalez de Heredia, Irene Baena, Irene Martin-Martin, Rafael Rivilla, and Marta Martin. 2014. "Identification of flgZ as a Flagellar Gene Encoding a PilZ Domain Protein That Regulates Swimming Motility and Biofilm Formation in Pseudomonas." *PloS One* 9 (2): e87608. doi:10.1371/journal.pone.0087608.
Minamino, Tohru, and Katsumi Imada. 2015. "The Bacterial Flagellar Motor and Its Structural Diversity." *Trends in Microbiology* 23 (5): 267–74. doi:10.1016/j.tim.2014.12.011.
Pace, Fernanda de, Jacqueline Boldrin de Paiva, Gerson Nakazato, Marcelo Lancellotti, Marcelo Palma Sircili, Eliana Guedes Stehling, Wanderley Dias da Silveira, and Vanessa Sperandio. 2011. "Characterization of IcmF of the Type VI Secretion System in an Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC) Strain." *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 10): 2954–62. doi:10.1099/mic.0.050005-0.
Postel, Sandra, Daniel Deredge, Daniel A. Bonsor, Xiong Yu, Kay Diederichs, Saskia Helmsing, Aviv Vromen, et al. 2016. "Bacterial Flagellar Capping Proteins Adopt Diverse Oligomeric States." *eLife* 5 (September). doi:10.7554/eLife.18857.
Redondo-Nieto, Miguel, Javier Lloret, Javiera Larenas, Emma Barahona, Ana Navazo, Francisco Martinez-Granero, Silvia Capdevila, Rafael Rivilla, and Marta Martin. 2008. "Transcriptional Organization of the Region Encoding the Synthesis of the Flagellar Filament in Pseudomonas Fluorescens." *Journal of Bacteriology* 190 (11): 4106–9. doi:10.1128/JB.00178-08.
Rietsch, Arne, Isabelle Vallet-Gely, Simon L. Dove, and John J. Mekalanos. 2005. "ExsE, a Secreted Regulator of Type III Secretion Genes in Pseudomonas Aeruginosa." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (22): 8006–11. doi:10.1073/pnas.0503005102.
Rodríguez-Herva, José Juan, Estrella Duque, María Antonia Molina-Henares, Gloria Navarro-Avilés, Pieter Van Dillewijn, Jesús De La Torre, Antonio J. Molina-Henares, et al. 2010. "Physiological and Transcriptomic Characterization of a fliA Mutant of Pseudomonas Putida KT2440." *Environmental Microbiology Reports* 2 (3): 373–80. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00084.x.
Rossignol, G., D. Sperandio, J. Guerillon, C. Duclairoir Poc, E. Soum-Soutera, N. Orange, M. G. J. Feuilloley, and A. Merieau. 2009. "Phenotypic Variation in the Pseudomonas Fluorescens Clinical Strain MFN1032." *Research in Microbiology* 160 (5): 337–44. doi:10.1016/j.resmic.2009.04.004.
Schulz, Sebastian, Denitsa Eckweiler, Agata Bielecka, Tanja Nicolai, Raimo Franke, Andreas Dötsch, Klaus Hornischer, Sebastian Bruchmann, Juliane Düvel, and Susanne Häussler. 2015. "Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in Pseudomonas Aeruginosa Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk." *PLoS Pathogens* 11 (3). doi:10.1371/journal.ppat.1004744.
Si, Meiru, Yao Wang, Bing Zhang, Chao Zhao, Yiwen Kang, Haonan Bai, Dawei Wei, et al. 2017. "The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition." *Cell Reports* 20 (4): 949–59. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.081.
Si, Meiru, Chao Zhao, Brianne Burkinshaw, Bing Zhang, Dawei Wei, Yao Wang, Tao G. Dong, and Xihui Shen. 2017. "Manganese Scavenging and Oxidative Stress Response Mediated by Type VI Secretion System in Burkholderia Thailandensis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (11): E2233–42. doi:10.1073/pnas.1614902114.
Silverman, Julie M., Danielle M. Agnello, Hongjin Zheng, Benjamin T. Andrews, Mo Li, Carlos E. Catalano, Tamir Gonen, and Joseph D. Mougous. 2013. "Haemolysin Coregulated Protein Is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates." *Molecular Cell* 51 (5): 584–93. doi:10.1016/j.molcel.2013.07.025.
Silverman, Julie M., Yannick R. Brunet, Eric Cascales, and Joseph D. Mougous. 2012. "Structure and Regulation of the Type VI Secretion System." *Annual Review of Microbiology* 66: 453–72. doi:10.1146/annurev-micro-121809-151619.
Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. "A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria." *Nature Biotechnology* 1 (9): 784–91. doi:10.1038/nbt1183-784.
Soutourina, Olga A, and Philippe N Bertin. 2003. "Regulation Cascade of Flagellar Expression in Gram-Negative Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* 27 (4): 505–23. doi:10.1016/S0168-6445(03)00064-0.
Steiner, Theodore S. 2007. "How Flagellin and Toll-like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection." *Infection and Immunity* 75 (2): 545–52. doi:10.1128/IAI.01506-06.
Wang, Tietao, Meiru Si, Yunhong Song, Wenhan Zhu, Fen Gao, Yao Wang, Lei Zhang, et al. 2015. "Type VI Secretion System Transports Zn2+ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity." *PLoS Pathogens* 11 (7). doi:10.1371/journal.ppat.1005020.

Weller, David M. 2007. "Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back over 30 Years." *Phytopathology* 97 (2): 250–56. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0250.
Wenren, Larissa M., Nora L. Sullivan, Lia Cardarelli, Alecia N. Septer, and Karine A. Gibbs. 2013. "Two Independent Pathways for Self-Recognition in Proteus Mirabilis Are Linked by Type VI-Dependent Export." *mBio* 4 (4). doi:10.1128/mBio.00374-13.

Figure S1: Hcp and flagelin secretion in MFE01Δ*tssC+fliA*

Concentrated supernatants of cultures in late exponential growth phase, grown at 28°C, were analysed by SDS-PAGE (15% separation gel) and Coomassie staining. Bands indicated by arrows and labelled H and F were identified by Mass spectrometry as Hcp and flagellin proteins respectively. MWM: molecular weight marker.

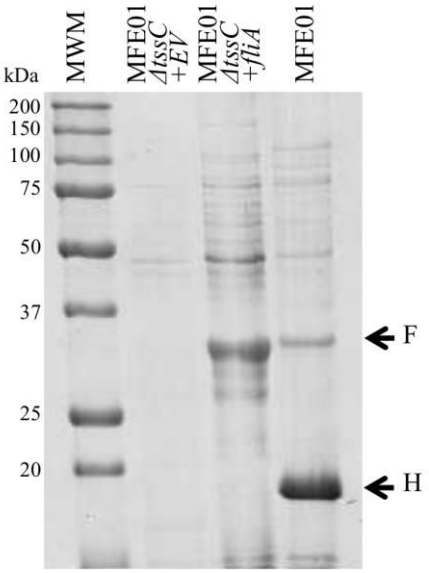


Figure S2: Flagellar assembly in *P.aeruginosa*

This picture is a model inspired from literature (Dasgupta et al. 2003; Evans, Hughes, and Fraser 2014; Minamino and Imada 2015; Postel et al. 2016; Herlihey and Clarke 2017). Unfold proteins are represented as curved lines which color is specific to each protein. Indeed the proteins are unfolded before export. 1) Assembly of the flagellar-hook (needing cap protein FlgD): Antisigma factor sequester FliA, inhibiting la class IV flagellar genes transcription. 2) The hook is achieved and it length is controlled by the protein FliK (hook reaches its mature length of ~55 nm). The FlgD protein is released and FlgM is secreted in extracellular medium, releasing thus the sigma factor FliA. This enables class IV regulon transcription. 3) The FlgN chaperone allows junction-proteins secretion (hook-filament), FlgK and FlgL. 4) The cap protein FliD, secreted with the help of its chaperone FliT forms a hexamer (in *Pseudomonas aeruginosa*). 5) The flagellar filament, consisting of flagellin FlaA (or FliC), is in the assembly phase. The chaperone FliS allows flagellin and FlaG (control of length filament) secretion. 6) The filament is achieved. 7) The MotA and MotB proteins allowing protons influx (proton motive-force) fit together. FliA also controls some other genes transcription, like *flgZ* and chemotaxis genes (not represented in this figure).

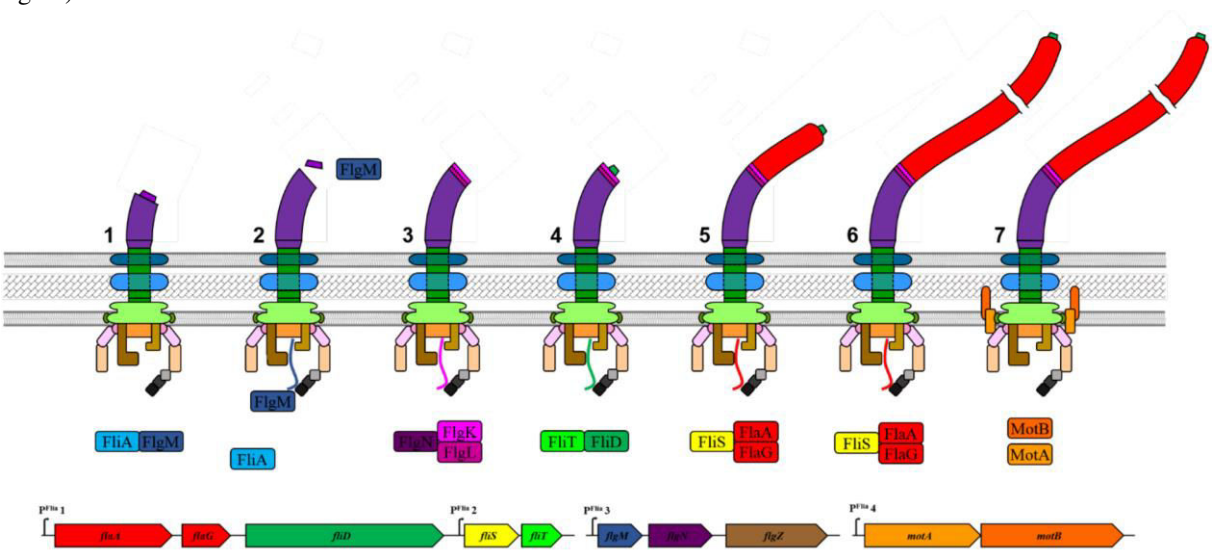


Table S1: Functions genes studied in this work

Gene	Protein function or localization	MFE01 gene accession
fleQ	RpoN dependent transcriptional activator, Master regulator, required for classes I and II	
rpoN	σ^{54} sigma factor, required for classes II and III	
flgH	Basal body L-ring, anchored to outer membrane	
flgE	Hook component, anchors the filament to basal body	
fliA	σ^{28} sigma factor, required for class IV	
flgM	σ^{28}-specific antisigma factor, interacts directly with FliA	
flaA	Flagellin, major filament component	
flaG	Filament length control	
flgN	Chaperone; export of junction proteins FlgK-FlgL, initiation of filament assembly	
fliD	Filament cap protein, controls flagellin assembly	
fliS	Chaperone, export of flagellin	
fliT	Chaperone, export of filament cap protein FliD	
flgZ	PilZ domain-containing protein, interact with stator protein, implicated in motility regulation	
motA	Proton-dependent-stator complex, motor rotation	
motB	Proton-dependent-stator complex, motor rotation	

DISCUSSION, RESULTATS PRELIMINAIRES ET PERSPECTIVES

Contrairement aux nombreux travaux portant sur les pathogènes, comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* EAEC*, Burkholderia pseudomallei*, *Acinetobacter baumannii etc.*, très peu d'études portent sur le SST6 des souches environnementales. Pourtant, en ce qui concerne la souche *P. fluorescens* MFE01, les protéines Hcp sont les protéines majoritaires du surnageant de culture. *A contrario*, la sécrétion des protéines Hcp chez la majorité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est très faible et nécessite souvent, pour être visualisée, l'inactivation du répresseur RetS. Une quantité aussi importante de protéine Hcp suggère que le SST6 serait alors impliqué dans un processus important chez MFE01. L'objectif global de ma thèse était donc d'étudier le rôle de ce SST6 chez la souche environnementale de *P. fluorescens* MFE01.

I. Une seule machinerie, une panoplie de gènes *vgrG* et *hcp*

Il n'est pas rare de retrouver plusieurs clusters du SST6 chez les bactéries à Gram négatif. Par exemple, *P. aeruginosa* possède trois clusters (H1- à H3-T6SS) (Barret et al., 2011; Hood et al., 2010; Lesic et al., 2009; Mougous et al., 2007; Sana et al., 2012, 2015) et chez *Burkholderia pseudomallei* six clusters ont été retrouvés (Burtnick et al., 2011). Avoir plusieurs clusters et donc plusieurs machineries du SST6 permet de réguler différents SST6 selon l'environnement et donc selon un contexte particulier. L'analyse *in silico* n'a révélé dans le génome de MFE01 qu'un seul cluster du SST6, regroupant tous les gènes du core component, excepté *tssD* codant pour la protéine Hcp (figure 76). Des gènes *hcp* sont éparpillés au sein du génome et sont dits orphelins. En tout, en complétant l'annotation, nous avons découvert non pas 3 mais 4 gènes *hcp*. De même, les gènes *vgrG* sont présents en multiples copies à travers le génome de MFE01. Deux sont localisés en amont et en aval du cluster du SST6 (Gallique et al., 2017a). Il est important de noter la difficulté d'analyse et l'estimation des gènes *vgrG*, puisque le génome de MFE01 séquencé courant 2014 n'est pas totalement assemblé (une centaine de contigs). La présence de nombreux gènes *vgrG* par exemple, qui sont conservés, implique des difficultés d'assemblage. En effet, des gènes *vgrG* incomplets (par exemple partie 5' ou 3') sont retrouvés en fin ou en début de contig et un assemblage manuel est requis pour assembler correctement les gènes *vgrG* entre eux (associer par exemple la partie 5' d'un *vgrG* présente en fin de cluster

et sa partie 3' présente dans un autre cluster). En autres termes, il faut d'abord associer chaque portion de gène *vgrG* avec l'autre partie correspondante. On estime le nombre de gènes *vgrG* à une dizaine, sans compter ceux codant pour des putatives protéines Rhs (rearrangement hotspot protein). La présence de nombreux gènes *vgrG* dans le génome, donne de l'importance à l'étude des interactions entre les protéines VgrG et les protéines Hcp (environ une dizaine de protéines VgrG pour quatre protéines Hcp : quelle protéine VgrG interagit avec quelle protéine Hcp ?).

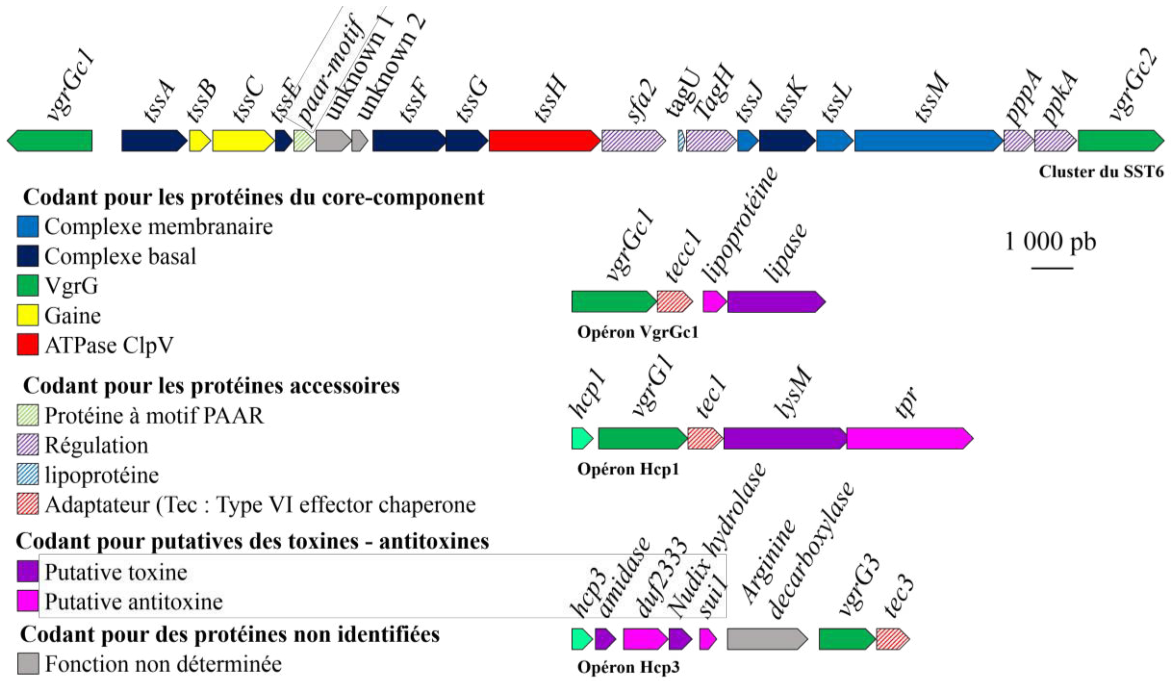


Figure 76: Organisation génomique du cluster SST6 et des opérons *hcp* de la souche *P. fluorescens* MFE01.

II. Le SST6 de la souche MFE01 est fortement impliqué dans l'activité antibactérienne

La souche MFE01 sécrète différentes protéines Hcp dans le surngeant de culture à 28°C (pas de sécrétion à 37°C) (Decoin et al., 2014). Quatre gènes *hcp* ont été retrouvés au sein du génome et trois ont fait l'objet de mutagénèse afin d'étudier le rôle de chaque protéine Hcp dans la compétition bactérienne (Decoin et al., 2014, 2015; Gallique et al., 2017a). MFE01 ne présente pas de virulence envers certains modèles eucaryotes tels que l'amibe, certaines plantes ou cellules l'animales (Decoin et al., 2014). Par ailleurs, nous avons montré que MFE01 exerce une activité bactéricide envers de nombreuse bactéries telles qu'*E. coli*, *P.aeruginosa*, plusieurs souches de *P. fluorescens* et *Pectobacterium atrosepticum*.

De plus, l'inactivation totale du SST6 de MFE01 (chez le mutant MFE01Δ*tssC*) entraîne une perte totale de l'activité antibactérienne, suggérant que le SST6 est principalement ou totalement impliqué dans l'antagonisme bactérien et donc dans la compétition antibactérienne. Actuellement, nous avons construit les mutants MFE01Δ*hcp1*, MFE01Δ*hcp2* et MFE01Δ*hcp3*. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que les protéines Hcp2 et Hcp3 sont impliquées dans le sécrétion d'effecteurs antibactériens (Decoin et al., 2014; Gallique et al., 2017a), ce qui n'est pas le cas de la protéine Hcp1 (Decoin et al., 2015). La toxine associée à Hcp2, encore non identifiée actuellement, serait une toxine de type amidase, puisque la production de la protéine d'immunité Rap1a (de *Serratia marcescens*) permet d'améliorer la survie d'*E. coli* (normalement sensible à MFE01). Les études de cultures mixtes en condition solide montrent que l'activité antibactérienne exercée par MFE01 sur la bactérie cible est contact-dépendant, puisque le surngeant de MFE01 n'a pas d'activité bactéricide ou d'impact sur la formation de biofilm sur la bactérie cible (Decoin et al., 2014; Gallique et al., 2017a).

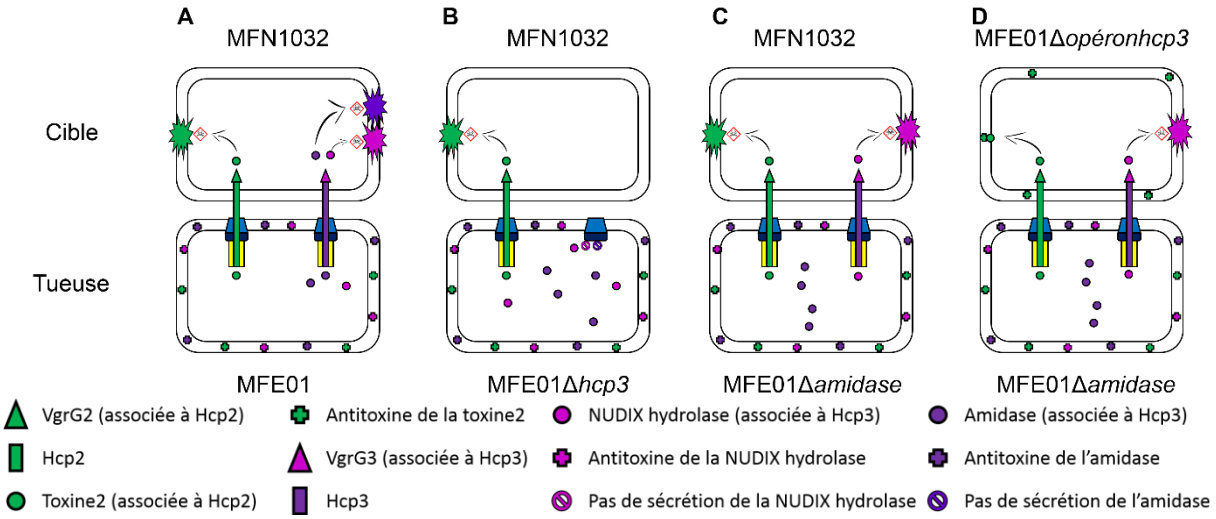


Figure 77: Schéma explicatif de l'activité antibactérienne exercée par les toxines associées à Hcp3. (non publié).

A) Culture entre MFN1032 et MFE01 : forte activité antibactérienne exercée par MFE01. Les protéines Hcp2 et Hcp3 forment les tubes internes du SST6 et sécrètent leur toxine(s) associée(s). B) Culture entre MFN1032 et MFE01Δ*hcp3* : les toxines associées à Hcp3 ne sont plus sécrétées. En revanche, celle(s) associée(s) à Hcp2 l'est ou le sont toujours et participe(nt) à une activité antibactérienne. C) Culture entre MFN1032 et MFE01Δ*amidase* : seule l'amidase n'est pas produite et secrétée contrairement à l'autre toxine associée à Hcp3 et celle(s) associée(s) à Hcp2. Il existe toujours une forte activité antibactérienne qui ne permet pas alors de voir si la putative amidase est une toxine (car que ce gène soit muté ou non, la population de la cellule cible est fortement réduite). D) Avantages d'utiliser la cible MFE01Δ*opéron-hcp3* : toutes les autres toxines non associées à Hcp3 et dépendantes du SST6 sont sécrétées par MFE01Δ*amidase* mais n'exercent pas d'activité antibactérienne car les antitoxines correspondantes sont présentes chez la cible. MFE01Δ*opéronhcp3* n'est sensible qu'aux toxines de l'opéron *hcp3*. Cette souche serait donc moins sensible que les autres souches telles que *P. fluorescens* MFP05 ou MFN1032. La légende est commune aux figures 77 et 78.

La protéine Hcp3 est fortement impliquée elle aussi dans l'activité antibactérienne (Gallique et al., 2017a) qui est souche dépendante. L'analyse de l'environnement du gène *hcp3* révèle deux gènes codant pour des enzymes dégradant le peptidoglycane (putative amidase et hydrolase). De plus, selon la bactérie cible, l'effet de la mutation du gène *hcp3* de MFE01 n'a pas le même impact sur la survie de la population cible (Gallique et al., 2017a). La présence de protéines d'immunité chez certaines bactéries pourrait expliquer ces différences (Gallique et al., 2017a). Ces deux gènes codant respectivement pour la NUDIX hydrolase et l'amidase ont fait l'objet de mutagénèse. Ces deux mutants possèdent encore une activité antibactérienne importante (toxine(s) associée(s) à Hcp2, voire même d'autres toxines dont les gènes sont encore non annotés dans le génome). Un des moyens de démontrer l'activité antibactérienne repose sur le choix d'une cible adaptée. Nous envisageons donc de muter tout l'environnement du gène *hcp3* (environ 12 000 pb), comprenant les gènes codant pour : la protéine Hcp3, la NUDIX hydrolase et l'amidase, leur antitoxines putatives, VgrG3 et Tec3, afin d'obtenir le mutant MFE01Δ*opéron-hcp3* (figure 77). En effet, cette souche sera une cible idéale puisqu'elle ne possède plus les antitoxines associées aux toxines transportées *via* Hcp3 mais possède les protéines d'immunité pour des autres toxines non associées à Hcp3 (figure 78).

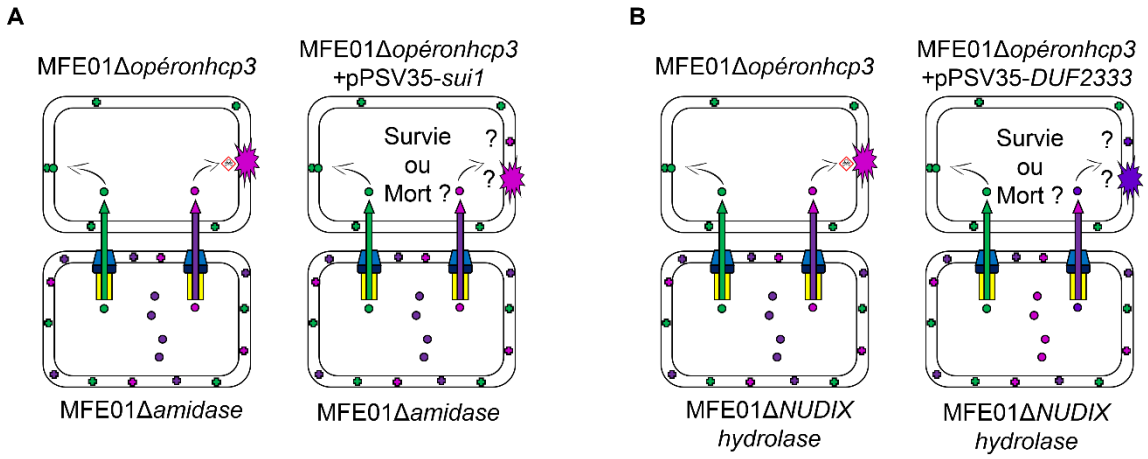


Figure 78: Schéma explicatif de la mise en évidence des protéines d'immunité des toxines associées à Hcp3. (non publié).

A) MFE01Δ*opéronhcp3* n'est sensible qu'aux toxines de l'opéron *hcp3*. L'expression du gène *sui1* (Sui1: antitoxine putative de la NUDIX hydrolase) permet-elle d'améliorer la survie face à MFE01Δ*amidase* (ne produit pas la toxine amidase putative mais produit les autres dont la NUDIX hydrolase) ? Si la bactérie survit (dénombrement de la population identique au témoin positif), le gène *sui1* code pour l'antitoxine respective de la NUDIX hydrolase.B) Même raisonnement que précédemment. L'expression du gène *duf2333* (DUF2333: antitoxine putative de l'amidase) permet-elle améliorer la survie face à MFE01Δ*nudix-hydrolase* (produit notamment l'amidase) ? La légende est commune aux figures 77 et 78.

De plus, nous envisageons de cloner les gènes codants pour les toxines et antitoxines sur deux plasmides différents et d'induire leur expression indépendamment dans le périplasme (compartiment cible présumé). L'ajout d'une séquence signale Sec est donc indispensable afin de garantir le passage des protéines du cytoplasme vers le périplasme. Par exemple, nous envisageons de cloner le gène codant pour la toxine amidase dans le pET22+ (possédant une séquence signal *pelB*) et le gène *duf2333* (codant pour une potentielle antitoxine de l'amidase) dans le pRSF-Duet1. Ces deux plasmides possèdent un promoteur T7 et seront introduits chez *Escherichia coli* BL21DE3 (le gène codant pour l'ARN-polymérase T7 est sous le contrôle d'un promoteur P*lac*). Ainsi, si l'induction de l'expression du gène *amidase* (*E. coli* + pET22+-*amidase*) entraine la mort de la bactérie, l'amidase putative serait donc une toxine. Si le gène *duf2333* est exprimé en même temps que le gène codant pour l'amidase (*E. coli* + pET22+-*amidase* + pRSF-Duet1-*duf*2333) et que cette double expression n'entraîne pas la mort de la bactérie, alors le gène *duf2333* coderait pour l'antitoxine correspondante.

La souche pathogène *P. aeruginosa* H103 est très sensible à MFE01 mais également aux deux mutants MFE01Δ*hcp2* et MFE01Δ*hcp3*. En effet, ces mutants exercent respectivement de manière partielle ou totale une activité antibactérienne envers H103, alors que le mutant MFE01Δ*tssC* n'exerce plus cette activité bactéricide. Ces résultats suggèrent que soit Hcp2 et Hcp3 sont fortement impliquées dans l'activité bactéricide ou soit qu'il existe un autre facteur, dépendant du SST6, qui est impliqué dans cette activité de tuerie. On peut aussi envisager que la protéine Hcp4 soit impliquée car l'environnement génomique d'*hcp4* révèle la présence d'un gène codant pour une protéine putative présentant un domaine de type colicine

III. Activité de biocontrôle et moyen de lutte contre des pathogènes

Nous avons montré que MFE01 permettait la protection du tubercule de pomme de terre (rhizosphère) contre le phytopathogène *Pectobacterium atrosepticum* (Decoin et al., 2014). De plus, nous avons observé une protection exercée par MFE01 sur la feuille d'endive (phyllosphère) envers la macération induite par *P. aeruginosa* H103. MFE01 semble donc pouvoir protéger certaines plantes de différents phytopathogènes ce qui est une caractéristique potentielle des bactéries de type PGPR.

Dans l'environnement, que ce soit dans le sol, l'eau, dans le milieu hospitalier *etc.*, les micro-organismes sont rarement isolés et forment des structures complexes de type biofilm. Cette communauté bactérienne permet une protection face aux stress environnementaux. Par ailleurs, ces biofilms sont problématiques en milieu hospitalier, notamment à cause de la résistance accrue aux traitements antibiotiques chez les bactéries protégées par la matrice du biofilm. Nous avons démontré que la souche MFE01 exerce une action inhibitrice sur une souche de *P. fluorescens* isolée du microbiote cutané, MFP05, en condition de biofilm. Cependant les protéines Hcp1, Hcp2 et Hcp3 ne sont pas indispensables individuellement à cette activité inhibitrice qui dépendrait pourtant du SST6. Il existerait alors peut-être un autre facteur dépendant du SST6 impliqué dans cette activité ou bien que les trois protéines Hcp joueraient un rôle synergique. Il est également possible que le SST6, essentiel pour la formation de biofilm, joue un rôle indirect dans cette activité. En effet, le mutant MFE01Δ*tssC* est incapable de former un biofilm. L'incapacité de MFE01Δ*tssC* à coloniser est-elle responsable de l'incapacité de MFE01Δ*tssC* à tuer MFP05 ?. Le SST6 est-il impliqué dans la communication et permettrait-il de coordonner un comportement social au sein du biofilm (Gallique et al., 2017b), et ainsi de coloniser et persiter au sein d'un biofilm multi-espèces ?

Les résultats obtenus suggèrent ainsi que le SST6 joue un rôle important au sein d'un biofilm mais également dans la protection des plantes. Afin d'explorer le potentiel phyto-protecteur de MFE01 de manière plus complexe, il sera intéressant d'inoculer MFE01 au niveau de la rhizosphère ou de la phyllosphère en serre contrôlée ; et d'infecter la plante avec un phytopathogène afin d'étudier le potentiel protecteur de MFE01. De plus, l'observation de la dynamique d'assemblage et de la « cadence de tir » du SST6 peut être suivi par fusion traductionnelle (par exemple TssC ::GFP). Cette méthode permettrait de comparer le niveau d'activité du SST6 en condition de biofilm au niveau de la racine par rapport aux conditions *in vitro*. D'ailleurs, nous ne connaissons pas vraiment la régulation du SST6 de MFE01 (l'analyse génomique du cluster du SST6 révèle une probable régulation par le facteur sigma RpoN). Le SST6 est-il activé en présence d'auxine, comme c'est le cas chez *Azospirillium brasilense* (Van Puyvelde et al., 2011) ou bien par la présence d'exsudat racinaire par exemple ?

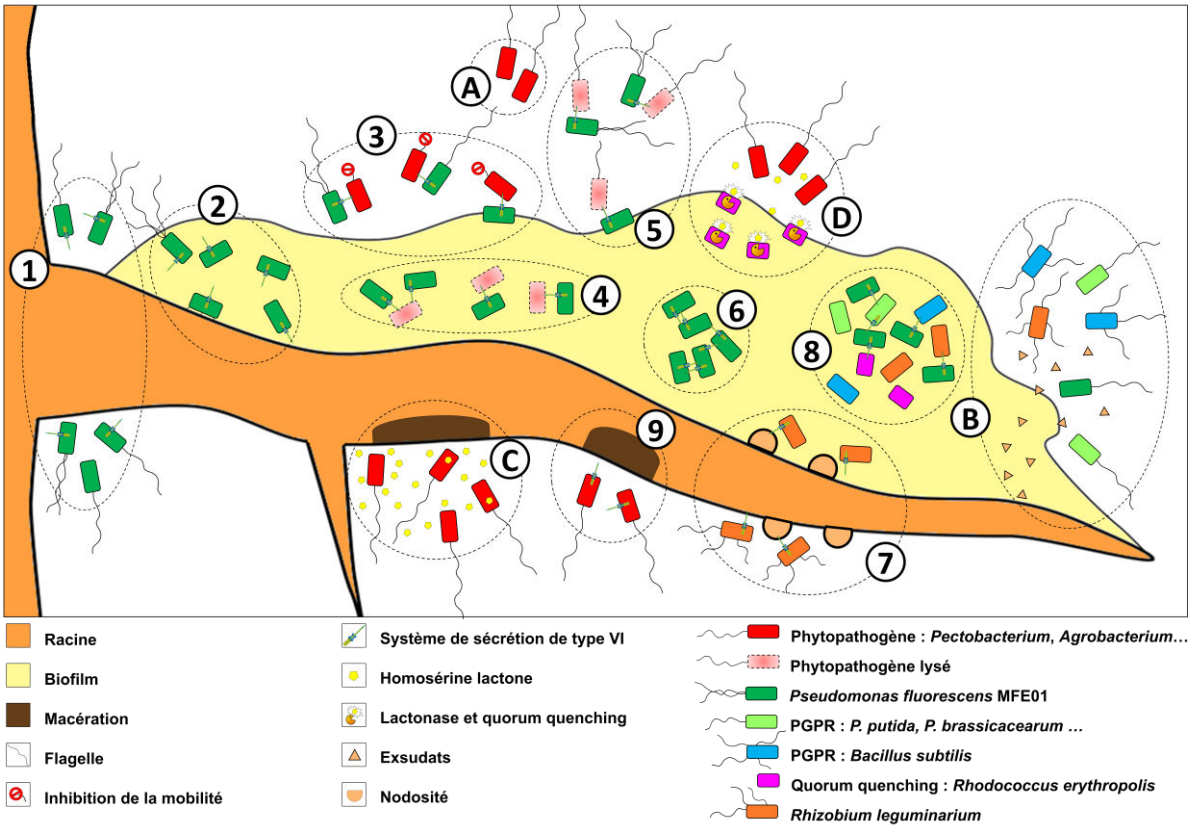


Figure 79: Rôles probables du SST6 et réseau d'interactions plante-bactérie et bactérie-bactérie dans la rhizosphère.

A : Approche de phytopathogènes

B : La production d'exsudats par la plante « attire » de nombreux micro-organismes. Le flagelle joue un rôle important dans le chimiotactisme et dans la colonisation de la racine.

C : La racine n'est pas protégée par l'action des bactéries PGPR contre les phytopathogènes. Ces derniers peuvent communiquer entre eux *via* le quorum sensing et synchroniser la production de facteurs de virulence.

D : Le quorum quenching (dégradation des molécules impliquées dans le quorum sensing) est un atout pour empêcher la communication des pathogènes et ainsi limiter leur virulence.

1 : Le SST6 permet indirectement la colonisation de la racine. De par son activité antibactérienne, le SST6 permet de tuer certains micro-organismes présents dans cette niche écologique.

2 : Le SST6 est impliqué dans la formation de biofilm.

3 : Inhibition de mobilité par des effecteurs sécrétés par le SST6 : éviteraient-ils la colonisation de phytopathogènes et donc impliqués dans la protection de la plante?

4 : Au sein d'un biofilm, le SST6 permet d'entrer en compétition avec différents micro-organismes.

5 : Implication du SST6 dans l'activité antibactérienne en condition planctonique.

6 : Le SST6 : un mécanisme permettant le comportement social et la communication bactérienne?

7 : Le SST6 de la souche *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 intervient dans la formation de nodosités et dans la fixation d'azote, bénéfique pour la croissance de la plante.

8 : Certains micro-organismes bénéfiques pour la croissance de la plante, présents dans un biofilm multi-espèces, peuvent-ils cohabiter ensemble au sein d'un biofilm ?

9 : Le SST6 des phytopathogènes permet de rentrer en compétition (importance des toxines, développé en figure 85) avec les bactéries bénéfiques et d'altérer la santé de la plante *via* des facteurs de virulence.

Il est également envisagé d'étudier la cohabitation de MFE01 avec d'autres bactéries de type PGPR. MFE01 présente-t-elle une activité bactéricide envers ces autres bactéries ? L'utilisation d'un « cocktail » de bactéries bénéfiques pour la croissance de la plante pourrait améliorer cette barrière protectrice dans laquelle chaque souche contribuerait différemment à la protection de la plante (figure 79). Par exemple, une culture mixte contenant la souche MFE01, d'autres souches PGPR (par exemple *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* ou bien *Pseudomonas brassicacearum*) mais également des souches empêchant la communication des phytopathogènes (par exemple *Rhodococcus erythropolis* qui produit des molécules impliquées dans le quorum quenching, c'est-à-dire dans la dégradation des signaux du quorum sensing des pathogènes).

L'activité d'inhibition de mobilité par MFE01 constitue-t-elle un atout majeur dans la protection de la plante ? Cette inhibition par la souche *P. fluorescens* MFE01 des phytopathogènes pourrait aussi contribuer à la protection du système racinaire, en limitant la colonisation d'un phytopathogène, complémentant ainsi l'activité bactéricide exercée par les protéines Hcp2 et Hcp3. Une étude de l'inhibition de la mobilité des phytopathogènes résistants à l'effet bactéricide de MFE01 est donc souhaitable.

IV. Implication de la protéine Hcp1 dans l'immobilisation de bactéries compétitrices

Plusieurs publications montrent que la mutation du SST6 induit une perte de mobilité de la souche mutée (Liu et al., 2015; de Pace et al., 2011). Cependant, l'implication d'effecteurs dans ces publications n'est pas décrite et l'inactivation de la machinerie SST6 impacterait indirectement sur le flagelle. Par ailleurs, la protéine Hcp1 de la souche MFE01 est impliquée dans l'immobilisation de la bactérie cible (Decoin et al., 2015). L'absence de cette protéine serait alors à l'origine de l'accumulation d'effecteur dans le cytoplasme et entraînerait la perte de mobilité. Au cours de ma thèse, je me suis focalisé sur l'impact de la mutation des gènes *hcp1* et *tssC* sur la régulation et l'assemblage du flagelle (Gallique et al. en préparation). Nous avons pu montrer que les mutations des gènes *hcp1* et de *tssC* impactent uniquement sur l'expression des gènes de classe IV du flagelle. En effet, l'introduction du régulateur transcriptionnel FliA restaure à la fois la sécrétion de la flagelline, la

transcription des gènes flagellaires de classe IV, la présence du filament flagellaire et la mobilité chez ces deux mutants. FliA permet en effet la transition du flagelle de classe III (Hook basal body : complexe basal comprenant le crochet) vers la classe IV (flagelle entier : complexe basal + crochet + filament). Par conséquent, il est important de souligner que la toxine (ou les toxines) n'agirai(en)t pas avant la classe IV (par exemple sur l'assemblage du crochet), car FliA n'aurait alors pas pu restaurer l'assemblage correct du filament flagellaire. Par ailleurs, FliA est également en relation avec la perte du caractère mucoïde, puisque la surexpression du gène *fliA* chez les mutants MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC* restaure aussi le phénotype mucoïde (Gallique et al., en préparation). De même, la mutation du gène *fliA* chez MFE01 entraîne à la fois une perte de mobilité et de mucoïdie. La recherche de promoteurs spécifiques de FliA a donc été réalisée et des résultats préliminaires montrent que de tels promoteurs putatifs ont été retrouvés en amont de différents gènes, en plus de ceux décrits dans l'article 3 (à savoir les gènes *fliS*, *motA*, *flgM* et *flaA*), codant pour un système à deux composants (famille MutS-III), la protéine CheW (chimiotactisme), un transporteur de type MFS (Majeur Facilitator Superfamily), une toxine de type RTX (liaison au calcium) et d'une malate-quinone oxydoréductase.

Par conséquent, des prochaines études sur l'implication de ces différents gènes dans le caractère mucoïde seront réalisées, afin d'expliquer la perte de ce caractère mucoïde, qui semble être spécifiquement régulé par FliA. Cela pourrait-il être dû à une perturbation de la sécrétion des exopolysaccharides (MFS transporteur) ? A l'absence du système à deux composants MutS-III qui pourrait contrôler la production d'autres exopolysaccharides ?

V. Implication du facteur sigma FliA dans la régulation des gènes de classe IV

Tel que décrit dans l'introduction, il existe des différences notables dans la régulation des gènes flagellaires de classe IV entre les souches *P. aeruginosa* PAK et *P. putida* KT2440. En effet, alors que chez *P. aeruginosa*, l'expression des gènes *fliT*, *fliS* et *fliD* est dépendante des régulateurs RpoN et FleQ, celle de *fliS* et *fliD* nécessite le régulateur FliA chez *P. putida*.

Concernant la régulation chez la souche *P. fluorescens* MFE01, on peut se demander si elle est différente de celles décrites chez *P. aeruginosa* et *P. putida*. A ma connaissance, très peu de travaux portent sur la régulation des gènes de classe IV chez les *Pseudomonas fluorescens* par le régulateur FliA. Les études menées l'ont été chez la souche de *P. fluorescens* F113. Dans une publication de 2008, Redondo-Nieto et collaborateurs ont étudié la transcription de la région permettant la synthèse du filament (Redondo-Nieto et al., 2008). Ils ont conclu que la transcription de *fliC* (*flaA*) est sous le contrôle conjoint de FliA, RpoN and FleQ. Cependant, aucun promoteur dépendant de FliA en amont de *fliS* et *fliT* n'a été retrouvé. La protéine à domaine c-di-GMP FlgZ a été décrite chez F113 plus récemment et la transcription de *flgZ* est régulée à la fois par FliA et FleQ (Martínez-Granero et al., 2014). Afin de comprendre la régulation spécifique liée au facteur FliA chez la souche MFE01, nous avons donc envisagé d'étudier l'impact de la mutation *fliA* sur l'expression des différents gènes flagellaires (Gallique et al., en préparation). Différents promoteurs spécifiques au facteur FliA ont été retrouvés en amont des gènes *flaA*, *fliS*, *flgM* et *motA* (figure 19) Chez la souche MFE01Δ*fliA*, les gènes codant pour FlgM (soulignant également un rétrocontrôle négatif), FlaA et FlaG (flagelline), FlgN (la chaperonne des protéines de jonction FlgK et FlgL), FlgZ et MotA (stator) sont sous-exprimés de manière significative (Gallique et al., en préparation). Par ailleurs, l'expression des gènes *fliS* et *fliT* est également diminuée mais de manière non significative. Ce résultat, ainsi que la présence d'un promoteur putatif spécifique au facteur FliA retrouvé en amont, permet d'envisager que ces deux gènes peuvent être sous la régulation à la fois de FliA et d'un autre régulateur (FleQ par exemple). Afin de confirmer ou non l'implication de FliA dans la régulation de *fliS* et *fliT*, il serait judicieux d'étudier leur expression lors de la surexpression de *fliA* chez la souche MFE01+*fliA*.

VI. Effet de la mutation des gènes *hcp1* et *tssC* sur l'expression des gènes flagellaires

L'absence de sécrétion de flagelline chez les mutants MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC* nous a conduit à étudier l'expression relative des gènes de classe IV chez ces mutants (Gallique et al., en préparation). Chez le mutant MFE01Δ*hcp1*, les gènes *flaA* et *flaG*, codant pour la flagelline, sont fortement sous-exprimés. De même,

les gènes *fliT* (FliT est la chaperonne de la protéine de cap FliD), *motA* et *motB* (codant pour les protéines du stator flagellaire) sont significativement sous-exprimés. Bien que plusieurs gènes de classe IV semblent sous-exprimés, la transcription du gène *fliA* n'est pas impactée par la mutation du gène *hcp1*. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : soit la toxine associée à Hcp1 inhibe la transcription de plusieurs gènes de classe IV indépendamment de FliA, soit cet effecteur agit comme un facteur antisigma en interagissant directement avec la protéine régulatrice FliA, qui ne peut alors contrôler l'expression des gènes appartenant au régulon. Il est à noter que la transcription des gènes est restaurée chez le mutant complémenté MFE01Δ*hcp1*+*hcp1* et même augmentée chez MFE01Δ*hcp1*+*fliA*. La surexpression de *fliA* pourrait contrebalancer l'effet de la toxine, c'est-à-dire que le nombre de cible (par exemple FliA) augmenterait considérablement et serait nettement supérieur à celui de la toxine (plus de cible que de toxine aboutissant à une absence d'effet).

Chez le mutant MFE01Δ*tssC*, tous les gènes du régulon, y compris *fliA*, sont sous-exprimés (Gallique et al., en préparation). Ces résultats sont à prendre avec précaution: ceci est-il un effet direct d'une accumulation de plusieurs toxines (dont une empêchant la transcription de *fliA*) ou un effet indirect ? En effet chez ce mutant, l'assemblage de la machinerie du SST6 est déficient, ce qui pourrait avoir un effet indirect sur l'assemblage du flagelle. En concordance avec les résultats phénotypiques de la souche MFE01Δ*tssC*+*tssC*, la surexpression du gène *tssC* ne restaure pas l'expression des gènes de classe IV.

VII. La protéine Hcp1, transport d'au moins deux toxines ciblant l'assemblage du flagelle

L'analyse de l'environnement du gène *hcp1* révèle la présence des gènes *vgrG1* et *tec1* en aval du gène *hcp1* (figure 76). Par méthode de double hybride bactérien BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system) (Karimova et al., 1998), nous avons pu établir un réseau d'interactions des différents constituants associés à Hcp1 (figure 80). La protéine Tec1 interagit spécifiquement avec VgrG1 au niveau de la région C-terminale. De plus, il existe une possibilité d'hétéro-trimères de VgrG, par exemple VgrG1 peut interagir également avec VgrGc1 (en amont du cluster du SST6) et une autre protéine VgrG (VgrG15, probablement tronquée)

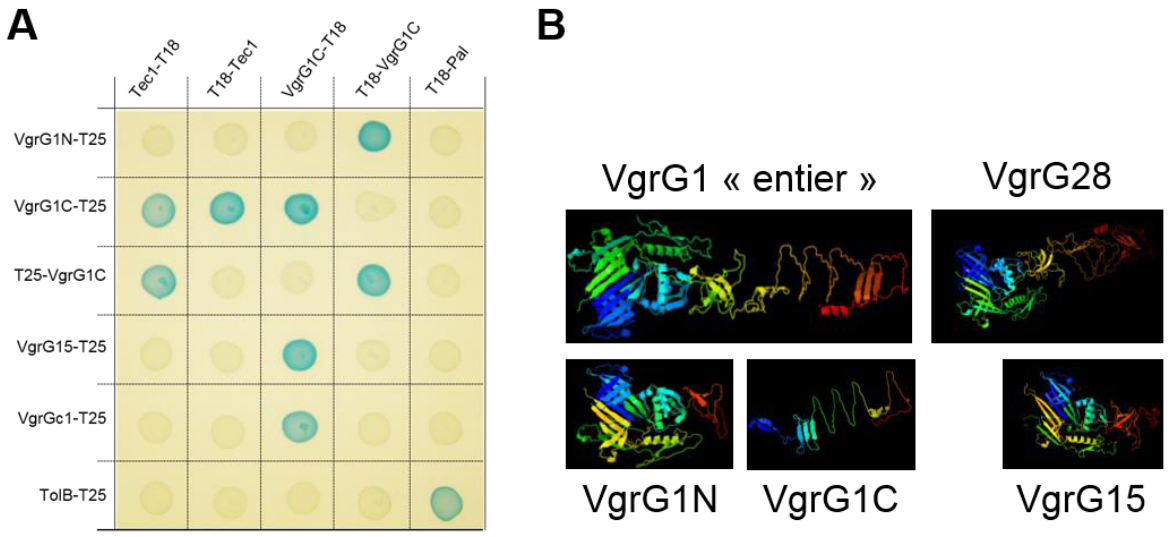


Figure 80: Les différentes interactions entre les protéines VgrG et l'adaptateur Tec1. (non publié). A) Technique de double hybride bactérien reposant sur l'activité complémentaire des domaines T18 (gène sur le plasmide pT18-FLAG) et T25 (gène sur le plasmide pT25-FLAG) de l'adénylate cyclase. VgrG1N et VgrG1C correspondent aux domaines N- et C-terminal de VgrG1 respectivement. VgrG15 et VgrGc1 correspondent à des VgrG différents de VgrG1. L'interaction entre la lipoprotéine Pal et la protéine périplasmique TolB sert de témoin positif. Chaque case correspond à une co-transformation (les deux constructions sur les plasmides pT18-FLAG et pT25-FLAG) de la souche *E. coli* BTH101 déposée sur gélose supplémentée en kanamycine, en ampicilline, en IPTG et en X-gal (substrat chromogène). Les colonies en blanc correspondent à une absence d'interaction alors que les colonies bleues indiquent une interaction entre les domaines T18 et T25 (production d'AMP cyclique) et donc des deux protéines testées. B) Représentation de la structure tridimensionnelle prédite par le logiciel Phyre[2] des protéines testées en BACTH. VgrG1N correspond à la base de VgrG1 (gp27-like) alors que VgrG1C correspond à la pointe de VgrG1 (gp5-like). VgrG15 serait une protéine tronquée (gène *vgrG15* est cloné entièrement) et présente une structure proche avec VgrG1N contrairement à VgrG28 qui est « entier » (comme VgrG1).

Les deux gènes *tec1* et *vgrG1* ont fait l'objet de mutagénèse. Nous nous sommes intéressés au caractère mucoïde et mobile des deux mutants, qui comme attendu étaient non mobiles et non mucoïdes. La mutation de ces deux gènes entraîne également une perte de mobilité, mais étonnamment, n'empêche pas la sécrétion de la flagelline (figure 81), contrairement à ce qui est observé chez les mutants MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC.* Deux hypothèses ont donc été formulées : (i) soit le filament est correctement assemblé chez MFE01Δ*vgrG1* et MFE01Δ*tec1* mais ne tourne pas (par exemple en impactant sur MotAB, protéines impliquées dans l'influx de proton et qui génèrent la force protomotrice permettant la rotation du rotor flagellaire), (ii) soit il y a un problème d'assemblage du filament flagellaire chez MFE01Δ*vgrG1* et MFE01Δ*tec1*. Par microscopie électronique, nous n'avons pas observé de flagelles chez le mutant MFE01Δ*tec1*, démontrant ainsi que la flagelline n'est pas correctement assemblée (figure 82).

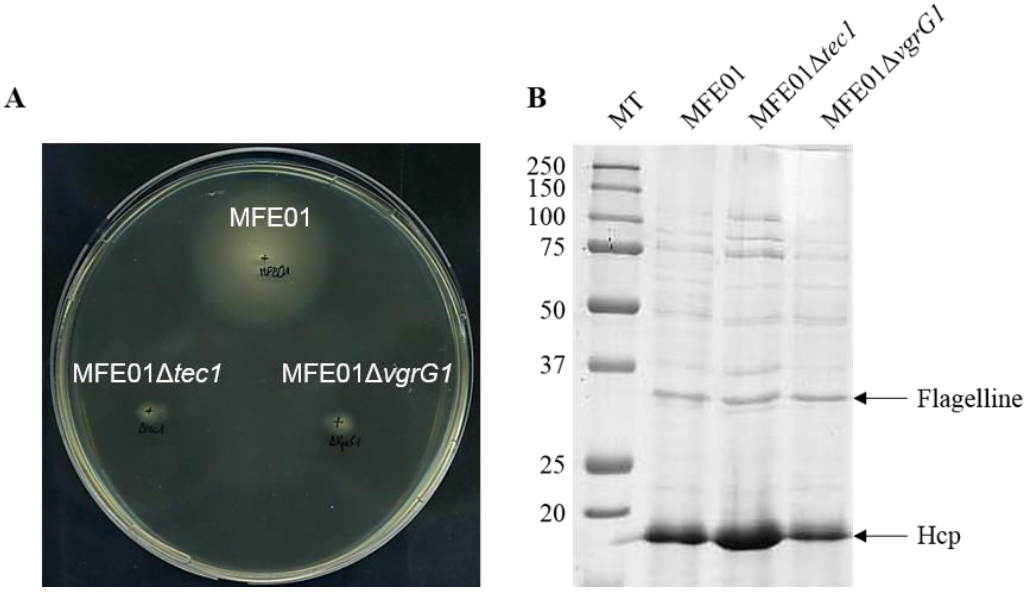


Figure 81: Mobilité et séparation des protéines du surnageant des souches MFE01, MFE01Δ*tec1* et MFE01Δ*vgrG1*. (non publié). A) Les mutations des gènes *tec1* et *vgrG1* entrainent la perte de mobilité de type « swimming » sur gélose LB 0.3% agar. B) Les mutants MFE01Δ*tec1* et MFE01Δ*vgrG1* sécrètent toujours la flagelline dans le surngeant de culture, suggérant alors un problème d'assemblage de la flagelline ou bien d'un flagelle entièrement assemblé mais inactif.

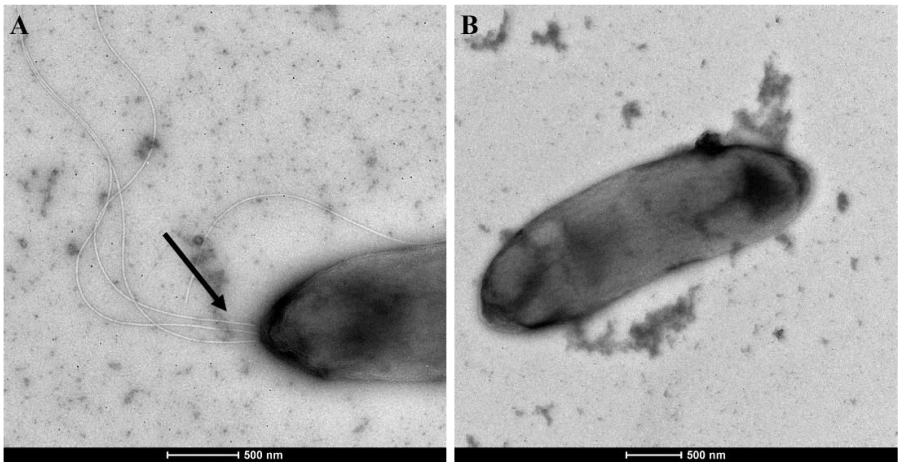


Figure 82: Observation par microscopie électronique à transmission de MFE01 et MFE01Δ*tec1*. (non publié). A) La souche *P. fluorescens* MFE01 possède un à trois flagelles polaires, montrés par la flèche noire. B) La mutation du gène *tec1* entraine une perte des flagelles. Ces photos mettent en évidence l'absence de flagelle chez MFE01Δ*tec1*, qui pourtant sécrète toujours la flagelline.

Ceci nous a amené à reconsidérer notre hypothèse de départ. Il existerait non pas une mais au moins deux toxines exportées par l'intermédiaire de la protéine Hcp1. Une toxine interagirait avec la lumière interne de la protéine Hcp1 et inhiberait la transcription de certains gènes de classe IV dont *flaA* codant pour la flagelline (figure 83). Une autre toxine, n'empêchant pas la sécrétion de la flagelline, interagirait avec

Tec1 (adaptateur fixé sur la partie C-terminale de VgrG1) (figure 83). Il est possible que cette toxine spécifiquement liée à Tec1 interagisse avec une protéine indispensable à l'assemblage correct de la flagelline, mais non essentielle à sa sécrétion. Par exemple, cet effecteur, accumulé dans le cytoplasme des mutants MFE01Δ*vgrG1* et MFE01Δ*tec1* (figure 84) se fixerait directement avec soit FliD ou soit avec sa chaperonne FliT, empêchant ainsi un assemblage correct de la flagelline (sans impacter sa sécrétion). En effet la protéine de cap FliD, localisée à l'extrémité distale du filament, est responsable de l'assemblage de la flagelline et semble agir comme une foldase (Evans et al., 2014). La sécrétion de FliD à travers la lumière interne du flagelle requiert la présence de chaperonne FliT.

Chez le mutant MFE01Δ*hcp1*, ni la toxine associée au niveau de la lumière interne d'Hcp1 ni le complexe VgrG1-Tec1-toxine ne peut être sécrété. Ainsi, le phénotype de MFE01Δ*hcp1* correspond à l'accumulation des toxines interagissant directement avec Hcp1 et celle associée à Tec1. Autrement dit, les phénotypes de MFE01Δ*hcp1* sont corrélés à l'accumulation de plusieurs toxines. *A contrario*, les mutations des gènes *vgrG1* et *tec1* entraînent uniquement l'accumulation de la toxine complexée à l'adaptateur Tec1 et non celle associée au niveau de l'hexamère d'Hcp1. Pour vérifier l'hypothèse d'une seconde toxine (FliT ou FliD serait la cible de la toxine associée à Tec1), nous projetons de surexprimer le gène *fliD* (ou *fliT*) chez les mutants MFE01Δ*tec1* et MFE01Δ*vgrG1*, ce qui devrait restaurer la mobilité de ces mutants.

Il est également prévu de créer un mutant du flagelle de la souche MFE01 (par exemple MFE01Δ*flgK*) afin de tester la capacité de ce mutant à inhiber la mobilité d'une autre souche sur gélose 0.3%. En effet, sur ce type de gélose, la souche sauvage MFE01 se déplace par « swimming », rendant ainsi difficile l'interprétation de la capacité d'immobilisation de MFE01. Ainsi, une culture mixte entre le mutant MFE01Δ*flgK* (non mobile) et une bactérie compétitrice (possédant un flagelle) sur une gélose LB 0.3% agar est envisagée. Seule la souche compétitrice pourrait se déplacer alors que MFE01Δ*flgK* en serait incapable. L'absence d'un halo de mobilité de la souche compétitrice lors de cette culture mixte permettrait de mettre facilement en évidence la capacité d'inhibition de mobilité de MFE01. Ce test sera donc complémentaire à la compétition sur gélose 0.6% agar, qui se limite à des souches bactériennes (MFN1032 par exemple) pouvant se déplacer par « swarming ».

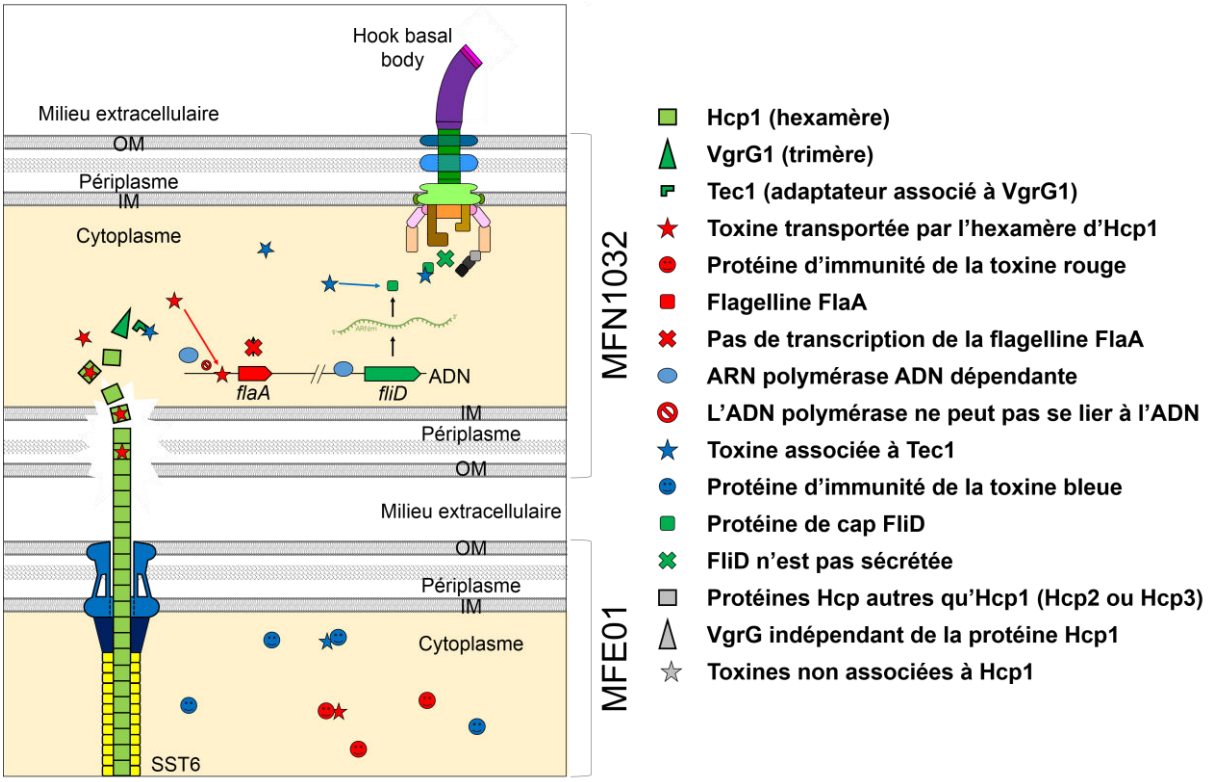


Figure 83: Modèle d'action des toxines associées à Hcp1 sur l'inhibition de mobilité d'une bactérie compétitrice. (non publié). Lors de la compétition en condition de mobilité de type « swarming », la souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 délivre directement dans le cytoplasme de la souche *P. fluorescens* MFN1032 différentes toxines par l'intermédiaire des protéines Hcp1 et Tec1. L'injection de ces toxines est contact-dépendant. La toxine liée à l'adaptateur Tec1 pourrait soit interagir avec la protéine de cap FliD, soit avec sa chaperonne FliT. Par conséquent, cette toxine empêcherait un assemblage correct de la flagelline sans impacter sa sécrétion. Quant à la toxine interagissant avec la lumière interne de l'hexamère d'Hcp1, elle inhiberait la transcription du gène codant pour la flagelline probablement en se fixant directement sur la région promotrice du gène *flaA*. L'injection simultanée de ces deux toxines inhiberait à la fois la production et l'assemblage correct de la flagelline, immobilisant ainsi la bactérie compétitrice. La légende est commune aux figures 83 et 84.

VIII. Identification des toxines associées à Hcp1

Dans la littérature, des toxines ont pu être identifiées par analyse *in silico* (Bernal et al., 2017; Hachani et al., 2014) car, de manière générale, les gènes codant pour les toxines et antitoxines sont présents dans l'environnement du gène *hcp* associé. Pour vérifier que ces gènes codent pour des toxines, des tests phénotypiques sont effectués. Par exemple si l'inactivation d'un gène impact sur l'activité antibactérienne de la souche, ce gène code pour une toxine antibactérienne. En aval du gène *tec1* est présent un gène codant pour une protéine d'environ 1 000 acides aminés (figure 76) (dont le poids moléculaire est estimé à environ 130 kDa) et qui possèderait un large domaine LysM (protéine probablement périplasmique).

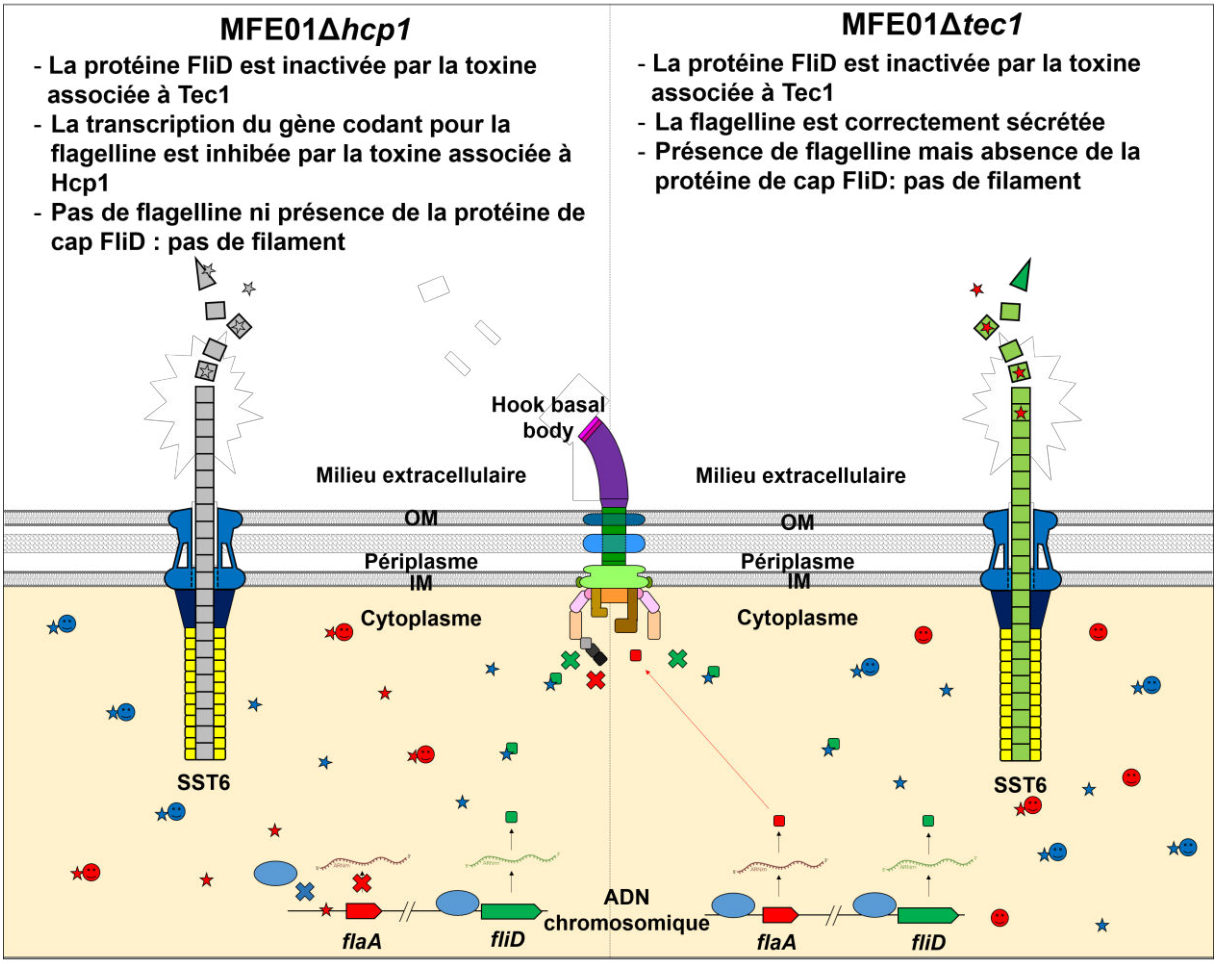


Figure 84: Proposition d'un modèle d'action des toxines associées à Hcp1 et Tec1. (non publié). La mutation du gène *hcp1* (à gauche) empêcherait la sécrétion des deux toxines, provoquant une accumulation des toxines dans le cytoplasme du mutant MFE01Δ*hcp1*. Le taux d'antitoxine devenant alors insuffisant, les toxines agiraient sur les cibles cytoplasmiques et inhiberaient la transcription du gène codant la flagelline et empêcheraient également l'assemblage correct en stoppant la sécrétion de la protéine de cap FliD. Dans le mutant MFE01Δ*tec1* (à droite), la toxine associée à la lumière d'Hcp1 est toujours sécrétée, alors que celle liée à l'adaptateur Tec1 s'accumulerait dans le cytoplasme. Chez ce mutant, seule la toxine associée à Tec1 aurait un effet inhibiteur, à savoir un assemblage incorrect de la flagelline (mais la flagelline est toujours sécrétée). La légende est commune aux figures 83 et 84.

Aucun domaine transmembranaire n'a été identifié sur la protéine LysM, suggérant ainsi que cette protéine périplasmique ne posséderait pas de domaine cytoplasmique. Or nous supposons, en relation avec l'hypothèse d'une accumulation de toxine dans le cytoplasme du mutant MFE01Δ*hcp1* impactant la mobilité de la souche, que la toxine agirait au niveau du cytoplasme. Un récent article (Ho et al., 2017) montre que l'effecteur VgrG3 peut être injecté dans le cytoplasme de la bactérie cible et franchir la membrane interne, *via* un domaine « linker », afin de d'interagir avec la cible : le peptidoglycane. Il est donc possible que cette protéine LysM, bien qu'accumulée

initialement dans le cytoplasme puisse se transférer au niveau des membranes voire même du périplasme et ainsi exercer son activité inhibitrice sur un substrat périplasmique. Cet effecteur peut aussi, par exemple, interagir avec un système à deux composants, inhibant alors une cascade de régulation dont le produit final est cytoplasmique. Ainsi, il existe chez *P. aeruginosa*, trois systèmes à deux composants, PA1611, SagS et ErcS' qui contrôlent la cascade de phosphorylation HptB responsable notamment de l'activation de la mobilité de type « swimming » et « swarming » suite à la séquestration du facteur sigma FlgM par l'anti-antisigma HsbA, libérant ainsi FliA (Bordi et al., 2010; Valentini et al., 2016) (figure 56).

Transposée à notre souche, la protéine à motif LysM, pourrait après avoir franchi la membrane interne, interagir avec un système à deux composants qui empêcherait l'activation de la cascade de phosphorylation HptB-dépendant. Par conséquent ceci aboutirait à une non-activation de l'anti-antisigma HsbA. Le facteur FliA serait donc toujours séquestré et ne pourrait pas activer la transcription des gènes flagellaires de classe IV, impactant ainsi sur l'assemblage du filament et sur la mobilité du mutant (MFE01Δ*hcp1* par exemple).

Suite à cette idée, le gène codant pour cette protéine à motif LysM a été muté et des tests phénotypiques ont été effectués. Ce mutant (pour l'instant appelé MFE01Δ*lysM*) est toujours capable d'inhiber la mobilité de la souche MFN1032, suggérant de prime abord que cette protéine n'est probablement pas impliquée dans l'inhibition de mobilité.

Cependant d'après nos récents résultats, il est envisageable que la protéine Hcp1 soit impliquée dans sécrétion d'au moins deux toxines « anti-flagelle ». Par conséquent, cette protéine LysM pourrait tout de même être une toxine inhibant la mobilité mais la présence de la deuxième toxine chez MFE01Δ*lysM* suffirait à inhiber la mobilité de type « swarming » de MFN1032. Ainsi pour réprimer l'inhibition de mobilité exercée par MFE01, il faudrait donc réaliser la mutation de tous les gènes codant pour les toxines associées à Hcp1 potentiellement impliquées dans l'inhibition de mobilité.

Mais il existe également une autre méthode, qui consiste à cloner ce gène dans un plasmide et de surexprimer ce gène chez une bactérie cible afin d'étudier l'impact sur la mobilité. Par exemple, il est envisagé de réaliser les constructions plasmidiques

suivantes : le gène *lysM* dans le pET-Duet1 (pas de peptide signal, production cytoplasmique) et dans le pET-22b+ (présence d'un peptide signal Sec-dépendant, la protéine est exportée dans le périplasme). Ces constructions seront introduites dans *Escherichia coli* BL21 DE3 (ces plasmides possèdent un promoteur T7). Ainsi, un étalement sur gélose supplémentée en glucose (qui réprime la production de l'ARN-polymérase T7 sous l'influence d'un promoteur P*lac*) empêchera la production de la protéine LysM alors que l'IPTG activera la production. Ainsi, si la production de LysM inhibe la mobilité de la souche BL21 DE3, alors la protéine LysM pourrait être une des toxines associées à Hcp1 inhibant la mobilité d'une bactérie cible.

Il est également important de noter que le gène précédant *lysM* coderait pour un tétratricopeptide putatif (TPR), qui possède une localisation périplasmique présumée. La présence de ces deux gènes adjacents, qui codent pour des protéines localisées dans le même compartiment cellulaire pourrait alors refléter un couple toxine-antitoxine. La protéine TPR pourrait dont être la protéine d'immunité correspondant à la toxine LysM. En effet, pour protéger la bactérie productrice, la protéine d'immunité doit être localisée dans le même compartiment cellulaire (par exemple le périplasme) que la cible de la toxine.

Les toxines et antitoxines peuvent également être identifiées par mutagénèse aléatoire (Tn-seq) (Dong et al., 2013). Cependant, l'identification d'antitoxines « anti-flagelle » de la souche MFE01 peut s'avérer longue et très compliquée. En effet, la mutation de l'antitoxine induirait la perte de la mobilité de la souche, et donc un test de mobilité permettrait d'identifier le gène codant pour l'antitoxine. Cependant, la mutation des gènes flagellaires auraient exactement le même phénotype. Par exemple, la mutation du gène *fliA* entraîne également la perte de mobilité. Or il existe une quarantaine de gènes flagellaires (codant pour les protéines structurales du flagelle ou bien du chimiotactisme par exemple). De plus l'identification de la toxine par cette méthode est également compliquée, puisque un test d'inhibition de type « swarming » des différents mutants doit être effectué. Ce test doit être rigoureux puisque une humidité différente des boîtes LB 0.6% agar peut impacter sur la mobilité de type « swarming ». De plus, les récents résultats soulignent une probable existence de deux toxines « anti-flagelle ». Ainsi, la mutation d'un seul gène codant pour une des deux toxines « anti-flagelle » n'affecterait pas la capacité d'inhiber la mobilité de la souche

MFN1032. Pour résumer, cette méthode est lourde et demande beaucoup de temps, d'autres méthodes ont alors été envisagées.

En effet, il existe d'autres façons d'identifier les toxines. Tout d'abord, on suppose que les deux toxines interagissent avec Hcp1 et Tec1 respectivement. Ainsi, une étiquette de type FLAG (séquence protéique : DYKDDDDK) a été rajoutée à la protéine Tec1 sur un plasmide de surexpression (suite aux récents résultats, une étiquette FLAG sera rajoutée à la protéine Hcp1). Par méthode de Co-immunoprécipitation, des billes d'agarose couplées aux anticorps anti-FLAG permettront de précipiter de manière spécifique la protéine Tec1 (*via* le domaine N-terminal FLAG rajouté) et ainsi de précipiter tous les interactants de cette protéine, dont la toxine. Au cours de ma thèse, nous avons utilisé cette méthode pour identifier la toxine mais il reste à mettre au point la production de la protéine FLAG-Tec1 ; car cette dernière est fortement produite chez *E. coli* et forme des corps d'inclusion qui précipitent parmi les débris bactériens. Par conséquent, des fusions traductionnelles entre la séquence FLAG et le gène chromosomique *tec1* ainsi que le gène *hcp1* chez MFE01 sont prévues.

Nous pensons aussi identifier les toxines par couplage HPLC-MS (chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse). En effet, le mutant MFE01Δ*hcp1* ne sécrète plus dans le surnageant de culture diverses protéines, telles que Hcp1, VgrG1, Tec1, la flagelline mais également les toxines associées (et peut être encore d'autres protéines) par rapport à la souche sauvage MFE01. Par conséquent, le profil des protéines du surnageant sera différent entre la souche sauvage et le mutant MFE01Δ*hcp1*. Les protéines absentes chez le mutant MFE01Δ*hcp1* par rapport à la souche sauvage seront identifiées par spectrométrie de masse grâce à une future collaboration avec le laboratoire de biotechnologie et chimie marines (LBCM) à Lorient.

CONCLUSION

Par les travaux menés au cours de ma thèse et précédemment, nous avons montré que la souche non virulente *P. fluorescens* MFE01 possède une activité compétitrice *via* le système de sécrétion de type VI. Cette souche utiliserait ce mécanisme afin de coloniser et persister au sein d'une niche écologique (figure 79). Le rôle du SST6 de cette souche est multiple, à la fois impliqué dans l'activité antibactérienne, dans la protection de plantes vis-à-vis de phytopathogènes et dans l'inhibition de mobilité de type « swarming ». Plusieurs points concernant le rôle du SST6 restent encore à éclaircir notamment sur les toxines associées à Hcp1. Quelles sont-elles, que ciblent-elles spécifiquement ? Mais on peut également se demander quels sont les véritables rôles de ces toxines. Sont-elles capables d'inhiber l'assemblage du flagelle des phytopathogènes ? Empêchent-elle ainsi leur colonisation au niveau du système racinaire de la plante et ainsi participent-elles au caractère phyto-protecteur de MFE01? Actuellement, la régulation du SST6 de cette souche n'a pas encore été étudiée, bien que nous supposions que la régulation fasse intervenir le facteur sigma RpoN. Dans quelles conditions le SST6 est-il activé ? La présence d'exsudats ou de phytohormones produits par la plante active-t-elle le SST6 de MFE01 ?

En prenant compte le potentiel phyto-protecteur de cette souche, des recherches appliquées sont envisageables, notamment en agriculture. Il est programmé d'étudier la « cohabitation » entre différentes bactéries impliquées dans la protection de la plante (figure 79). Par exemple, *Rhodococcus erythropolis* produit des molécules impliquées dans le quorum quenching en dégradant les molécules du quorum sensing de phytopathogènes. *R. erythropolis* peut donc interférer avec le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* qui produit des homosérines lactones. Lorsque le niveau de ces molécules atteint un seuil critique, la population de ce phytopathogène secrète de manière synchronisée des enzymes dégradant la paroi des végétaux. *R. erythropolis* capable de dégrader ces molécules empêcherait donc une communication entre les *Agrobacterium* et limiterait ainsi l'attaque de ce phytopathogène. La question à se poser est la suivante : MFE01 cohabite-t-elle avec *R. erythropolis* sans exercer d'activité antibactérienne? De même avec d'autres bactéries de type PGRP telles que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* ou bien *Pseudomonas brassicaceum*. Ainsi l'utilisation d'un « cocktail » de bactéries bénéfiques pour la croissance de plante est-il à envisager et serait-il plus efficace que l'utilisation d'une seule espèce bactérienne dans l'agriculture ?

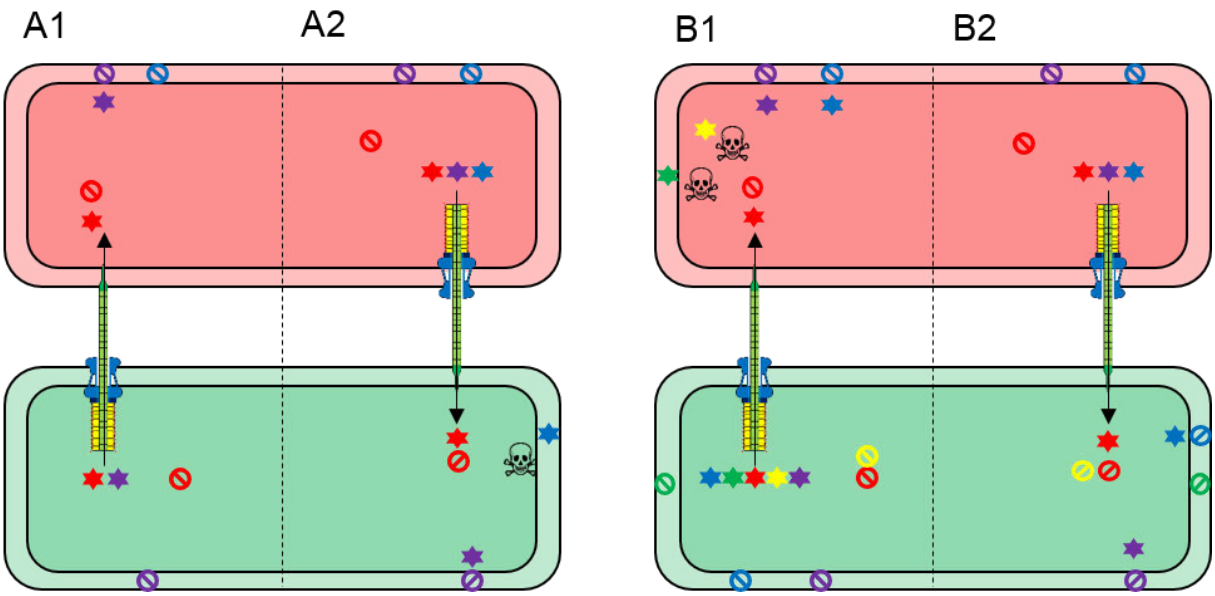


Figure 85: Les effecteurs jouent un rôle crucial dans la compétition et l'adaptation. (non publié).

Les effecteurs sont représentés par des étoiles et les antitoxines par les ronds barrés. Les couples effecteurs / antitoxines apparaissent de la même couleur. En vert : bactérie d'intérêt qui à gauche (A1 et A2) possède très peu de couples toxines / antitoxines et à droite (B1 et B2) en possède d'avantage. En rouge : bactérie compétitrice (à gauche et à droite, la bactérie compétitrice possède le même nombre de couples toxines / antitoxines).

A1 : La bactérie (verte) possède très peu de couples toxines / antitoxines (deux couples), ce qui ne permet pas de tuer la bactérie compétitrice (en rouge) car cette dernière possède les antitoxines appropriées (immunité croisée). La bactérie en vert est très peu compétitive.

A2 : De plus, la bactérie verte est d'avantage sensible à la bactérie compétitrice car elle possède peu d'antitoxine et a de faibles chances de posséder les antitoxines permettant de se protéger des effets néfastes des toxines injectées par la bactérie compétitrice. La bactérie en vert est très peu persistante.

B1 : Contrairement à ce qui est décrit en A1 et A2, la bactérie en vert possède d'avantage de couples toxines / antitoxines, ce qui lui permet de tuer la bactérie compétitrice (car cette dernière a moins de chances d'avoir toutes les antitoxines conférant la résitance). La bactérie en vert est fortement compétitive.

B2 : Grace à la production de nombreuses toxines, la bactérie en vert possède les antitoxines appropriées et à donc plus de chances de résister à l'injection de toxines par la bactérie compétitrice. Ainsi la bactérie en vert est plus résistante et persistante.

La production de toxines et d'antitoxines par une bactérie est donc importante dans la compétition, dans la colonisation et dans la persistance au sein d'une niche écologique. Plus une bactérie est « armée », plus elle est compétitive. Plus une bactérie possède de protéines d'immunité, plus cette dernière résistera vis-à-vis de bactéries compétitrices, est donc plus persistante.

Les différentes couleurs ne représentent pas seulement des toxines différentes mais surtout des toxines qui ciblent des éléments différents. Par exemple, on peut imaginer qu'une souche produisant des effecteurs ciblant le peptidoglycane (amidase et glycoside hydrolase), l'ADN (nucléase), les membranes (lipase) mais également le flagelle (non encore décrit, mais MFE01 semble en produire plusieurs) est plus adaptative. En effet, il est peu probable que la bactérie cible possède cette panoplie d'antitoxines conférant la résistance à toutes les toxines injectées. Il est important de rappeler ici que la protéine d'immunité Rap1a produite chez *E. coli* permet de résister fortement à l'activité antibactérienne de MFE01, qui pourtant sécrète plusieurs toxines *via* Hcp2 et Hcp3 (une seule antitoxine permet la résitance face à plusieurs toxines, qui ciblent le même compartiment cellulaire, à savoir le périplasme) !

L'avantage compétitif d'une souche n'est pas lié uniquement à la possession d'un SST6 mais dépend surtout de son « arsenal » d'effecteurs-antitoxines. Plus une bactérie possède de couples toxines-antitoxines, plus cette bactérie est compétitrice (une panoplie d'effecteurs différents a plus de chance de tuer la bactérie cible) et persiste mieux dans une niche écologique (la bactérie possédant différentes protéines d'immunité a plus de chance de résister à différents effecteurs de la bactérie compétitrice) (figure 85). Par exemple, *Vibrio cholerae* utilise le transfert horizontal de gènes dans le but d'acquérir un « répertoire » plus large de couples toxines-antitoxines du SST6 afin d'être plus compétitive (Thomas et al., 2017). Ainsi, le SST6 offre un pouvoir adaptatif dans l'environnement, et est par conséquent indispensable à la survie dans ce monde bactérien sans merci. Les diverses effecteurs produits par MFE01 ciblant à la fois le peptidoglycane, les lipides ou bien le flagelle lui confèrent donc une compétitivité importante dans une niche environnementale (figure 85).

En résumé, le SST6 de la souche MFE01 pourrait jouer un rôle crucial dans la protection de végétaux. Les pesticides utilisés dans l'agriculture sont sujets à controverse. L'utilisation de micro-organismes en substitution des produits chimiques est non négligeable et apporte de nombreux avantages : les pesticides détruisent autant les phytopathogènes que les bactéries bénéfiques qui assurent une barrière protectrice vis-à-vis des agents infectieux résistants. De plus, certains de ces agents chimiques s'avèrent nocifs pour l'environnement et pour la santé humaine. Les micro-organismes quant à eux s'avèrent plus respectueux et plus naturels. Après tout, l'utilisation de bactéries contre des pathogènes s'avère être un excellent moyen de lutte en agriculture dans l'avenir. "Le meilleur médecin est la nature : elle guérit les trois quarts des maladies et ne dit jamais de mal de ses confrères." Louis Pasteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A.D., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B.J., and Bitter, W. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 883–891.

Abendroth, U., Adlung, N., Otto, A., Grüneisen, B., Becher, D., and Bonas, U. (2017). Identification of new protein-coding genes with a potential role in the virulence of the plant pathogen Xanthomonas euvesicatoria. BMC Genomics *18*, 625.

Abuladze, N.K., Gingery, M., Tsai, J., and Eiserling, F.A. (1994). Tail length determination in bacteriophage T4. Virology *199*, 301–310.

Adhikary, H., Sanghavi, P.B., Macwan, S.R., Archana, G., and Naresh Kumar, G. (2014). Artificial Citrate Operon Confers Mineral Phosphate Solubilization Ability to Diverse Fluorescent Pseudomonads. PLoS ONE *9*.

Albano, L.J., and Macfie, S.M. (2016). Investigating the ability of Pseudomonas fluorescens UW4 to reduce cadmium stress in Lactuca sativa *via* an intervention in the ethylene biosynthetic pathway. Can. J. Microbiol. *62*, 1057–1062.

Allsopp, L.P., Wood, T.E., Howard, S.A., Maggiorelli, F., Nolan, L.M., Wettstadt, S., and Filloux, A. (2017). RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 7707–7712.

Alteri, C.J., Himpsl, S.D., Pickens, S.R., Lindner, J.R., Zora, J.S., Miller, J.E., Arno, P.D., Straight, S.W., and Mobley, H.L.T. (2013). Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. PLoS Pathog. *9*, e1003608.

Arora, N.K., Khare, E., Oh, J.H., Kang, S.C., and Maheshwari, D.K. (2008). Diverse mechanisms adopted by fluorescent Pseudomonas PGC2 during the inhibition of Rhizoctonia solani and Phytophthora capsici. World J. Microbiol. Biotechnol. *24*, 581–585.

Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1998). The Pseudomonas aeruginosa Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion. Infect. Immun. *66*, 1000–1007.

Arshad, M., Saleem, M., and Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. Trends Biotechnol. *25*, 356–362.

Aschtgen, M.-S., Bernard, C.S., De Bentzmann, S., Lloubès, R., and Cascales, E. (2008). SciN Is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enteroaggregative Escherichia coli. J. Bacteriol. *190*, 7523–7531.

Aschtgen, M.-S., Thomas, M.S., and Cascales, E. (2010a). Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else? Virulence *1*, 535–540.

Aschtgen, M.-S., Gavioli, M., Dessen, A., Lloubès, R., and Cascales, E. (2010b). The SciZ protein anchors the enteroaggregative Escherichia coli Type VI secretion system to the cell wall. Mol. Microbiol. *75*, 886–899.

Baehler, E., Bottiglieri, M., Péchy-Tarr, M., Maurhofer, M., and Keel, C. (2005). Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0. J. Appl. Microbiol. *99*, 24–38.

Baker, A.E., Diepold, A., Kuchma, S.L., Scott, J.E., Ha, D.G., Orazi, G., Armitage, J.P., and O'Toole, G.A. (2016). PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *198*, 1837–1846.

Bange, G., Kümmerer, N., Engel, C., Bozkurt, G., Wild, K., and Sinning, I. (2010). FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 11295–11300.

Bangera, M.G., and Thomashow, L.S. (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from Pseudomonas fluorescens Q2-87. J. Bacteriol. *181*, 3155–3163.

Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Zea-Bonilla, T., Pérez-Jiménez, R.M., Martín, M., and Rivilla, R. (2011). Pseudomonas fluorescens F113 Mutant with Enhanced Competitive Colonization Ability and Improved Biocontrol Activity against Fungal Root Pathogens ▿. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 5412–5419.

Barahona, E., Navazo, A., Garrido-Sanz, D., Muriel, C., Martínez-Granero, F., Redondo-Nieto, M., Martín, M., and Rivilla, R. (2016). Pseudomonas fluorescens F113 Can Produce a Second Flagellar Apparatus, Which Is Important for Plant Root Colonization. Front. Microbiol. *7*.

Barbey, C., Crépin, A., Cirou, A., Budin-Verneuil, A., Orange, N., Feuilloley, M., Faure, D., Dessaux, Y., Burini, J.-F., and Latour, X. (2012). Catabolic pathway of gamma-caprolactone in the biocontrol agent Rhodococcus erythropolis. J. Proteome Res. *11*, 206–216.

Barret, M., Egan, F., Fargier, E., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2011). Genomic analysis of the type VI secretion systems in Pseudomonas spp.: novel clusters and putative effectors uncovered. Microbiology *157*, 1726–1739.

Bartonickova, L., Sterzenbach, T., Nell, S., Kops, F., Schulze, J., Venzke, A., Brenneke, B., Bader, S., Gruber, A.D., Suerbaum, S., et al. (2013). Hcp and VgrG1 are secreted components of the Helicobacter hepaticus type VI secretion system and VgrG1 increases the bacterial colitogenic potential. Cell. Microbiol. *15*, 992–1011.

Basler, M. (2015). Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *370*.

Basler, M., and Mekalanos, J.J. (2012). Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. Science *337*, 815.

Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, P.G., Jensen, J.G., and Mekalanos, J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. Nature *483*, 182–186.

Basler, M., Ho, B.T., and Mekalanos, J.J. (2013). Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. Cell *152*, 884–894.

Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in Escherichia coli. Methods San Diego Calif *58*, 325–334.

Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutéra, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L., Hémery, G., Linossier, I., Chevalier, S., Wozniak, D.J., et al. (2010). The Sigma Factor AlgU Plays a Key Role in Formation of Robust Biofilms by Nonmucoid Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *192*, 3001–3010.

Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A., and Llamas, M.A. (2017). The Pseudomonas putida T6SS is a plant warden against phytopathogens. ISME J. *11*, 972–987.

Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gueguen, E., and Cascales, E. (2010). Nooks and crannies in type VI secretion regulation. J. Bacteriol. *192*, 3850–3860.

Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gavioli, M., Lloubès, R., and Cascales, E. (2011). Regulation of Type VI Secretion Gene Clusters by σ54 and Cognate Enhancer Binding Proteins▿. J. Bacteriol. *193*, 2158–2167.

Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. Curr. Opin. Microbiol. *11*, 3–8.

Bladergroen, M.R., Badelt, K., and Spaink, H.P. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic Rhizobium leguminosarum strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *16*, 53–64.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. Int. J. Med. Microbiol. *300*, 534–543.

Bleves, S. (2017). Don't judge a book by its cover: The Hcps are not only structural components of the T6SS machinery. Virulence 1–2.

Blokesch, M. (2015). Competence-induced type VI secretion might foster intestinal colonization by Vibrio cholerae. BioEssays *37*, 1163–1168.

Blondel, C.J., Jiménez, J.C., Contreras, I., and Santiviago, C.A. (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. BMC Genomics *10*, 354.

Böck, D., Medeiros, J.M., Tsao, H.-F., Penz, T., Weiss, G.L., Aistleitner, K., Horn, M., and Pilhofer, M. (2017). In situ architecture, function, and evolution of a contractile injection system. Science *357*, 713–717.

Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., and Quillet, L. (2012). Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in Pseudomonas. PLoS ONE *7*.

Bondage, D.D., Lin, J.-S., Ma, L.-S., Kuo, C.-H., and Lai, E.-M. (2016). VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E3931-3940.

Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., and Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. EMBO J. *28*, 315–325.

Bönemann, G., Pietrosiuk, A., and Mogk, A. (2010). Tubules and donuts: a type VI secretion story. Mol. Microbiol. *76*, 815–821.

Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., et al. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Mol. Microbiol. *76*, 1427–1443.

Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scrignari, T., and Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of Vibrio cholerae fosters horizontal gene transfer. Science *347*, 63–67.

Bottiglieri, M., and Keel, C. (2006). Characterization of PhlG, a Hydrolase That Specifically Degrades the Antifungal Compound 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Biocontrol Agent Pseudomonas fluorescens CHA0. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 418–427.

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Hancock, R.E.W., Dufour, A., et al. (2012). Transcription of the oprF Gene of Pseudomonas aeruginosa Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced. J. Bacteriol. *194*, 4301–4311.

Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? BMC Genomics *10*, 104.

Brackmann, M., Nazarov, S., Wang, J., and Basler, M. (2017). Using Force to Punch Holes: Mechanics of Contractile Nanomachines. Trends Cell Biol.

Brazelton, J.N., Pfeufer, E.E., Sweat, T.A., Gardener, B.B.M., and Coenen, C. (2008). 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 1349–1358.

Bröms, J.E., Sjöstedt, A., and Lavander, M. (2010). The Role of the Francisella Tularensis Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. Front. Microbiol. *1*, 136.

de Bruijn, I., and Raaijmakers, J.M. (2009a). Diversity and Functional Analysis of LuxR-Type Transcriptional Regulators of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis in Pseudomonas fluorescens. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 4753–4761.

de Bruijn, I., and Raaijmakers, J.M. (2009b). Regulation of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis in Pseudomonas fluorescens by the ClpP Protease. J. Bacteriol. *191*, 1910–1923.

de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T.A., and Raaijmakers, J.M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in Pseudomonas species. Mol. Microbiol. *63*, 417–428.

de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., de Waard, P., van Beek, T.A., and Raaijmakers, J.M. (2008). Massetolide A Biosynthesis in Pseudomonas fluorescens. J. Bacteriol. *190*, 2777–2789.

Brunet, Y.R., Hénin, J., Celia, H., and Cascales, E. (2014). Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. EMBO Rep. *15*, 315–321.

Brunet, Y.R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., and Cascales, E. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex *via* Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. PLoS Genet. *11*, e1005545.

Burketova, L., Trda, L., Ott, P.G., and Valentova, O. (2015). Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. Biotechnol. Adv. *33*, 994–1004.

Burtnick, M.N., Brett, P.J., Harding, S.V., Ngugi, S.A., Ribot, W.J., Chantratita, N., Scorpio, A., Milne, T.S., Dean, R.E., Fritz, D.L., et al. (2011). The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in Burkholderia pseudomallei. Infect. Immun. *79*, 1512–1525.

Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., and O'Toole, G.A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *187*, 7351–7361.

Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., and Martín, M. (2004). Analysis of Pseudomonas fluorescens F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. Microbiol. Read. Engl. *150*, 3889–3897.

Cardarelli, L., Saak, C., and Gibbs, K.A. (2015). Two Proteins Form a Heteromeric Bacterial Self-Recognition Complex in Which Variable Subdomains Determine Allele-Restricted Binding. MBio *6*.

Casabona, M.G., Silverman, J.M., Sall, K.M., Boyer, F., Couté, Y., Poirel, J., Grunwald, D., Mougous, J.D., Elsen, S., and Attree, I. (2013). An ABC-transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in Pseudomonas aeruginosa. Environ. Microbiol. *15*, 471–486.

Cascales, E. (2008). The type VI secretion toolkit. EMBO Rep. *9*, 735–741.

Cascales, E., and Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *367*, 1102–1111.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., and Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *11*, 1119–1129.

Chang, W., Small, D.A., Toghrol, F., and Bentley, W.E. (2005). Microarray analysis of Pseudomonas aeruginosa reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. BMC Genomics *6*, 115.

Chang, Y.-W., Rettberg, L.A., Ortega, D.R., and Jensen, G.J. (2017). In vivo structures of an intact type VI secretion system revealed by electron cryotomography. EMBO Rep.

Chapalain, A., Rossignol, G., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Gruffaz, C., Guerillon, J., Meyer, J.-M., Orange, N., and Feuilloley, M.G.J. (2008). Comparative study of 7 fluorescent pseudomonad clinical isolates. Can. J. Microbiol. *54*, 19–27.

Chatzidaki-Livanis, M., Geva-Zatorsky, N., and Comstock, L.E. (2016). Bacteroides fragilis type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 3627–3632.

Chen, L., Zou, Y., She, P., and Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol. Res. *172*, 19–25.

Chen, W.-J., Kuo, T.-Y., Hsieh, F.-C., Chen, P.-Y., Wang, C.-S., Shih, Y.-L., Lai, Y.-M., Liu, J.-R., Yang, Y.-L., and Shih, M.-C. (2016). Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in Pseudomonas taiwanensis. Sci. Rep. *6*, 32950.

Cheng, X., de Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J.E., and Raaijmakers, J.M. (2013). The Gac regulon of Pseudomonas fluorescens SBW25. Environ. Microbiol. Rep. *5*, 608–619.

Cheng, X., van der Voort, M., and Raaijmakers, J.M. (2015). Gac-mediated changes in pyrroloquinoline quinone biosynthesis enhance the antimicrobial activity of Pseudomonas fluorescens SBW25. Environ. Microbiol. Rep. *7*, 139–147.

Cheng, X., Cordovez, V., Etalo, D.W., van der Voort, M., and Raaijmakers, J.M. (2016). Role of the GacS Sensor Kinase in the Regulation of Volatile Production by Plant Growth-Promoting Pseudomonas fluorescens SBW25. Front. Plant Sci. *7*, 1706.

Chernin, L., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Kim, S., Ben-Ari, J., Khmel, I., and Vainstein, A. (2011). Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. Environ. Microbiol. Rep. *3*, 698–704.

Chow, J., and Mazmanian, S.K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. Cell Host Microbe *7*, 265–276.

Cianfanelli, F.R., Monlezun, L., and Coulthurst, S.J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. Trends Microbiol. *24*, 51–62.

Clemens, D.L., Ge, P., Lee, B.-Y., Horwitz, M.A., and Zhou, Z.H. (2015). Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. Cell *160*, 940–951.

Cornelis, P., and Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. Environ. Microbiol. *4*, 787–798.

Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 343–359.

Cotter, P. (2011). Microbiology: Molecular syringes scratch the surface. Nature *475*, 301–303.

Coulthurst, S.J. (2013). The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. Res. Microbiol. *164*, 640–654.

Coyne, M.J., Zitomersky, N.L., McGuire, A.M., Earl, A.M., and Comstock, L.E. (2014). Evidence of Extensive DNA Transfer between Bacteroidales Species within the Human Gut. MBio *5*, e01305-14.

Coyne, M.J., Roelofs, K.G., and Comstock, L.E. (2016). Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. BMC Genomics *17*, 58.

Crépin, A., Barbey, C., Beury-Cirou, A., Hélias, V., Taupin, L., Reverchon, S., Nasser, W., Faure, D., Dufour, A., Orange, N., et al. (2012). Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (Dickeya and Pectobacterium spp.). PloS One *7*, e35176.

Dagorn, A., Chapalain, A., Mijouin, L., Hillion, M., Duclairoir-Poc, C., Chevalier, S., Taupin, L., Orange, N., and Feuilloley, M.G.J. (2013). Effect of GABA, a bacterial metabolite, on Pseudomonas fluorescens surface properties and cytotoxicity. Int. J. Mol. Sci. *14*, 12186–12204.

Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., Keshelava, R., Tediashvili, M., Vainstein, A., Khmel, I., Szegedi, E., et al. (2011). Broad-range antagonistic rhizobacteria Pseudomonas fluorescens and Serratia plymuthica suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. J. Appl. Microbiol. *110*, 341–352.

Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. Mol. Microbiol. *50*, 809–824.

Davey, M.E., and O'toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *64*, 847–867.

De Maeyer, K., D'aes, J., Hua, G.K.H., Perneel, M., Vanhaecke, L., Noppe, H., and Höfte, M. (2011). N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing Pseudomonas isolates from the red cocoyam rhizosphere. Microbiol. Read. Engl. *157*, 459–472.

De Weger, L.A., van der Vlugt, C.I., Wijfjes, A.H., Bakker, P.A., Schippers, B., and Lugtenberg, B. (1987). Flagella of a plant-growth-stimulating Pseudomonas fluorescens strain are required for colonization of potato roots. J. Bacteriol. *169*, 2769–2773.

Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2014). A type VI secretion system is involved in Pseudomonas fluorescens bacterial competition. PloS One *9*, e89411.

Decoin, V., Gallique, M., Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C.D., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2015). A Pseudomonas fluorescens type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. BMC Microbiol. *15*, 72.

Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., and Henderson, I.R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. Trends Microbiol. *17*, 139–145.

Devi, K.K., and Kothamasi, D. (2009). Pseudomonas fluorescens CHA0 can kill subterranean termite Odontotermes obesus by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. FEMS Microbiol. Lett. *300*, 195–200.

Dingemans, J., Ghequire, M.G.K., Craggs, M., De Mot, R., and Cornelis, P. (2016). Identification and functional analysis of a bacteriocin, pyocin S6, with ribonuclease activity from a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis clinical isolate. MicrobiologyOpen *5*, 413–423.

Dixon, R., and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 621–631.

Dobro, M.J., Oikonomou, C.M., Piper, A., Cohen, J., Guo, K., Jensen, T., Tadayon, J., Donermeyer, J., Park, Y., Solis, B.A., et al. (2017). Uncharacterized bacterial structures revealed by electron cryotomography. J. Bacteriol.

Dong, T.G., Ho, B.T., Yoder-Himes, D.R., and Mekalanos, J.J. (2013). Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in Vibrio cholerae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 2623–2628.

Douzi, B., Brunet, Y.R., Spinelli, S., Lensi, V., Legrand, P., Blangy, S., Kumar, A., Journet, L., Cascales, E., and Cambillau, C. (2016). Structure and specificity of the Type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative Escherichia coli. Sci. Rep. *6*, 34405.

Dowling, A.J., Waterfield, N.R., Hares, M.C., Le Goff, G., Streuli, C.H., and Ffrench-Constant, R.H. (2007). The Mcf1 toxin induces apoptosis *via* the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. Cell. Microbiol. *9*, 2470–2484.

Dudley, E.G., Thomson, N.R., Parkhill, J., Morin, N.P., and Nataro, J.P. (2006). Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative Escherichia coli. Mol. Microbiol. *61*, 1267–1282.

Dunkel, M., Schmidt, U., Struck, S., Berger, L., Gruening, B., Hossbach, J., Jaeger, I.S., Effmert, U., Piechulla, B., Eriksson, R., et al. (2009). SuperScent--a database of flavors and scents. Nucleic Acids Res. *37*, D291-294.

Durand, E., Zoued, A., Spinelli, S., Watson, P.J.H., Aschtgen, M.-S., Journet, L., Cambillau, C., and Cascales, E. (2012a). Structural Characterization and Oligomerization of the TssL Protein, a Component Shared by Bacterial Type VI and Type IVb Secretion Systems. J. Biol. Chem. *287*, 14157–14168.

Durand, E., Derrez, E., Audoly, G., Spinelli, S., Ortiz-Lombardia, M., Raoult, D., Cascales, E., and Cambillau, C. (2012b). Crystal structure of the VgrG1 actin cross-linking domain of the Vibrio cholerae type VI secretion system. J. Biol. Chem. *287*, 38190–38199.

Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E., and Journet, L. (2014). VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. Trends Microbiol. *22*, 498–507.

Durand, E., Nguyen, V.S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M.-S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujeancourt, A., et al. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. Nature *523*, 555–560.

Elfarash, A., Wei, Q., and Cornelis, P. (2012). The soluble pyocins S2 and S4 from Pseudomonas aeruginosa bind to the same FpvAI receptor. MicrobiologyOpen *1*, 268–275.

El-Sayed, A.K., Hothersall, J., and Thomas, C.M. (2001). Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in Pseudomonas fluorescens NCIMB 10586. Microbiology *147*, 2127–2139.

Enderle, P.J., and Farwell, M.A. (1998). Electroporation of freshly plated Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa cells. BioTechniques *25*, 954–956, 958.

English, G., Trunk, K., Rao, V.A., Srikannathasan, V., Hunter, W.N., and Coulthurst, S.J. (2012). New secreted toxins and immunity proteins encoded within the Type VI secretion system gene cluster of Serratia marcescens. Mol. Microbiol. *86*, 921–936.

English, G., Byron, O., Cianfanelli, F.R., Prescott, A.R., and Coulthurst, S.J. (2014). Biochemical analysis of TssK, a core component of the bacterial Type VI secretion system, reveals distinct oligomeric states of TssK and identifies a TssK–TssFG subcomplex. Biochem. J. *461*, 291–304.

Evans, L.D.B., Hughes, C., and Fraser, G.M. (2014). Building a flagellum outside the bacterial cell. Trends Microbiol. *22*, 566–572.

Evans, L.D.B., Hughes, C., and Fraser, G.M. Building a flagellum in biological outer space. Microb. Cell *1*, 64–66.

Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., Cambillau, C., and Cascales, E. (2011). Towards a Structural Comprehension of Bacterial Type VI Secretion Systems: Characterization of the TssJ-TssM Complex of an Escherichia coli Pathovar. PLoS Pathog. *7*.

Fenice, M. (2016). The Psychrotolerant Antarctic Fungus Lecanicillium muscarium CCFEE 5003: A Powerful Producer of Cold-Tolerant Chitinolytic Enzymes. Mol. Basel Switz. *21*, 447.

Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: Yet another player for protein transport across membranes. Microbiol. Read. Engl. *154*, 1570–1583.

Fischer, S., Godino, A., Quesada, J.M., Cordero, P., Jofré, E., Mori, G., and Espinosa-Urgel, M. (2012). Characterization of a phage-like pyocin from the plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas fluorescens SF4c. Microbiol. Read. Engl. *158*, 1493–1503.

Flaugnatti, N., Le, T.T.H., Canaan, S., Aschtgen, M.-S., Nguyen, V.S., Blangy, S., Kellenberger, C., Roussel, A., Cambillau, C., Cascales, E., et al. (2016). A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. Mol. Microbiol. *99*, 1099–1118.

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. *14*, 563–575.

Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., Dominguez-Ferreras, A., Bloemberg, G., Frey, J., Goesmann, A., et al. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. ISME J. *10*, 2527–2542.

Förster, A., Planamente, S., Manoli, E., Lossi, N.S., Freemont, P.S., and Filloux, A. (2014). Coevolution of the ATPase ClpV, the sheath proteins TssB and TssC, and the accessory protein TagJ/HsiE1 distinguishes type VI secretion classes. J. Biol. Chem. *289*, 33032–33043.

Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K., and Ramphal, R. (2002). Identification and functional characterization of flgM, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *184*, 1514–1521.

Fu, Y., Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. (2013). Tn-Seq Analysis of Vibrio cholerae Intestinal Colonization Reveals a Role for T6SS-Mediated Antibacterial Activity in the Host. Cell Host Microbe *14*, 652–663.

Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2017a). Contribution of the Pseudomonas fluorescens MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. PloS One *12*, e0170770.

Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017b). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? Front. Microbiol. *8*.

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., and de Boer, W. (2014). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. Front. Microbiol. *5*, 289.

Ge, P., Scholl, D., Leiman, P.G., Yu, X., Miller, J.F., and Zhou, Z.H. (2015). Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. Nat. Struct. Mol. Biol. *22*, 377–382.

Ghequire, M.G.K., and Mot, R.D. (2015). The Tailocin Tale: Peeling off Phage Tails. Trends Microbiol. *23*, 587–590.

Ghequire, M.G.K., Dingemans, J., Pirnay, J.-P., De Vos, D., Cornelis, P., and De Mot, R. (2014). O serotype-independent susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to lectin-like pyocins. MicrobiologyOpen *3*, 875–884.

Ghequire, M.G.K., Dillen, Y., Lambrichts, I., Proost, P., Wattiez, R., and De Mot, R. (2015). Different Ancestries of R Tailocins in Rhizospheric Pseudomonas Isolates. Genome Biol. Evol. *7*, 2810–2828.

Ghirardi, S., Dessaint, F., Mazurier, S., Corberand, T., Raaijmakers, J.M., Meyer, J.-M., Dessaux, Y., and Lemanceau, P. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. Microb. Ecol. *64*, 725–737.

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., et al. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Front. Microbiol. *6*.

Goddard, V.J., Bailey, M.J., Darrah, P., Lilley, A.K., and Thompson, I.P. (2001). Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: A community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. Plant Soil *232*, 181–193.

Godino, A., Príncipe, A., and Fischer, S. (2016). A ptsP deficiency in PGPR Pseudomonas fluorescens SF39a affects bacteriocin production and bacterial fitness in the wheat rhizosphere. Res. Microbiol. *167*, 178–189.

Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., and Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in Pseudomonas aeruginosa. Dev. Cell *7*, 745–754.

Groboillot, A., Portet-Koltalo, F., Le Derf, F., Feuilloley, M.J.G., Orange, N., and Poc, C.D. (2011). Novel application of cyclolipopeptide amphisin: feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments. Int. J. Mol. Sci. *12*, 1787–1806.

Gueguen, E., Wills, N.M., Atkins, J.F., and Cascales, E. (2014). Transcriptional frameshifting rescues Citrobacter rodentium type VI secretion by the production of two length variants from the prematurely interrupted tssM gene. PLoS Genet. *10*, e1004869.

Guerrero-Ferreira, R., Hupfeld, M., Nazarov, S., Obbineni, J.M., Loessner, M., Ishikawa, T., Klumpp, J., and Leiman, P. (2015). Structural Analysis of Listeria Phage A511 Baseplate by Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography. Conference microscopy 2015.

Haapalainen, M., Mosorin, H., Dorati, F., Wu, R.-F., Roine, E., Taira, S., Nissinen, R., Mattinen, L., Jackson, R., Pirhonen, M., et al. (2012). Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen Pseudomonas syringae pv. Tomato DC3000, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. J. Bacteriol. *194*, 4810–4822.

Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. *3*, 307–319.

Hachani, A., Allsopp, L.P., Oduko, Y., and Filloux, A. (2014). The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. J. Biol. Chem. *289*, 17872–17884.

Hachani, A., Wood, T.E., and Filloux, A. (2016). Type VI secretion and anti-host effectors. Curr. Opin. Microbiol. *29*, 81–93.

Haiko, J., and Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. Biology *2*, 1242–1267.

Hall, C.W., Zhang, L., and Mah, T.-F. (2017). PA3225 Is a Transcriptional Repressor of Antibiotic Resistance Mechanisms in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. *61*.

Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pée, K.H., and Ligon, J.M. (1997). Four genes from Pseudomonas fluorescens that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2147–2154.

Hancock, R.E., and Carey, A.M. (1979). Outer membrane of Pseudomonas aeruginosa: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J. Bacteriol. *140*, 902–910.

Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 519–529.

Hecht, A.L., Casterline, B.W., Earley, Z.M., Goo, Y.A., Goodlett, D.R., and Bubeck Wardenburg, J. (2016). Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. EMBO Rep. *17*, 1281–1291.

Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., and Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by Pseudomonas fluorescens strains. Biol. Control *81*, 83–92.

Heurlier, K., Dénervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C., and Haas, D. (2003). Negative Control of Quorum Sensing by RpoN (σ54) in Pseudomonas aeruginosa PAO1. J. Bacteriol. *185*, 2227–2235.

Heydorn, A., Ersbøll, B.K., Hentzer, M., Parsek, M.R., Givskov, M., and Molin, S. (2000). Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. Microbiology *146*, 2409–2415.

Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (2002). Statistical Analysis of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 2008–2017.

Heymann, J.B., Bartho, J.D., Rybakova, D., Venugopal, H.P., Winkler, D.C., Sen, A., Hurst, M.R.H., and Mitra, A.K. (2013). Three-dimensional structure of the toxin-delivery particle antifeeding prophage of Serratia entomophila. J. Biol. Chem. *288*, 25276–25284.

Ho, B.T., Basler, M., and Mekalanos, J.J. (2013). Type 6 secretion system-mediated immunity to type 4 secretion system-mediated gene transfer. Science *342*, 250–253.

Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. Cell Host Microbe *15*, 9–21.

Ho, B.T., Fu, Y., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (2017). Vibrio cholerae type 6 secretion system effector trafficking in target bacterial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

Hol, W.H.G., Bezemer, T.M., and Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium Pseudomonas fluorescens. Front. Plant Sci. *4*, 81.

Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., et al. (2010). A type VI secretion system of Pseudomonas aeruginosa targets a toxin to bacteria. Cell Host Microbe *7*, 25–37.

Hood, R.D., Peterson, S.B., and Mougous, J.D. (2017). From Striking Out to Striking Gold: Discovering that Type VI Secretion Targets Bacteria. Cell Host Microbe *21*, 286–289.

Hosking, E.R., Vogt, C., Bakker, E.P., and Manson, M.D. (2006). The Escherichia coli MotAB proton channel unplugged. J. Mol. Biol. *364*, 921–937.

Hsu, F., Schwarz, S., and Mougous, J.D. (2009). TagR Promotes PpkA-Catalyzed Type VI Secretion Activation in Pseudomonas aeruginosa. Mol. Microbiol. *72*, 1111–1125.

Ikeda, T., Kamiya, R., and Yamaguchi, S. (1983). Excretion of flagellin by a short-flagella mutant of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. *153*, 506–510.

Imada, K., Minamino, T., Kinoshita, M., Furukawa, Y., and Namba, K. (2010). Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 8812–8817.

Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., and Khan, M.I.R. (2017). Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. Front. Plant Sci. *8*, 475.

Jacob F. Induced biosynthesis and mode of action of a pyocine, antibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* . Ann Inst Pasteur. 1954;86:149–160.

Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G., and Jin, Q. (2014). A Pseudomonas aeruginosa type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. Cell Host Microbe *15*, 600–610.

Jiang, F., Wang, X., Wang, B., Chen, L., Zhao, Z., Waterfield, N.R., Yang, G., and Jin, Q. (2016). The Pseudomonas aeruginosa Type VI Secretion PGAP1-like Effector Induces Host Autophagy by Activating Endoplasmic Reticulum Stress. Cell Rep. *16*, 1502–1509.

Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *76*, 46–65.

Jones, C., Hachani, A., Manoli, E., and Filloux, A. (2014a). An rhs gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the Pseudomonas aeruginosa strain PA14. J. Bacteriol. *196*, 800–810.

Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., Limoli, D.H., Harrison, J.J., Parsek, M.R., White, P., et al. (2014b). ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by Pseudomonas aeruginosa. PLOS Pathog. *10*, e1003984.

Joshi, A., Kostiuk, B., Rogers, A., Teschler, J., Pukatzki, S., and Yildiz, F.H. (2017). Rules of Engagement: The Type VI Secretion System in Vibrio cholerae. Trends Microbiol. *25*, 267–279.

Jousset, A., and Bonkowski, M. (2010). The model predator Acanthamoeba castellanii induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain Pseudomonas fluorescens Q2-87. Soil Biol. Biochem. *42*, 1647–1649.

Jousset, A., Rochat, L., Scheu, S., Bonkowski, M., and Keel, C. (2010). Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated Pseudomonas fluorescens. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 5263–5268.

Jousset, A., Rochat, L., Lanoue, A., Bonkowski, M., Keel, C., and Scheu, S. (2011). Plants respond to pathogen infection by enhancing the antifungal gene expression of root-associated bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *24*, 352–358.

Kageyama, M. (1964). STUDIES OF A PYOCIN. I. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES. J. Biochem. (Tokyo) *55*, 49–53.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., and Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani. Arch. Microbiol. *187*, 351–360.

Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N., and Lugtenberg, B. (2006). Effects of the tomato pathogen Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici and of the biocontrol bacterium Pseudomonas fluorescens WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *19*, 1121–1126.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 5752–5756.

Kidarsa, T.A., Goebel, N.C., Zabriskie, T.M., and Loper, J.E. (2011). Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in Pseudomonas fluorescens Pf-5. Mol. Microbiol. *81*, 395–414.

Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J.C. (2000). Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol. *182*, 5990–5996.

Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 709–721.

Koskiniemi, S., Lamoureux, J.G., Nikolakakis, K.C., t'Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M.D., Low, D.A., and Hayes, C.S. (2013). Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 7032–7037.

Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A., and Wendler, P. (2014). Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. Cell Rep. *8*, 20–30.

Kuchma, S.L., Delalez, N.J., Filkins, L.M., Snavely, E.A., Armitage, J.P., and O'Toole, G.A. (2015). Cyclic Di-GMP-Mediated Repression of Swarming Motility by Pseudomonas aeruginosa PA14 Requires the MotAB Stator. J. Bacteriol. *197*, 420–430.

Kudryashev, M., Wang, R.Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., DiMaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E.H., and Basler, M. (2015). Structure of the Type VI secretion system contractile sheath. Cell *160*, 952–962.

Kuroda, K., and Kageyama, M. (1981). Comparative study of F-type pyocins of Pseudomonas aeruginosa. J. Biochem. (Tokyo) *89*, 1721–1736.

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H.-T., and Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Mol. Microbiol. *67*, 241–253.

Lasica, A.M., Ksiazek, M., Madej, M., and Potempa, J. (2017). The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. Front. Cell. Infect. Microbiol. *7*, 215.

Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., and Haas, D. (1992). Global control in Pseudomonas fluorescens mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 1562–1566.

Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa. Protein Cell *6*, 26–41.

Lee, K., and Yoon, S.S. (2017). Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. J. Microbiol. Biotechnol. *27*, 1053–1064.

Leiman, P.G., and Shneider, M.M. (2012). Contractile tail machines of bacteriophages. Adv. Exp. Med. Biol. *726*, 93–114.

Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 4154–4159.

Leiman, P.G., Arisaka, F., van Raaij, M.J., Kostyuchenko, V.A., Aksyuk, A.A., Kanamaru, S., and Rossmann, M.G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. Virol. J. *7*, 355.

LeRoux, M., Kirkpatrick, R.L., Montauti, E.I., Tran, B.Q., Peterson, S.B., Harding, B.N., Whitney, J.C., Russell, A.B., Traxler, B., Goo, Y.A., et al. (2015). Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of Pseudomonas aeruginosa. ELife *4*.

Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., and Rahme, L.G. (2009). Quorum sensing differentially regulates Pseudomonas aeruginosa type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. Microbiology *155*, 2845–2855.

Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., and Ling, L.L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. J. Antibiot. (Tokyo) *63*, 468–476.

Lin, J., Cheng, J., Chen, K., Guo, C., Zhang, W., Yang, X., Ding, W., Ma, L., Wang, Y., and Shen, X. (2015). The icmF3 locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Front. Cell. Infect. Microbiol. *5*, 70.

Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Wei, G., Qian, P.-Y., Luo, Z.-Q., and Shen, X. (2017). A Pseudomonas T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. Nat. Commun. *8*, 14888.

Ling, H., Saeidi, N., Rasouliha, B.H., and Chang, M.W. (2010). A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical Pseudomonas aeruginosa isolates through membrane damage. FEBS Lett. *584*, 3354–3358.

Liu, L., Hao, S., Lan, R., Wang, G., Xiao, D., Sun, H., and Xu, J. (2015). The Type VI Secretion System Modulates Flagellar Gene Expression and Secretion in Citrobacter freundii and Contributes to Adhesion and Cytotoxicity to Host Cells. Infect. Immun. *83*, 2596–2604.

Logger, L., Aschtgen, M.-S., Guérin, M., Cascales, E., and Durand, E. (2016). Molecular Dissection of the Interface between the Type VI Secretion TssM Cytoplasmic Domain and the TssG Baseplate Component. J. Mol. Biol. *428*, 4424–4437.

van Loon, L.C., Bakker, P.A., and Pieterse, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. *36*, 453–483.

van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., van der Heijdt, W.H.W., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 1609–1621.

Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Ii, E.W.D., Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K., et al. (2012). Comparative Genomics of Plant-Associated Pseudomonas spp.: Insights into Diversity and Inheritance of Traits Involved in Multitrophic Interactions. PLOS Genet. *8*, e1002784.

Lossi, N.S., Dajani, R., Freemont, P., and Filloux, A. (2011). Structure-function analysis of HsiF, a gp25-like component of the type VI secretion system, in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol. Read. Engl. *157*, 3292–3305.

Lossi, N.S., Manoli, E., Förster, A., Dajani, R., Pape, T., Freemont, P., and Filloux, A. (2013). The HsiB1C1 (TssB-TssC) Complex of the Pseudomonas aeruginosa Type VI Secretion System Forms a Bacteriophage Tail Sheathlike Structure. J. Biol. Chem. *288*, 7536–7548.

Lu, D., Zheng, Y., Liao, N., Wei, L., Xu, B., Liu, X., and Liu, J. (2014). The structural basis of the Tle4-Tli4 complex reveals the self-protection mechanism of H2-T6SS in Pseudomonas aeruginosa. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *70*, 3233–3243.

Ly, L.K., Underwood, G.E., McCully, L.M., Bitzer, A.S., Godino, A., Bucci, V., Brigham, C.J., Príncipe, A., Fischer, S.E., and Silby, M.W. (2015). Draft Genome Sequences of Pseudomonas fluorescens Strains SF39a and SF4c, Potential Plant Growth Promotion and Biocontrol Agents. Genome Announc. *3*.

Ma, A.T., and Mekalanos, J.J. (2010). In vivo actin cross-linking induced by Vibrio cholerae type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 4365–4370.

Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009a). Translocation of a Vibrio cholerae type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. Cell Host Microbe *5*, 234–243.

Ma, J., Sun, M., Dong, W., Pan, Z., Lu, C., and Yao, H. (2016). PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. Environ. Microbiol.

Ma, J., Pan, Z., Huang, J., Sun, M., Lu, C., and Yao, H. (2017a). The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. Virulence *0*, 1–14.

Ma, J., Sun, M., Dong, W., Pan, Z., Lu, C., and Yao, H. (2017b). PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. Environ. Microbiol. *19*, 345–360.

Ma, L.-S., Lin, J.-S., and Lai, E.-M. (2009b). An IcmF family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its walker a motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol. *191*, 4316–4329.

Ma, L.-S., Narberhaus, F., and Lai, E.-M. (2012). IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. J. Biol. Chem. *287*, 15610–15621.

Ma, L.-S., Hachani, A., Lin, J.-S., Filloux, A., and Lai, E.-M. (2014). Agrobacterium tumefaciens deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. Cell Host Microbe *16*, 94–104.

Mahamuni,P.P., Shete, R.S., and Sonawane H.V. (2016). Studies on mosquitocidal activity of metabolite from pseudomonas species RJLBPCS, 1(6) p 303-314.

Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., González de Heredia, E., Baena, I., Martín-Martín, I., Rivilla, R., and Martín, M. (2014). Identification of flgZ as a Flagellar Gene Encoding a PilZ Domain Protein That Regulates Swimming Motility and Biofilm Formation in Pseudomonas. PLoS ONE *9*.

Matsui, H., Sano, Y., Ishihara, H., and Shinomiya, T. (1993). Regulation of pyocin genes in Pseudomonas aeruginosa by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. J. Bacteriol. *175*, 1257–1263.

Matthijs, S., Baysse, C., Koedam, N., Tehrani, K.A., Verheyden, L., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Hoorelbeke, B., Meyer, J.-M., De Greve, H., et al. (2004). The Pseudomonas siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. Mol. Microbiol. *52*, 371–384.

Mattinen, L., Somervuo, P., Nykyri, J., Nissinen, R., Kouvonen, P., Corthals, G., Auvinen, P., Aittamaa, M., Valkonen, J.P.T., and Pirhonen, M. (2008). Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen Pectobacterium atrosepticum. Microbiol. Read. Engl. *154*, 2387–2396.

Mavrodi, D.V., Loper, J.E., Paulsen, I.T., and Thomashow, L.S. (2009). Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium Pseudomonas fluorescens Pf-5. BMC Microbiol. *9*, 8.

Meyer, J.M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species. Arch. Microbiol. *174*, 135–142.

Meyer, J.M., Azelvandre, P., and Georges, C. (1992). Iron metabolism in Pseudomonas: salicylic acid, a siderophore of Pseudomonas fluorescens CHAO. BioFactors Oxf. Engl. *4*, 23–27.

Meyer, S.L.F., Halbrendt, J.M., Carta, L.K., Skantar, A.M., Liu, T., Abdelnabby, H.M.E., and Vinyard, B.T. (2009). Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to Plant-parasitic and Bacterial-feeding Nematodes. J. Nematol. *41*, 274–280.

Michel-Briand, Y., and Baysse, C. (2002). The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. Biochimie *84*, 499–510.

Michelsen, C.F., and Stougaard, P. (2011). A Novel Antifungal Pseudomonas fluorescens Isolated from Potato Soils in Greenland. Curr. Microbiol. *62*, 1185–1192.

Migula, W. (1894). Über ein neues System der Bakterien. Arb Bakteriol Inst Karlsruhe 1: 235–238.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., and Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *67*, 86–156, table of contents.

Miller, S.H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in Pseudomonas species. Environ. Microbiol. Rep. *2*, 403–411.

Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., and Namba, K. (2012). Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. Mol. Microbiol. *83*, 775–788.

Mirleau, P., Philippot, L., Corberand, T., and Lemanceau, P. (2001). Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of Pseudomonas fluorescens strain C7R12 in soil. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 2627–2635.

van de Mortel, J.E., de Vos, R.C.H., Dekkers, E., Pineda, A., Guillod, L., Bouwmeester, K., van Loon, J.J.A., Dicke, M., and Raaijmakers, J.M. (2012). Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium Pseudomonas fluorescens SS1011[W][OA]. Plant Physiol. *160*, 2173–2188.

Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011). The Pseudomonas aeruginosa sensor RetS switches Type III and Type VI secretion *via* c-di-GMP signalling. Environ. Microbiol. *13*, 3128–3138.

Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., et al. (2006). A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus. Science *312*, 1526–1530.

Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., and Mekalanos, J.J. (2007). Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. Nat. Cell Biol. *9*, 797–803.

Murdoch, S.L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M.J., Pourkarimi, E., and Coulthurst, S.J. (2011). The Opportunistic Pathogen Serratia marcescens Utilizes Type VI Secretion To Target Bacterial Competitors ▿. J. Bacteriol. *193*, 6057–6069.

Muriel, C., Jalvo, B., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., and Martín, M. (2015). Chemotactic Motility of Pseudomonas fluorescens F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. PLoS ONE *10*.

Muskotál, A., Király, R., Sebestyén, A., Gugolya, Z., Végh, B.M., and Vonderviszt, F. (2006). Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. FEBS Lett. *580*, 3916–3920.

Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., and Hayashi, T. (2000). The R-type pyocin of Pseudomonas aeruginosa is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. Mol. Microbiol. *38*, 213–231.

Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., and Martín, M. (2009). Three independent signalling pathways repress motility in Pseudomonas fluorescens F113. Microb. Biotechnol. *2*, 489–498.

Neidig, N., Paul, R.J., Scheu, S., and Jousset, A. (2011). Secondary metabolites of Pseudomonas fluorescens CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. Microb. Ecol. *61*, 853–859.

Neiendam Nielsen, M., and Sørensen, J. (1999). Chitinolytic activity of Pseudomonas fluorescens isolates from barley and sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. *30*, 217–227.

Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. Front. Plant Sci. *4*.

Nguyen, V.S., Logger, L., Spinelli, S., Desmyter, A., Le, T.T.H., Kellenberger, C., Douzi, B., Durand, E., Roussel, A., Cascales, E., et al. (2015). Inhibition of Type VI Secretion by an Anti-TssM Llama Nanobody. PLoS ONE *10*.

Nguyen, V.S., Logger, L., Spinelli, S., Legrand, P., Huyen Pham, T.T., Nhung Trinh, T.T., Cherrak, Y., Zoued, A., Desmyter, A., Durand, E., et al. (2017). Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. Nat. Microbiol. *2*, 17103.

Nielsen, T.H., Nybroe, O., Koch, B., Hansen, M., and Sørensen, J. (2005). Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by Pseudomonas sp. strain DSS73. Appl. Environ. Microbiol. *71*, 4112–4116.

Nybroe, O., and Sørensen, J. (2004). Production of Cyclic Lipopeptides by Fluorescent Pseudomonads. 147–172.

Oku, S., Komatsu, A., Nakashimada, Y., Tajima, T., and Kato, J. (2014). Identification of Pseudomonas fluorescens Chemotaxis Sensory Proteins for Malate, Succinate, and Fumarate, and Their Involvement in Root Colonization. Microbes Environ. *29*, 413–419.

de Pace, F., Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M.P., Guedes Stehling, E., Dias da Silveira, W., and Sperandio, V. (2011). Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strain. Microbiol. Read. Engl. *157*, 2954–2962.

Padmanabhan, V., Prabakaran, G., Paily, K.P., and Balaraman, K. (2005). Toxicity of a mosquitocidal metabolite of Pseudomonas fluorescens on larvae & pupae of the house fly, Musca domestica. Indian J. Med. Res. *121*, 116–119.

Pallai, R., Hynes, R.K., Verma, B., and Nelson, L.M. (2012). Phytohormone production and colonization of canola (Brassica napus L.) roots by Pseudomonas fluorescens 6-8 under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbiol. *58*, 170–178.

Palleroni, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, p. 141-199. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Park, K.-H., Lee, C.-Y., and Son, H.-J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by Pseudomonas fluorescens RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. Lett. Appl. Microbiol. *49*, 222–228.

Park, Y.-S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J.M., and Park, K. (2015). Promotion of plant growth by Pseudomonas fluorescens strain SS101 *via* novel volatile organic compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. *461*, 361–365.

Parret, A.H.A., Schoofs, G., Proost, P., and De Mot, R. (2003). Plant Lectin-Like Bacteriocin from a Rhizosphere-Colonizing Pseudomonas Isolate. J. Bacteriol. *185*, 897–908.

Parret, A.H.A., Temmerman, K., and De Mot, R. (2005). Novel Lectin-Like Bacteriocins of Biocontrol Strain Pseudomonas fluorescens Pf-5. Appl. Environ. Microbiol. *71*, 5197–5207.

Péchy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, K.M., Grunder, J., Loper, J.E., and Keel, C. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of Pseudomonas fluorescens. Environ. Microbiol. *10*, 2368–2386.

Péchy-Tarr, M., Borel, N., Kupferschmied, P., Turner, V., Binggeli, O., Radovanovic, D., Maurhofer, M., and Keel, C. (2013). Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root-associated biocontrol pseudomonad. Environ. Microbiol. *15*, 736–750.

Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M.T.G., Cámara, M., Haas, D., and Williams, P. (2001). The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylhomoserine Lactones in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *183*, 6676–6683.

Petti, C., Reiber, K., Ali, S.S., Berney, M., and Doohan, F.M. (2012). Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. BMC Plant Biol. *12*, 224.

Planamente, S., Salih, O., Manoli, E., Albesa-Jové, D., Freemont, P.S., and Filloux, A. (2016). TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. EMBO J. *35*, 1613–1627.

Postel, S., Deredge, D., Bonsor, D.A., Yu, X., Diederichs, K., Helmsing, S., Vromen, A., Friedler, A., Hust, M., Egelman, E.H., et al. Bacterial flagellar capping proteins adopt diverse oligomeric states. ELife *5*.

Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P., and Newman, D.K. (2006). Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nat. Chem. Biol. *2*, 71–78.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 1528–1533.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 15508–15513.

Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. Curr. Opin. Microbiol. *12*, 11–17.

Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., and de Kock, M.J.D. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated Pseudomonas spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *19*, 699–710.

Rao, V.A., Shepherd, S.M., English, G., Coulthurst, S.J., and Hunter, W.N. (2011). The structure of Serratia marcescens Lip, a membrane-bound component of the type VI secretion system. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *67*, 1065–1072.

Records, A.R. (2011). The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *24*, 751–757.

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., and Haas, D. (1997). The global activator GacA of Pseudomonas aeruginosa PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Mol. Microbiol. *24*, 309–319.

Revathi, G., Puri, J., and Jain, B.K. (1998). Bacteriology of burns. Burns J. Int. Soc. Burn Inj. *24*, 347–349.

Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil *321*, 305–339.

Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 8006–8011.

Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Baehler, E., Maurhofer, M., and Keel, C. (2010). Combination of fluorescent reporters for simultaneous monitoring of root colonization and antifungal gene expression by a biocontrol pseudomonad on cereals with flow cytometry. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *23*, 949–961.

Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Molina-Henares, M.A., Navarro-Avilés, G., Van Dillewijn, P., De La Torre, J., Molina-Henares, A.J., La Campa, A.S., Ran, F.A., Segura, A., et al. (2010). Physiological and transcriptomic characterization of a fliA mutant of Pseudomonas putida KT2440. Environ. Microbiol. Rep. *2*, 373–380.

Roest, H.P., Mulders, I.H., Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., and Lugtenberg, B.J. (1997). A Rhizobium leguminosarum biovar trifolii locus not localized on the sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *10*, 938–941.

Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R., and Bais, H.P. (2007). A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of Bacillus subtilis biofilm formation on Arabidopsis thaliana roots. Planta *226*, 283–297.

Rudrappa, T., Splaine, R.E., Biedrzycki, M.L., and Bais, H.P. (2008). Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. PloS One *3*, e2073.

Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. Nature *475*, 343–347.

Russell, A.B., Singh, P., Brittnacher, M., Bui, N.K., Hood, R.D., Carl, M.A., Agnello, D.M., Schwarz, S., Goodlett, D.R., Vollmer, W., et al. (2012). A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. Cell Host Microbe *11*, 538–549.

Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A., Wai, S.N., and Mougous, J.D. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. Nature *496*, 508–512.

Russell, A.B., Wexler, A.G., Harding, B.N., Whitney, J.C., Bohn, A.J., Goo, Y.A., Tran, B.Q., Barry, N.A., Zheng, H., Peterson, S.B., et al. (2014). A type VI secretion-related pathway in Bacteroidetes mediates interbacterial antagonism. Cell Host Microbe *16*, 227–236.

Ryu, C.-M. (2015). Against friend and foe: type 6 effectors in plant-associated bacteria. J. Microbiol. Seoul Korea *53*, 201–208.

Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Wei, H.-X., Paré, P.W., and Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 4927–4932.

Sajeli Begum, A., Basha, S.A., Raghavendra, G., Kumar, M.V.N., Singh, Y., Patil, J.V., Tanemura, Y., and Fujimoto, Y. (2014). Isolation and characterization of antimicrobial cyclic dipeptides from Pseudomonas fluorescens and their efficacy on sorghum grain mold fungi. Chem. Biodivers. *11*, 92–100.

Salomon, M.V., Bottini, R., de Souza Filho, G.A., Cohen, A.C., Moreno, D., Gil, M., and Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of Vitis vinifera retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. Physiol. Plant. *151*, 359–374.

Sampedro, I., Parales, R.E., Krell, T., and Hill, J.E. (2015). Pseudomonas chemotaxis. FEMS Microbiol. Rev. *39*, 17–46.

Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., and Bleves, S. (2012). The Second Type VI Secretion System of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 Is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells. J. Biol. Chem. *287*, 27095–27105.

Sana, T.G., Soscia, C., Tonglet, C.M., Garvis, S., and Bleves, S. (2013). Divergent Control of Two Type VI Secretion Systems by RpoN in Pseudomonas aeruginosa. PLoS ONE *8*.

Sana, T.G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K.L., Filloux, A., Superti-Furga, G., et al. (2015). Internalization of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. MBio *6*, e00712.

Sana, T.G., Berni, B., and Bleves, S. (2016a). The T6SSs of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6*.

Sana, T.G., Flaugnatti, N., Lugo, K.A., Lam, L.H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., and Monack, D.M. (2016b). Salmonella Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E5044–E5051.

Sana, T.G., Lugo, K.A., and Monack, D.M. (2017). T6SS: The bacterial “fight club” in the host gut. PLoS Pathog. *13*.

Santin, Y.G., and Cascales, E. (2017). Domestication of a housekeeping transglycosylase for assembly of a Type VI secretion system. EMBO Rep. *18*, 138–149.

Satchell, K.J.F. (2009). Bacterial Martyrdom: Phagocytes Disabled by Type VI Secretion after Engulfing Bacteria. Cell Host Microbe *5*, 213–214.

Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., and Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. ISME J. *9*, 2329–2335.

Sen, A., Rybakova, D., Hurst, M.R.H., and Mitra, A.K. (2010). Structural Study of the Serratia entomophila Antifeeding Prophage: Three-Dimensional Structure of the Helical Sheath. J. Bacteriol. *192*, 4522–4525.

Shalom, G., Shaw, J.G., and Thomas, M.S. (2007). In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in Burkholderia pseudomallei that is induced upon invasion of macrophages. Microbiol. Read. Engl. *153*, 2689–2699.

Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 6036–6041.

Shikuma, N.J., Pilhofer, M., Weiss, G.L., Hadfield, M.G., Jensen, G.J., and Newman, D.K. (2014). Marine Tubeworm Metamorphosis Induced by Arrays of Bacterial Phage Tail–Like Structures. Science *343*, 529–533.

Shikuma, N.J., Antoshechkin, I., Medeiros, J.M., Pilhofer, M., and Newman, D.K. (2016). Stepwise metamorphosis of the tubeworm Hydroides elegans is mediated by a bacterial inducer and MAPK signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 10097–10102.

Shneider, M.M., Buth, S.A., Ho, B.T., Basler, M., Mekalanos, J.J., and Leiman, P.G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the Type VI secretion system spike. Nature *500*, 350–353.

Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., Dong, T.G., and Shen, X. (2017a). Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in Burkholderia thailandensis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, E2233–E2242.

Si, M., Wang, Y., Zhang, B., Zhao, C., Kang, Y., Bai, H., Wei, D., Zhu, L., Zhang, L., Dong, T.G., et al. (2017b). The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition. Cell Rep. *20*, 949–959.

Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E., and Mougous, J.D. (2012). Structure and regulation of the type VI secretion system. Annu. Rev. Microbiol. *66*, 453–472.

Silverman, J.M., Agnello, D.M., Zheng, H., Andrews, B.T., Li, M., Catalano, C.E., Gonen, T., and Mougous, J.D. (2013). Haemolysin Co-regulated Protein is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates. Mol. Cell *51*.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat. Biotechnol. *1*, 784–791.

Smyth, E. m., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M. r., Dow, J. m., O'Gara, F., and Doohan, F. m. (2011). In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a Pseudomonas fluorescens strain that promotes the growth and yield of wheat. J. Appl. Microbiol. *111*, 683–692.

Soh, B.Y., Lee, G.W., Go, E.B., Kim, B.-R., Lee, K.-J., and Chae, J.-C. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from Pseudomonas fluorescens promoting the growth of Chinese cabbage and its polyclonal antibody. J. Microbiol. Biotechnol. *24*, 690–695.

Song, C., Aundy, K., van de Mortel, J., and Raaijmakers, J.M. (2014). Discovery of new regulatory genes of lipopeptide biosynthesis in Pseudomonas fluorescens. FEMS Microbiol. Lett. *356*, 166–175.

de Souza, J.T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., and Raaijmakers, J.M. (2003). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on pythium: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology *93*, 966–975.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. *31*, 425–448.

Spínola-Amilibia, M., Davó-Siguero, I., Ruiz, F.M., Santillana, E., Medrano, F.J., and Romero, A. (2016). The structure of VgrG1 from Pseudomonas aeruginosa, the needle tip of the bacterial type VI secretion system. Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. *72*, 22–33.

Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J.B., Givskov, M., and Molin, S. (1999). Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 4108–4117.

Suarez, G., Sierra, J.C., Erova, T.E., Sha, J., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. (2010). A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from Aeromonas hydrophila that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. J. Bacteriol. *192*, 155–168.

Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of Caenorhabditis elegans by Pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 715–720.

Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between Pseudomonas aeruginosa and other microorganisms. Microbes Environ. *28*, 13–24.

Taylor, N.M.I., Prokhorov, N.S., Guerrero-Ferreira, R.C., Shneider, M.M., Browning, C., Goldie, K.N., Stahlberg, H., and Leiman, P.G. (2016). Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. Nature *533*, 346–352.

Thomas, J., Watve, S.S., Ratcliff, W.C., and Hammer, B.K. (2017). Horizontal Gene Transfer of Functional Type VI Killing Genes by Natural Transformation. MBio *8*.

Tian, Y., Zhao, Y., Wu, X., Liu, F., Hu, B., and Walcott, R.R. (2015). The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of Acidovorax citrulli on melon. Mol. Plant Pathol. *16*, 38–47.

Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., and Raaijmakers, J.M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of Phytophthora infestans and in colonization of tomato plants by Pseudomonas fluorescens. New Phytol. *175*, 731–742.

Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P., Wendehenne, D., and Besson-Bard, A. (2016). The Pseudomonas fluorescens Siderophore Pyoverdine Weakens Arabidopsis thaliana Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. Plant Physiol. *171*, 675–693.

Troxell, B., and Hassan, H.M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. Front. Cell. Infect. Microbiol. *3*, 59.

Tyagi, R., Lai, R., and Duggleby, R.G. (2004). A new approach to “megaprimer” polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. BMC Biotechnol. *4*, 2.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front. Plant Sci. *4*, 356.

Valentini, M., and Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria. J. Biol. Chem. *291*, 12547–12555.

Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., and Filloux, A. (2016). The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control Pseudomonas aeruginosa Biofilm and Motility. PLOS Genet. *12*, e1006354.

Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry *70*, 1581–1588.

Van Gerven, N., Klein, R.D., Hultgren, S.J., and Remaut, H. (2015). Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogensis. Trends Microbiol. *23*, 693–706.

Van Houdt, R., and Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. Res. Microbiol. *156*, 626–633.

Van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium Azospirillum brasilense reveals an extensive auxin response. Microb. Ecol. *61*, 723–728.

Van Wielink, J.E., and Duine, J.A. (1990). How big is the periplasmic space? Trends Biochem. Sci. *15*, 136–137.

Vespermann, A., Kai, M., and Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and Arabidopsis thaliana. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 5639–5641.

Vettiger, A., and Basler, M. (2016). Type VI Secretion System Substrates Are Transferred and Reused among Sister Cells. Cell *167*, 99–110.e12.

Vettiger, A., Winter, J., Lin, L., and Basler, M. (2017). The type VI secretion system sheath assembles at the end distal from the membrane anchor. Nat. Commun. *8*, 16088.

Vilà, S., Badosa, E., Montesinos, E., Planas, M., and Feliu, L. (2016). Synthetic Cyclolipopeptides Selective against Microbial, Plant and Animal Cell Targets by Incorporation of D-Amino Acids or Histidine. PloS One *11*, e0151639.

Vonderviszt, F., and Namba, K. (2013). Structure, Function and Assembly of Flagellar Axial Proteins (Landes Bioscience).

Wang, T., Si, M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wei, G., Luo, Z.-Q., et al. (2015). Type VI Secretion System Transports Zn2+ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. PLoS Pathog. *11*.

Weber, B.S., Miyata, S.T., Iwashkiw, J.A., Mortensen, B.L., Skaar, E.P., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. (2013). Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in Acinetobacter. PLoS ONE *8*.

Weber, B.S., Hennon, S.W., Wright, M.S., Scott, N.E., de Berardinis, V., Foster, L.J., Ayala, J.A., Adams, M.D., and Feldman, M.F. (2016). Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in Acinetobacter and Identification of a Novel Peptidoglycan Hydrolase, TagX, Required for Its Biogenesis. MBio *7*.

de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., Vanderleyden, J., De Mot, R., and Lugtenberg, B.J.J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by Pseudomonas fluorescens. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *15*, 1173–1180.

Weller, D.M., Mavrodi, D.V., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., and Bakker, P.A.H.M. (2012). Induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana against Pseudomonas syringae pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing Pseudomonas fluorescens. Phytopathology *102*, 403–412.

Wenren, L.M., Sullivan, N.L., Cardarelli, L., Septer, A.N., and Gibbs, K.A. (2013). Two Independent Pathways for Self-Recognition in Proteus mirabilis Are Linked by Type VI-Dependent Export. MBio *4*.

Wexler, A.G., Bao, Y., Whitney, J.C., Bobay, L.-M., Xavier, J.B., Schofield, W.B., Barry, N.A., Russell, A.B., Tran, B.Q., Goo, Y.A., et al. (2016). Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 3639–3644.

Whitney, J.C., Chou, S., Russell, A.B., Biboy, J., Gardiner, T.E., Ferrin, M.A., Brittnacher, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2013). Identification, Structure, and Function of a Novel Type VI Secretion Peptidoglycan Glycoside Hydrolase Effector-Immunity Pair. J. Biol. Chem. *288*, 26616–26624.

Whitney, J.C., Beck, C.M., Goo, Y.A., Russell, A.B., Harding, B., De Leon, J.A., Cunningham, D.A., Tran, B.Q., Low, D.A., Goodlett, D.R., et al. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. Mol. Microbiol. *92*, 529–542.

Williams, S.G., Varcoe, L.T., Attridge, S.R., and Manning, P.A. (1996). Vibrio cholerae Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. Infect. Immun. *64*, 283–289.

Williams, S.R., Gebhart, D., Martin, D.W., and Scholl, D. (2008). Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 3868–3876.

Yang, G., Dowling, A.J., Gerike, U., ffrench-Constant, R.H., and Waterfield, N.R. (2006). Photorhabdus virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. J. Bacteriol. *188*, 2254–2261.

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., and Song, Z. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. Int. J. Oral Sci. *3*, 74–81.

Yang, M.-M., Wen, S.-S., Mavrodi, D.V., Mavrodi, O.V., von Wettstein, D., Thomashow, L.S., Guo, J.-H., and Weller, D.M. (2014a). Biological control of wheat root diseases by the CLP-producing strain Pseudomonas fluorescens HC1-07. Phytopathology *104*, 248–256.

Yang, X., Xu, M., Wang, Y., Xia, P., Wang, S., Ye, B., Tong, L., Jiang, T., and Fan, Z. (2014b). Molecular mechanism for self-protection against the type VI secretion system in Vibrio cholerae. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *70*, 1094–1103.

Zhang, L., Xu, J., Xu, J., Zhang, H., He, L., and Feng, J. (2014). TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in Ralstonia solanacearum. Microb. Pathog. *74*, 1–7.

Zhang, X.Y., Brunet, Y.R., Logger, L., Douzi, B., Cambillau, C., Journet, L., and Cascales, E. (2013). Dissection of the TssB-TssC interface during type VI secretion sheath complex formation. PloS One *8*, e81074.

Zheng, J., and Leung, K.Y. (2007). Dissection of a type VI secretion system in Edwardsiella tarda. Mol. Microbiol. *66*, 1192–1206.

Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y.R., Douzi, B., Cambillau, C., Cascales, E., and Journet, L. (2013). TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. J. Biol. Chem. *288*, 27031–27041.

Zoued, A., Brunet, Y.R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., and Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1843*, 1664–1673.

Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y.R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., Flaugnatti, N., Legrand, P., Journet, L., Fronzes, R., et al. (2016a). Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. Nature *531*, 59–63.

Zoued, A., Cassaro, C.J., Durand, E., Douzi, B., España, A.P., Cambillau, C., Journet, L., and Cascales, E. (2016b). Structure-Function Analysis of the TssL Cytoplasmic Domain Reveals a New Interaction between the Type VI Secretion Baseplate and Membrane Complexes. J. Mol. Biol. *428*, 4413–4423.

Zoued, A., Durand, E., Santin, Y.G., Journet, L., Roussel, A., Cambillau, C., and Cascales, E. (2017). TssA: The cap protein of the Type VI secretion system tail. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.

ANNEXES

I. Articles

1) Articles publiés

Decoin, V., **Gallique, M.**, Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C.D., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2015). A Pseudomonas fluorescens type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. BMC Microbiol. *15*, 72.

Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2017a). Contribution of the Pseudomonas fluorescens MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. PloS One *12*, e0170770.

Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017b). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? Front. Microbiol. *8*.

2) Articles en préparation

Gallique, M., Bouteiller M., Kosta A., Konto-Ghiorghi Y., Barbey C., Latour X., Chane A., Decoin V., Feuilloley M.G.J., Cascales E. and Merieau A. Relation between Type VI secretion system and flagellar class IV genes in *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain

Barbey C., Chane A., Maillot O., Merieau A., **Gallique M**., Beury-Cirou A., Feuilloley M.G.J., Gobert V., Latour X. Quorum sensing signals and mimics activate the expression of the rhodococcal γ-lactone quorum quenching pathway

II. Communication affichée

1) Journée de l'école doctorale

18ème Journée de l'école doctorale, le 26 & 27 Mars 2015, Rouen, France

19ème Journée de l'école doctorale, le 10 & 11 Mars 2016, Caen, France

20ème Journée de l'école doctorale, le 16 & 17 Mars 2017, Le Havre, France

2) Congrès international et posters

6ème congrès de la Federation of European Microbiological Societies (FEMS), du 7 au 11 Juin 2015, Maastricht, Pays-Bas (résumé et poster en page 298-299).

7ème congrès de la Federation of European Microbiological Societies (FEMS), du 9 au 13 Juillet 2017, Valence, Espagne (résumé et poster en page 300-301).

III. Communication orale

13ème congrès de la Société Française de Micorbiologie (SFM), du 9 au 11 Octobre 2017, Paris, France (résumé en page 302)

A Type VI Secretion System is related to mucoidy, motility and antibacterial activity in a *Pseudomonas fluorescens* strain

Mathias Gallique, Victorien Decoin, Corinne Barbey, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Annabelle Merieau
•*Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement* (LMSM) EA4312
•Université de Rouen, UFR ST & IUT Evreux, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux
•*www.lmsm.fr*

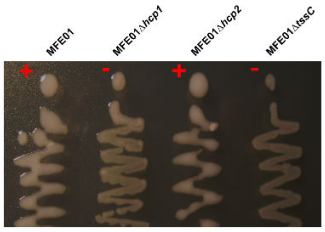
INTRODUCTION:

To persist in an ecological niche, bacteria have developed several strategies to enable them to resist in the environment. One of these mechanisms enabling them to struggle with other bacterial species is Type VI Secretion System (T6SS). This allows the bacterium to inject toxins directly into the prey cytoplasm and could cause death. A mucoid environmental strain of *Pseudomonas fluorescens*, MFE01, has antibacterial activity carried by T6SS. MFE01 is not virulent against eukaryotic cell models (amoebas, plant or animal cell models). Currently, genomic analysis reveals that only one T6SS core component cluster and three *hcp* genes were found. Mutations of *hcp1* and *hcp2* were performed. Furthermore, T6SS apparatus was also inactivated by *tssC* gene mutagenesis. Competition activity was established in different conditions: immobilized experiment, swarming or swimming conditions.

RESULTS:

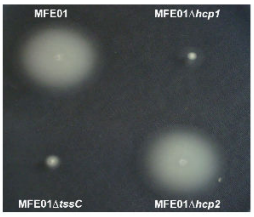
Relation between mucoidy, motility and T6SS

A. Phenotypic appearance of MFE01 wild type and mutants



Mucoid appearance on LB agar at 28° C (+ : mucoid / - : no mucoid).

B. Motility of MFE01 wild type and mutants



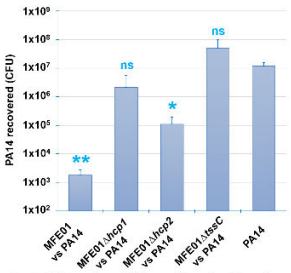
Swimming assays on LB in 0,3% agar at 28° C for 12 hours (n=3).

MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssc* are no longer able to swim and are not mucoid. But *hcp2* gene mutation does not influence these two phenotypes.

***P. Fluorescens* MFE01 Hcp1 protein, related to T6SS, is involved in mucoidy and motility.**

Hcp2 protein is involved in bacterial killing activity

Antibacterial competition assays between *P. aeruginosa* PA14 and MFE01



MFE01/PA14 : drop of 4 log units of PA14 population.

MFE01Δ*hcp1*/PA14 : No significant difference in survival rate of PA14.

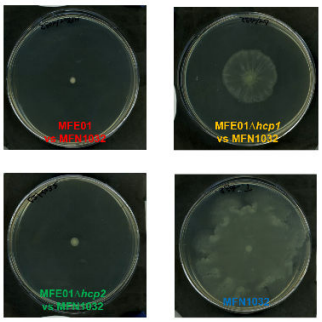
MFE01Δ*hcp2*/PA14 : drop of 2 log units of PA14 population whereas there is no drop of PA14 population when cocultured with MFE01Δ*tssc* (non-functionnal T6SS).

Count of *P. aeruginosa* PA14 population after 4 hours in coculture assays in solid media with MFE01 and mutants at 28° C (n=3). * Indicates a significant difference of the PA14 cfu (*p*-value <0.05) relative to the PA14 assays. ns: no significant difference and ** : *p-value* <0,02.

Hcp2 protein, a T6SS component, is related to antibacterial activity unlike Hcp1 protein. It would exist another effector dependant of T6SS which seems related to this activity.

Hcp1 protein is related to the motility inhibition of *P. fluorescens* MFN1032 strain in swarming killing assay

A. Swarming killing assays



Swarming assays of *P. fluorescens* MFN1032 strain on LB in 0,6% agar cocultured with MFE01 or mutants for 12 hours at 28° C (n=3).

MFN1032 is swarming on LB in 0,6% agar whereas MFE01 and mutants are no motile in this condition.

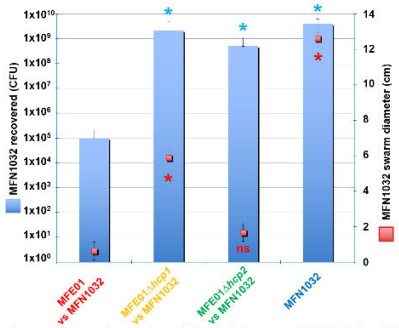
MFE01 (presence of Hcp1 and Hcp2 proteins) : inhibition of swarming motility and low survival of MFN1032.

MFE01Δ*hcp1* (no Hcp1, presence of Hcp2) : swarming motility and high survival of MFN1032.

MFE01Δ*hcp2* (presence of Hcp1, no Hcp2) : inhibition of swarming motility and high survival of MFN1032.

Hcp1 protein is related to swarm motility inhibition and is necessary for antibacterial activity exerted by Hcp2 protein on MFN1032 strain.

B. MFN1032 swarm diameter and counting of survival population



Swarm diameter and survival population of *P. fluorescens* MFN1032 after 12 hours in coculture assays on LB in 06,% agar with MFE01 or mutants at 28° C (n=3). * Indicates a significant difference of the MFN1032 cfu (*p*-value <0.05) relative to the MFN1032/MFE01 assay. ns: no significant difference.

CONCLUSION:

T6SS of *P. fluorescens* MFE01 confers a competitive avantage in ecological niche via toxins associated with Hcp proteins. Toxins associated with Hcp1 protein would immobilize competitor bacteria whereas those associated with Hcp2 protein are involved in antibacterial activity. Hcp1 protein has pleitropic effect : mutation of *hcp1* gene affects motility and mucoidy. Hcp1 et Hcp2 proteins have a synergistic effect which gives a competitive avantage. The other factor, related to T6SS and involved in bacterial killing activity, remains to characterize.

Supported by

Congrès Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 2015, Maastricht

A *Pseudomonas fluorescens* Type VI Secretion System Is Involved in Antibacterial Activity

Mathias Gallique, Victorien Decoin, Corinne Barbey, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Annabelle Merieau

Background

To persist in an ecological niche, bacteria have developed several strategies to enable them to resist in the environment. One of these mechanisms able to struggle with other bacterial species is Type VI Secretion System (T6SS). This allows the bacterium to inject toxins directly into prey' cytoplasm and could cause death. A mucoid environmental strain of *Pseudomonas fluorescens,* MFE01, has antibacterial activity carried by T6SS. MFE01 is not virulent against eukaryotic cell models (amoebas, plant or animal cell models). Currently, genomic analysis reveals only one T6SS core component cluster and three *hcp* genes were found (named *hcp1*, *hcp2* and *hcp3)*.

Objectives

Aims of this study are to assign a role to each Hcp protein and to test the potential application of this secretion system to prevent infection by nosocomial strain (like *Pseudomonas aeruginosa*) in burn wound.

Methods

Mutations of *hcp1*, *hcp2* and *hcp3* were performed. Furthermore, T6SS apparatus was also inactivated by *tssE* gene mutagenesis. Competitor activity were established in different conditions: immobilized experiment, swarming or swimming conditions. Hereafter, we will use Hacat keratinocyte model to study the ability of MFE01 to protect against infection by etiologic agents.

Conclusion

MFE01 T6SS plays a crucial role in bacterial competition in ecological niche. Hcp2 was involved in antibacterial activity [1] whereas Hcp1 immobilized prey cell [2]. Hcp1 and Hcp2 proteins had a synergic effect which Hcp1 inhibits prey cell mobility and then Hcp2 can killed it. Presently, no role is attributed to Hcp3.

References

[1] A Type VI Secretion System Is Involved in *Pseudomonas fluorescens* Bacterial Competition, Decoin *and al*, 2014

[2] A Pseudomonas fluorescens type VI secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition, Decoin *and al*, 2014

Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to biofilm formation

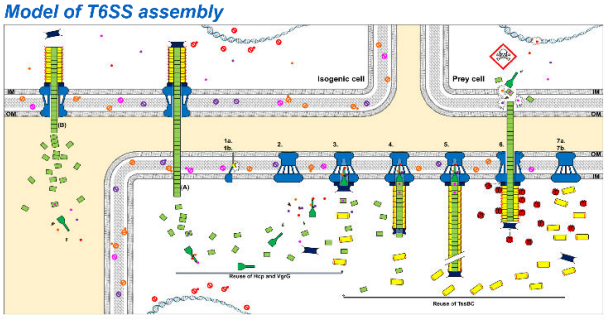
M. Gallique, M. Bouteiller, V. Decoin, C. Barbey, S. Depayras, T. Rosay, MG. Feuilloley, N. Orange and A. Merieau

Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironnement LMSM EA 4312, Normandie Université, Univ. Rouen Normandie, Evreux, France. www.lmsm-lab.fr

Introduction

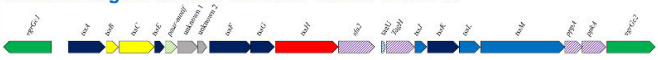
Type VI Secretion System (T6SS) is a macromolecular machinery that injects effectors directly into prokaryotic or eukaryotic cells. We recently described the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain, a mucoid avirulent strain that secretes large amounts of Hcp proteins into the culture medium (Decoin *et al.*, 2014). *In silico* analyses reveal at least three *hcp* genes, encoding proteins that play important roles in antibacterial competition. Hcp1 is crucial to motility inhibition of other strains of *P. fluorescens* (Decoin *et al.*, 2015) whereas both Hcp2 and Hcp3 proteins are involved in killing prey cells of several Gram-negative strains as *P. fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* or *E. coli*.
We focus on role of individual Hcp proteins and T6SS machinery in biofilm formation. We are also looking at importance of T6SS in bacterial competition within two-species biofilm, composed of MFE01 strain and *P. fluorescens* MFP05 strain, an isolate from human skin. Finally, we are exploring the quorum sensing in MFE01.

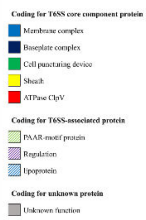
Model of T6SS assembly



T6SS dynamics: round of assembly, effectors translocation and T6SS components recycling. Adapted from (Gallique *et al.*, 2017b)

Genomic organization of the T6SS cluster in MFE01



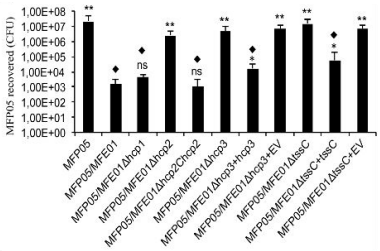


T6SS cluster. Adapted from (Gallique *et al.*, 2017a)

T6SS cluster contains all the T6SS core component genes (*tssA* to *tssM*) excepts *tssD genes* (*hcp*), which are distally located from T6SS locus. Other *tssI* genes are presents in several copies scattered throughout chromosome, whose two copies are located on either side of the T6SS cluster.

T6SS cluster contains six conserved T6SS-associated genes coding for : PAAR-motif protein, Sfa2 (Fis family transcriptional regulator), PpkA (TagE, serine/threonine kinase), PppA (TagG, serine/threonine phosphatase), TagU (associated lipoprotein), tagH (FHA domain-containing protein).

Hcp3 protein is essential for the MFE01 T6SS-mediated killing of MFP05



Killing activity of MFE01 strains against MFP05 during contact on solid media (Gallique *et al.*, 2017a)

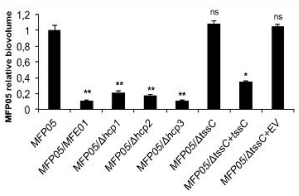
MFP05 and MFE01 strains are co-culturing on a filter on solid medium for 4h at 28°C.

MFP05 is killed on a solid surface by MFE01 (loss of around 4 logs).

Hcp1 protein is not involved in antibacterial activity but in swarming inhibition (Decoin *et al.*, 2015).

Mutations of *hcp3* or *tssC* abolish MFE01 killing activity.

MFE01 abolishes the formation of biofilms by competing bacteria



Effect of MFE01 and T6SS mutants on MFP05 biofilm formation (Gallique *et al.*, 2017a)

MFE01 strains are in contact with MFP05 in a two-species biofilms.

MFE01 strongly reduces the biovolume of the MFP05 biofilm.

The *hcp1*, *hcp2* or *hcp3* mutants still reduce the biovolume of MFP05 biofilm.

T6SS-defective MFE01 strain does not affect MFP05 biofilm biovolume.

T6SS is involved in the structure of MFE01 biofilms

The mutations of individual *hcp* genes influence the maturation of the biofilm, but not its biovolume.

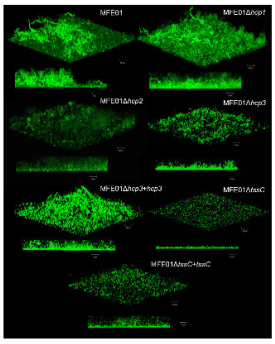
MFE01 : heterogeneous biofilms with a slightly hairy surface.

MFE01Δ*hcp1* : biofilms are more homogeneous than MFE01.

MFE01Δ*hcp2* : biofilms with early mushroom-like structure.

MFE01Δ*hcp3* : biofilms are flat, homogeneous and thicker.

T6SS-defective MFE01 strain is unable to produce its own biofilm.



Maturation of *P. fluorescens* MFE01 and mutants (Gallique *et al.*, 2017a)

MFE01 may lack the conventional QS pathway

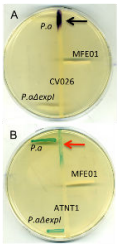
Control + : *Pectobacterium atrosepticum* 6276 (*P.a*) produces N-acyl-homoserine lactones (AHLs).

Control - : *P.aΔexpI* : does not produce AHLs.

(A) *Chromobacterium violaceum* CV026 : biosensor of C4-C8 AHLs.

(B) *Agrobacterium tumefaciens* NTI : biosensor of C6-C12 AHLs.

MFE01 does not produce short- or long-chain AHLs like many other *P. fluorescens* strains.



Detection of AHLs with biosensors strains (Gallique *et al.*, 2017a)

Conclusion

T6SS of the environmental *P. fluorescens* MFE01 strain confers a benefit in environment. Hcp1, Hcp2 and Hcp3 proteins are involved in T6SS-mediated competition with MFP05 and other *P. fluorescens* strains. Biofilms constitute an alternative lifestyle that protecting this multicellular structure. T6SS machinery does not only play an important role in the biofilm formation but also can inhibit prey cells biofilm formation.
MFE01 is devoid of the classical AHL quorum-sensing pathway, like many other *P. fluorescens* strains. Quorum sensing is a system that allows bacterial synchronization that is crucial for collective adaptive responses and regulates, amongst others, the biofilm formation.
We hypothesize that T6SS effectors may be used like a cell-to-cell signal among sisters cells.

Contact
mathias.gallique@etu.univ-rouen.fr
annabelle.merieau@univ-rouen.fr

Supported by

In partnership with

Congrès Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 2017, Valence

Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation

Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MG, Orange N, Merieau A.

Background

To persist in an ecological niche, bacteria have developed several strategies to enable them to resist in the environment. One of these mechanisms, able to struggle with other bacterial species, is the Type VI Secretion System (T6SS). This allows bacteria to inject toxins directly into prey cell cytoplasm. A mucoid environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens,* the MFE01 strain, has antibacterial activity carried by T6SS [1]. Indeed, MFE01 can immobilise prey cells through the action of the Hcp1 protein of the T6SS [2]. Currently, genomic analysis reveals only one T6SS core component cluster and three orphan *hcp* genes (named *hcp1*, *hcp2* and *hcp3).*

Objectives

Aims of this study are to assign a role to each Hcp proteins (Hcp1, Hcp2 and Hcp3) in biofilm maturation and competition against prey strains during co-inoculation in biofilm condition.

Methods

Biofilms were grown on a glass surface, for 48 h at 28°C, under a flow of LB medium and observed by confocal laser scanning microscopy. Prey cells bearing pSMC2.1 *gfp*, encoding green fluorescent protein, were co-cultured alone or with MFE01 or derivatives, in a 1:5 ratio.

Conclusion

Mutations of *hcp1*, *hcp2* and *hcp3* did not reduce *P. fluorescens* MFE01 biofilm formation [3], but the three Hcp proteins were required for the completion of biofilm maturation. Moreover, a mutant with a disruption of one of the unique core component genes, MFE01Δ*tssC*, was unable to produce its own biofilm or to inhibit prey cells biofilm formation.

Reference

[1] A Type VI Secretion System Is Involved in *Pseudomonas fluorescens* Bacterial Competition, Decoin *and al*, 2014

[2] A Pseudomonas fluorescens type VI secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition, Decoin *and al*, 2014

[3] Accepted in PlosOne (11th January 2017) Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation, Gallique et al, 2017

Congrès Société Française de Micorbiologie (SFM), 2017, Paris

Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to biofilm formation

Gallique Mathias, Bouteiller Mathilde, Decoin Victorien, Barbey Corinne, Depayras Ségolène, Rosay Thibault, Feuilloley Marc and Merieau Annabelle

Background

To persist in an ecological niche, bacteria have developed several strategies to enable them to resist in the environment. One of these mechanisms, able to struggle with other bacterial species, is the Type VI Secretion System (T6SS). It allows bacteria to inject toxins directly into prey cell cytoplasm and numerous studies have demonstrated that T6SS is involved in antibacterial activity between free-living planktonic bacteria. However in environment, biofilms are considered to be the major lifestyle compared to free-living bacteria. Biofilms are communities of microorganisms attached to surfaces and embedded in an extracellular matrix containing exopolysaccharides (EPS). The EPS production and T6SS are co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa* by RetS/GacS, c-di-GMP and Quorum Sensing pathways.

A mucoid environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens,* the MFE01 strain, has antibacterial activity carried by T6SS. Indeed, MFE01 can immobilise prey cells through the action of the Hcp1 protein of the T6SS. Currently, genomic analysis reveals only one T6SS core component cluster and three orphan *hcp* genes (named *hcp1*, *hcp2* and *hcp3*).

Objectives and Methods

In this study, we focused on T6SS involvement in bacterial competition within multispecies biofilm and we assign a role to each Hcp proteins (Hcp1, Hcp2 and Hcp3) and T6SS machinery in MFE01 biofilm maturation.

Biofilms were grown on a glass surface, for 48 h at 28°C, under a flow of LB medium and observed by confocal laser scanning microscopy. Prey cells, *P. fluorescens* MFP05 bearing pSMC2.1-*gfp* encoding green fluorescent protein, were co-cultured alone or with MFE01 or derivatives, in a 1:5 ratio.

Results and conclusion

MFE01 abolishes the formation of *P. fluorescens* MFP05 strain and T6SS is crucial for this competition activity. Surprisingly, Hcp2 and Hcp3 proteins are not involved in this inhibition of MFP05 biofilm formation whereas these proteins are linked to killing activity on solid medium (planktonic bacteria). Mutations of *hcp1*, *hcp2* or *hcp3* did not reduce *P. fluorescens* MFE01 biofilm formation, but the three Hcp proteins were required for the completion of biofilm maturation. Moreover, a mutant with a disruption in one of the unique core component genes, MFE01Δ*tssC*, was unable to produce its own biofilm. Furthermore, MFE01 strain does not produce conventional quorum sensing signals, unlike *Pseudomonas aeruginosa*. We assume that T6SS is essential for intra-bacterial cooperation in biofilm and allows social behaviour between MFE01 sister cells.

IV. Curriculum vitae

Gallique Mathias

Ph.D student

Personal details

Citizenship : French

Birth : 02-07-1991

Adress : 70, rue Berrubé

76 150, Maromme, France

+33 6 52 20 72 87

gallique.mathias@live.fr

Professional Network

Follow me on ResearchGate

https://www.researchgate.net/profile/Mathias_Gallique

Professional Interest

Bacterial secretion system

Bacteria-plant interaction

Nanomachines assembly

Flagella and motility

Antimicrobial activity

Microbial biofilm

Languages

French: native language

English: Good skills

Graduate education

2014-2017, Ph.D: Involvement of Type VI Secretion System of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 in antibacterial activity, biofilm formation and motility inhibition. Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (LMSM EA4312, Normandy University)

Thesis superviser : Dr Annabelle Merieau

Contact : annabelle.merieau@univ-rouen.fr

Working partnership

Cascales'Lab, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), Aix-Marseille Université - CNRS, Marseille, France.

Publications

Decoin, V., **Gallique, M.,** Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C.D., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2015). A Pseudomonas fluorescens type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. BMC Microbiol. *15*, 72.

Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. (2017a). Contribution of the Pseudomonas fluorescens MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. PLOS ONE *12*, e0170770.

Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017b). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? Front. Microbiol. *8*.

Professional skills

Molecular biology	DNA and RNA extraction qRT-PCR Bacterial transformation Mutagenesis
Proteomic	Protein extraction Mass spectrometry (MALDI-Tof) Bacterial two hybrid (BACTH) Immunoprecipitation
Physiology	Antibacterial activity Motility and swarming competition Static and dynamic biofilm
Microscopy	Confocal laser scanning microscopy
Bacterial annotation	Tools : RAST, BASys, CDSeasy, Phyre^2

V. Résumé en anglais

Type IV secretion system (T6SS) is a multiproteic apparatus that secreted proteinaceous effectors. T6SS participate in a variety of functions, whose eukaryote virulence, antibacterial activity or metal ion uptake. These capacities conferring an advantage in adaptation and competition, crucial to colonization or persistence within ecological niche. As well, only a few studies have focused on the T6SS functions of environmental strains, contrary to numerous studies dealing with pathogens as *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis, Vibrio cholerae* or *Escherichia coli*. The purpose of my research project was to characterize the T6SS function(s) of the environmental strain *Pseudomonas fluorescens* MFE01.

This work had led to understand the various functions of T6SS of MFE01 strain. This strain has a single T6SS cluster where all the core component proteins were gathered, except *hcp* genes. Three orphan *hcp* genes where found and are scattered in genome. Hcp proteins form the inner tube allowing effectors secretion. Both Hcp2 and Hcp3 proteins were involved in antibacterial activity on pathogens or environmental strains like P. aeruginosa, *P. fluorescens* or *Pectobacterium atrosepticum*. Characterization of Hcp1 proteins role constituted a major focus of this project. Hcp1 proteins participate to motility inhibition of competitive strains through T6SS. Hcp1 may be associated with secretion of at least two toxins perturbing the flagellar filament assembly. In MFE01Δ*hcp1* and MFE01Δ*tssC* mutants (Tss is a contractile sheath constituent), these toxins may be accumulated into cytoplasm and perturb assembly of their own flagella. Interestingly, overproduction of FliA flagellar regulator, which controls assembly of flagellar filament, restores motility of both mutants. Simultaneously, T6SS of MFE01 strain contributes to maturation and biofilm formation but also in bacterial competition within mixed biofilm. T6SS may be a mean of bacterial communication and thus coordinate a social behavior, primordial for biofilm formation.

RÉSUMÉ

Le système de sécrétion de type VI (SST6) est un complexe multi-protéique permettant l'export d'effecteurs. Ce mécanisme est impliqué à la fois dans la virulence envers les cellules eucaryotes, dans l'activité antibactérienne mais également dans l'acquisition d'ions présents dans l'environnement. Ainsi, le SST6 joue un rôle important dans l'adaptation et la compétition, éléments essentiels dans la colonisation et la persistance au sein d'une niche écologique. Actuellement, très peu d'études portent sur l'importance du SST6 chez des souches environnementales, contrairement aux nombreuses études portant sur des pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis, Vibrio cholerae* ou *Escherichia coli*. Mon sujet de recherche avait pour objectif de caractériser le ou les rôles du SST6 de la souche environnementale *Pseudomonas fluorescens* MFE01.

Ces travaux ont permis d'appréhender certaines fonctions du SST6 de cette souche. Le génome de MFE01 ne comporte qu'un seul cluster de gènes du SST6 où sont regroupés les gènes codant pour la machinerie du SST6 (le « core-component ») à l'exception des gènes *hcp.* Les protéines Hcp sont des éléments structuraux du SST6 dont elles forment le tube interne qui permet le transfert des effecteurs. Différents gènes *hcp* sont disséminés sur le chromosome et parmi ces « *hcp* » orphelins, *hcp2* et *hcp3* codent respectivement pour les protéines Hcp2 et Hcp3. Ces deux Hcp sécrétées par le SST6, sont associées à l'activité antibactérienne de MFE01 sur différentes souches pathogènes et environnementales, tels que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* MFN1032 et *Pectobacterium atrosepticum*. La protéine Hcp1, codée par le gène orphelin *hcp1,* est impliquée dans l'inhibition de mobilité de souche compétitrice. Hcp1 permettrait la sécrétion d'au moins deux toxines qui perturberaient l'assemblage du flagelle. Chez MFE01Δ*hcp1* et MFE01Δ*tssC* (TssC est un élément de la gaine contractile du SST6), ces toxines seraient accumulées dans le cytoplasme, inhibant ainsi l'assemblage de leur propre flagelle. La surproduction du régulateur FliA, qui contrôle notamment l'assemblage du filament flagellaire, restaure la mobilité chez ces deux mutants. En parallèle, le SST6 de la souche MFE01 est essentiel à la formation et la maturation de biofilm mais également à la compétition bactérienne en biofilm mixte. Ce système interviendrait dans la communication bactérienne indispensable au comportement social, requis lors de l'élaboration des biofilms.