



**HAL**  
open science

# Mécanismes de l'homéostasie du cuivre chez un pathogène strictement humain, *Bordetella pertussis*

Alex Rivera-Millot

► **To cite this version:**

Alex Rivera-Millot. Mécanismes de l'homéostasie du cuivre chez un pathogène strictement humain, *Bordetella pertussis*. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS009 . tel-03229185

**HAL Id: tel-03229185**

**<https://theses.hal.science/tel-03229185>**

Submitted on 18 May 2021

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

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



# Thèse de Doctorat

Université de Lille

École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Pour obtenir le grade de  
Docteur en Sciences

Présentée et soutenue publiquement par  
Alex RIVERA-MILLOT

Le 26 juin 2020

---

## Mécanismes de l'homéostasie du cuivre chez un pathogène strictement humain, *Bordetella pertussis*

---

### Composition du Jury :

Pr. Benoit Foligné  
*Professeur de l'Université de Lille*

*Président*

Pr. Jean-Yves Matroule  
*Professeur de l'Université de Namur*

*Rapporteur*

Dr. Soufian Ouchane  
*Directeur de Recherche CNRS, Paris-Saclay*

*Rapporteur*

Dr. Elise Borezee-Durant  
*Chargée de Recherche INRAE, Jouy en Josas*

*Examinatrice*

Dr. Marianne Ilbert  
*Chargée de Recherche CNRS, Marseille*

*Examinatrice*

Dr. Françoise Jacob-Dubuisson  
*Directrice de Recherche CNRS, Lille*

*Directrice de Thèse*





## Remerciements

Pour commencer, je souhaite adresser mes remerciements aux organismes ayant financé ma thèse, l'Université de Lille, la Région Hauts-de-France et la FRM. Un grand merci également aux autres tutelles ayant participé à ces travaux, Inserm, CNRS et l'institut Pasteur de Lille.

Bien évidemment je remercie également les membres du jury pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Merci également à nos collaborateurs ayant permis la mise en place de plusieurs protocoles, Sophie Salome Desnoulez et Jean-Michel Saliou.

J'adresse mes remerciements au Docteur Camille Locht pour m'avoir accueilli au sein de son équipe mais également au Docteur Nathalie Mielcarek qui a pris la direction de l'équipe au cours de ma thèse.

J'aimerais adresser un remerciement tout particulier à ma directrice de thèse, Françoise Jacob-Dubuisson. Durant ces dernières années Françoise a été un professeur toujours enthousiaste et à l'écoute. Un grand merci pour m'avoir fait bénéficier de ses qualités scientifiques et humaines. Son influence a considérablement modelé la personne que je suis et le chercheur que j'espère devenir après cette thèse. Merci pour les connaissances, le soutien et la confiance. J'espère avoir été à la hauteur de cette confiance.

Je remercie Rudy Antoine pour ses analyses bio-informatiques mais aussi pour m'avoir partagé ses connaissances dans ce domaine. Un remerciement plus personnel pour nos conversations et pour les sujets de discussion du midi !

Merci à Anais Thiriard et Gauthier Roy pour l'aide et le soutien autant scientifique que personnel qu'il a fallu durant nos thèses respectives. Merci pour les soirées au labo et en dehors. Anais, je te souhaite le meilleur pour ton avenir de Post-Doc et Gauthier bon courage pour ta fin de thèse.

Je voudrais également remercier les deux thésards m'ayant précédé, Elodie Lesne et Elian Dupré. Ils m'ont transmis de nombreuses connaissances théoriques et techniques. Je leur souhaite le meilleur dans leur vie de chercheur.

Je dois également remercier mes voisines et voisins de bureau. C'est Stéphanie Slupeck qui m'a supporté le plus longtemps pendant presque trois ans, avec qui on a beaucoup travaillé mais aussi bien ri, merci. Et plus récemment Violaine Dubois et Astride Lennes qui ont été d'un grand soutien durant la rédaction de ma thèse.

J'aimerais également remercier chaleureusement Jonathan Chatagnon pour son aide et son enseignement en matière d'expérimentations animales mais aussi pour les discussions, les sorties, la bonne humeur... et plus généralement pour son amitié.

Un grand merci à Sophie Lecher, pour ... et bien déjà pour m'avoir accepté, ce qui n'a pas été très simple. Puis merci pour tout le reste, les pauses, les sorties, l'organisation de la vie du labo, mais aussi pour ton aide et ta gentillesse.

Merci également à Emmanuelle Petit, toujours prête à aider et à soutenir avec une parole gentille.

Un merci particulier à Martin Moune et Kamel Djaout, pour leur bonne humeur permanente et l'ambiance qu'ils ont su instiller au laboratoire.

Enfin un grand merci à tous les membres de la grande famille des BRIPT (rebaptisée récemment RMB). Je suis bien conscient de la chance que j'ai eu de faire ma thèse dans cette équipe si soudée. Je n'aurai pas pu espérer un meilleur environnement pour passer ces quelques années si importantes de ma vie. Un très grand merci à tous ...

En dehors de mon équipe certaines personnes m'ont été d'un grand soutien. Je tiens à remercier chaleureusement Adeline Danneels, Ariane Bonnin et Jeanne Alard. Merci d'avoir été là, merci pour le soutien, les pauses, les discussions, les sorties .... Merci pour tout !

Un très grand merci à Anabelle Perrier et Valentin Hassaine, votre joie de vivre et votre énergie sans pareille ont réellement égayé ces dernières années. Merci Beaucoup. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

Il est évident que je remercie sincèrement toute ma famille. Tous ceux qui ont été présents et qui se sont montrés intéressés par mon travail.

Mes remerciements vont tout particulièrement à mes parents Valérie Millot et Fabrice Rivera. C'est grâce à eux que j'en suis arrivé là. Ils m'ont soutenu et ont été présents à tout moment durant toute ma vie. Merci d'avoir cru en moi. Je ne pourrais jamais assez-vous remercier pour tout.

Pour finir j'aimerais remercier Lauréline Vaux-Perrier. Merci pour ton amour. Merci d'avoir été à mes côtés. Tu as été un pilier sur lequel je me suis appuyé. Merci pour ton soutien dans les hauts comme dans les bas de ces dernières années. Merci de m'avoir supporté dans les périodes de stress. Merci de m'avoir rassuré. Merci pour ta confiance. Merci d'avoir relu mes écrits. Merci !



“ La vraie Science est une ignorance qui se sait ”

*Michel de Montaigne*

## Abréviations

	English	Français
5'RACE	System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Système d'amplification rapide de la région terminale de l'ADNc
ACP	Pincipal Composant Analysis	Analyse en composantes principales
ACT	Adenylate cyclase	Adénylate cyclase
ADN	Desoxyribonucleic acid	Acide désoxyribonucléique
aP	Acellular Pertussis vaccine	Vaccin acellulaire pertussique
ARN	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triprophate	
BCS	Bathocuproine disulfonate	
BG	Bordet-Gengou medium	Milieu Bordet-Gengou
CAH	Clustering hierarchic	Classification ascendante hierarchique
CAS	Chromazurol S	
CAT	Catatase	
CDC	Center for disease control	Centre de contrôle des maladies
CRP	Copper related protein	Protéines en relation avec le cuivre
CSP	Copper storage protein	Protéines de stockage du cuivre
Cu	Copper	Cuivre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Milieu Dulbecco's Modified Eagle
DNT	Dermonecrotic toxin	Toxine dermonécrotique
DTP	Vaccin Diphterie-Tétanos-Pertussis	
EDTA	Ethylènediaminetetra-acetic acid	Acide éthylènediaminetétra-acétique
FcR	Receptor Fc	Recepteur Fc (frangment cristalisable)
Fe	Iron	Fer
FHA	Filamentous hemagglutinin	Hémagglutinine filamenteuse
GS-Cu-SG	Copper-Glutathione complexe	Complexe cuivre glutathion
GSH	Reduced Glutathione	Glutathion réduit
GSSG	Oxidyzed dimeric Glutathione	Dimère de glutathion oxydé
HAE	Hydrophobic and Amphiphilic Efflux	Efflux de composés hydrophobes et amphiphiles
HDTMA	Hexadecyltrimethylammonium bromide	Bromure d'hexadecyltrimethylammonium
HK	Histidine kinase	
HME	Heavy Metal Efflux	Efflux de métaux lourds
Hpt	Histidine phosphoryl transférase	
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma atomic emission spectrometry	
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma mass spectrometry	
IL	Interleukine	

	English	Français
IS	Insertion sequence	Séquence d'insertion
LH/L'	Fatty acid (polyunsaturated)/ lipidic radical	Acide gras (lipide polyinsaturé) / Radical lipidique
LOOH/LOO'	lipidic hydroperoxide / lipidic peroxide radical	Hydroperoxyde lipidique / radical peroxyde lipidique
LOS	Lipooligosaccharide	
LPS	Lipopolysaccharide	
MCO	Multicopper oxidase	Multicopper oxydase
Mn	Manganèse	
MOI	Multiplicity of infection	Multiplicité d'infection
MT	Metallothioneines	
NDH	NADH deshydrogenase	NADH déshydrogénase
NOX	NADPH oxidase	NADPH oxydase
OMS	Organisation mondiale de la santé	
PBS	Phosphate Buffer Saline	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerization chain reaction	Réaction de polymérisation en chaîne
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	
PRN	Pertactine	
PRR	Pattern recognition receptor	Recepteur de reconnaissance de motifs
PTS	Système phosphotransférase	
PTX	Pertussis toxin	Toxine pertussique
RBS	Ribosome binding site	Site de liaison du ribosome
Rec	Receiver domain	Domaine Receveur
RND	Resistance-Nodulation-cell-Division	Resistance-Nodulation-Division cellulaire
ROS	Reactive oxygen species	Espèces oxygénées réactives
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	Milieu Roswell Park Memorial Institute
RSH/RS'	Thiols / Radical Thyl	
SOD	Superoxyde dismutase	
SS	Stainer Scholte medium	Milieu Stainer Scholte
SVF	Fœtal bovine sérum	Serum de veau foetal
T <sub>3</sub> SS	Type three secretion system	Système de secretion de type trois
TCS	Two-component system	Système à deux composant
TCT	Cytotracheal toxin	Toxine cytotrachéale
TLR	Toll-like receptor	Recepteur Toll-like
TNF	Tumor necrotic factor	Facteur de nécrose de tumeurs
VFT	Venus flytrap	
wP	Whole cell vaccine pertussis	Vaccin pertussique à cellules entières
XO	Xanthine oxidase	Xanthine oxydase
Zn	Zinc	

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Le cuivre</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. Les origines de l'utilisation du cuivre</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2. Les rôles du cuivre en biologie</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Cofacteur enzymatique .....	12
<b>1.3. La toxicité du cuivre</b> .....	<b>14</b>
1.3.1. Interaction avec les protéines .....	15
1.3.2. Interaction avec les membranes .....	18
1.3.3. Autres interactions .....	19
<b>1.4. L'homéostasie du cuivre</b> .....	<b>22</b>
1.4.1. Chez les procaryotes.....	22
1.4.1.1. <i>Importation</i> .....	22
1.4.1.2. <i>ATPases</i> .....	25
1.1.1.1. <i>Chaperonnes et stockage</i> .....	26
1.1.1.2. <i>Systèmes Cus de la famille RND</i> .....	28
1.1.1.3. <i>Multicopper-oxydases</i> .....	29
1.1.1.4. <i>Régulateurs</i> .....	31
1.4.2. Chez les eucaryotes .....	35
<b>1.5. Le cuivre au sein de l'interaction hôte-pathogène</b> .....	<b>37</b>
1.5.1. Histoire de la phagocytose : de l'amibe au macrophage .....	37
1.5.2. Utilisation des métaux par les amibes et les macrophages .....	40
<b>2. <i>Bordetella pertussis</i>, pathogène à hôte restreint</b> .....	<b>44</b>
<b>2.5. Origine et découverte</b> .....	<b>44</b>

2.5.1. Caractéristiques microbiologiques.....	45
<b>2.6. La coqueluche .....</b>	<b>45</b>
2.6.1. La maladie .....	45
2.6.2. Le diagnostic .....	47
2.6.3. Le traitement.....	47
2.6.4. L'épidémiologie .....	48
2.6.5. Les vaccins.....	49
<b>2.7. Mode de vie et pathogénie de <i>Bordetella pertussis</i> .....</b>	<b>52</b>
2.3.1 Évolution du genre Bordetella .....	52
2.7.1.1. De l'environnement à l'animal.....	54
2.7.1.2. De l'animal à l'homme.....	56
2.7.1.3. Spécialisation à l'humain de <i>B. pertussis</i> .....	62
2.7.1.3.1. Les facteurs de virulence .....	62
2.7.1.3.1.1. Système à deux composants BvgAS et autres régulations .....	62
2.7.1.3.1.2. Toxines majeures .....	65
2.7.1.3.1.3. Adhésines majeures .....	68
2.7.1.3.1.4. Autres effecteurs.....	69
2.7.1.3.2. Immunomodulation .....	70
2.7.1.3.3. Détournement et manipulation du métabolisme de l'hôte.....	75
2.7.1.3.4. Evolution du métabolisme .....	77
2.7.1.3.5. Evolution par réduction génomique : rôles des IS.....	79
<b>Objectifs .....</b>	<b>81</b>

<b>Résultats .....</b>	<b>83</b>
<b>1. Analyse Bio-informatique du protéome en lien avec le cuivre chez les <math>\beta</math>-protéobactéries et relations avec leurs styles de vie ....</b>	<b>83</b>
1.1. Contexte.....	83
1.2. Article: Relationships Between Copper-Related-Proteomes and Lifestyles in $\beta$ -Proteobacteria.....	83
1.3. Résumé .....	99
1.4. Résultats complémentaires .....	100
<b>2. Caractérisation de l'homéostasie du cuivre chez <i>Bordetella pertussis</i> et comparaison avec <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....</b>	<b>108</b>
2.1. Contexte.....	108
2.2. Article: Streamlining of defenses against copper makes host-restricted pathogen reliant on custom-made operon.....	108
2.3. Résumé .....	143
2.4. Résultats complémentaires .....	146
2.4.1. Mise au point des conditions de culture en excès de cuivre.....	146
2.4.1.1. Tests de survie ou suivi de croissance .....	146
2.4.1.2. Impact des sources de soufre dans la croissance et la tolérance au cuivre ..	149
2.4.2. Mécanismes de défenses .....	151
2.4.2.1. Délétion des gènes codant des protéines liées au cuivre.....	151
2.4.3. Impact du stress Oxydatif .....	152
2.4.3.1. Mise au point du test Xanthine oxidase.....	152
2.4.3.2. Tests de quantification du stress oxydatif .....	153
2.4.4. Rôle du cuivre et différents systèmes dans la relation hôte-pathogène .....	155

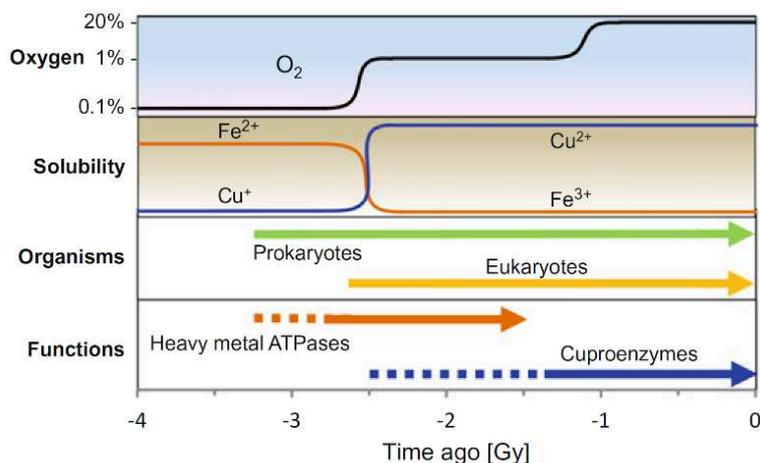
2.4.4.1. Impact du cuivre dans la bactéricidie des cellules phagocytaires .....	155
2.4.5. Régulation des mécanismes de défenses.....	159
2.4.5.1. Cas du régulateur CueR des <i>B. pertussis</i> .....	159
2.4.5.2. 5'RACE .....	160
2.4.5.3. Régulation OxyR.....	162
2.4.6. Mise au point des conditions de carence en cuivre.....	163
2.4.7. Analyse transcriptomique de la carence en cuivre .....	165
2.4.8. Mécanismes d'importation .....	169
2.4.8.1. Survie à la carence .....	169
2.4.8.2. Mise au point du dosage de cuivre intracellulaire.....	170
2.4.8.3. Recherche d'un chalcophore.....	173
2.4.8.4. Sensibilité de la régulation BfrG.....	175
2.4.9. Colonisation animale et réponse immunitaire .....	176
<b>3. Travaux issus de l'encadrement de Stagiaires .....</b>	<b>179</b>
<b>Discussion et Perspectives.....</b>	<b>182</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>190</b>
<b>1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>190</b>
<b>2. Recherches Annexes .....</b>	<b>194</b>
2.1. Contexte et Résumé .....	194
2.2. Article: Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl- transferase in <i>Bordetella pertussis</i> .....	194
<b>Bibliographie.....</b>	<b>214</b>

# Introduction

## 1. Le cuivre

### 1.1. Les origines de l'utilisation du cuivre

Depuis l'émergence de la vie sur terre, les métaux sont devenus des éléments essentiels à de nombreux processus biologiques. Aux origines de la vie, le fer était un outil particulièrement apprécié des bactéries. Le fer est le second métal le plus abondant sur terre, après l'aluminium, et le quatrième élément le plus présent dans la croûte terrestre. Cet élément bénéficie de trois états d'oxydation possibles, les deux principaux étant Fe(II) et Fe(III) (Crichton et Pierre, 2001). L'absence d'oxygène dans les temps précoces de notre planète permettait au fer de se maintenir sous forme  $Fe^{2+}$  soluble et donc d'être biodisponible, à l'inverse du cuivre, insoluble sous forme  $Cu^{1+}$ . Il y a 2.7 milliards d'années, l'apparition d'organismes photosynthétiques fit augmenter la concentration d'oxygène déclenchant le « Burst Oxydatif » (Sessions et al., 2009) (Figure 1). Ce changement drastique de presque tous les environnements obligea les organismes à s'adapter.



*Figure 1: Représentation hypothétique de l'évolution du taux d'oxygène dans l'atmosphère terrestre au cours des temps géologiques ainsi que des différentes conséquences sur la solubilité des métaux et l'évolution des protéines chez les organismes vivants. Source : Solioz, 2018 inspiré de Crichton et Pierre, 2001*

L'un des changements les plus importants fut la disparition du Fer à l'état soluble, l'oxygène entraînant l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  insoluble ( $10^{-18}$  M à pH7 ; Silva and Williams, 2001). Différentes adaptations ont émergé, la première étant le développement de sidérophores permettant l'obtention du fer devenu insoluble et la seconde l'utilisation d'autres métaux devenus biodisponibles comme le cuivre et le zinc. Les procaryotes ont plus particulièrement développé des enzymes utilisant le cuivre comme cofacteur tandis que les eucaryotes ont préféré se tourner vers le zinc, même si l'utilisation du cuivre reste abondante. L'utilisation de ces nouveaux métaux n'est pas sans risques.

En effet le zinc et le cuivre présentent de nombreux dangers (Solioz, 2018). Les différents organismes vivants ont donc accompagné leur utilisation de systèmes de tolérance, défense et détoxification (Dupont et al., 2011).

## 1.2. Les rôles du cuivre en biologie

### 1.2.1. Cofacteur enzymatique

Le fer était et demeure un cofacteur enzymatique essentiel à la vie. L'un des exemples les plus parlants est l'utilisation de ce dernier dans la réduction des ribonucléotides précurseurs de l'ADN (Herrick and Sclavi, 2007). Mais à l'instar du fer, le cuivre est devenu tout aussi essentiel à la vie (Crichton and Pierre, 2001).

Le potentiel rédox du cuivre est en parfait accord avec les réactions catalytiques nécessaires à la chimie biologique (Solioz, 2018). De très nombreuses enzymes au sein de voies métaboliques extrêmement diversifiées utilisent le cuivre comme cofacteur. C'est un transporteur d'électron idéal pour de nombreuses protéines comme les azurines (Cahyono et al., 2020) ou les plastocyanines (Scheiber et al., 2019). On trouve des enzymes à cuivre dans les voies de biosynthèse de la tyrosine (Solano, 2018). Ce métal joue également un rôle important dans le métabolisme de l'azote avec des enzymes comme les amines oxydases (Angelini et al., 2018; Gaule et al., 2018) et la réductase de l'oxyde nitreux (Hein and Simon, 2019). Le cuivre est aussi impliqué dans l'utilisation du méthane avec la méthane monooxygénase (Ross et al., 2019). On trouve également toutes sortes d'oxydases à multiples ions cuivre dans leur site actif, et capables d'oxyder le cuivre ou d'autre composés. Au sein de cette famille de protéines on trouve de nombreuses laccases (Janusz et al., 2020) dégradant les composés aromatiques, des oxydases de bilirubine (Tokiwa et al., 2018), des réductases de nitrite, etc. (Fukuda et al., 2020). Comme nous l'avons vu dans la section précédente et le verrons dans la suivante, le cuivre entretient un lien tout particulier avec l'oxygène et ses dérivés. Il semble donc normal que les protéines à cuivre les plus abondantes soient liées au métabolisme de l'oxygène. De nombreux cytochromes et acteurs de la chaîne respiratoire utilisent le cuivre, ces différentes protéines sont essentielles à la formation de la force proton motrice, source d'énergie de l'ATP synthase (Lee et al., 2012). Et bien sûr le cuivre est présent dans les protéines qui détoxifient les dérivés de l'oxygène utilisés comme accepteurs finaux d'électrons dans les chaînes respiratoires. Les dismutases de superoxydes à cuivre sont omniprésentes dans le vivant, celles à cuivre et zinc chez les bactéries (SodC) (Scotti et al., 2015) et chez les eucaryotes (Sod1) (Li et al., 2019), mais il existe aussi des superoxydes dismutases uniquement à cuivre chez les mycobactéries (D'Orazio et al., 2009) et les champignons (Sod4, Sod5, Sod6) (Robinett et al., 2018). (Tableau 1)

Le cuivre est donc devenu un cofacteur majeur des réactions enzymatiques, par ailleurs il est probable que les exemples cités ici ne représentent qu'une petite partie des différents usages que le vivant fait de ce métal.

*Tableau 1 : Liste non exhaustive des différentes protéines utilisant le cuivre comme cofacteur. À gauche les enzymes présentes chez les procaryotes, à droite celles présentes chez les eucaryotes. Les protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre ne sont pas prises en compte. Source : Solioz, 2018*

Prokaryotic	Eukaryotic
Plastocyanin family (amicyanin, pseudoazurin, halocyanin, etc.)	Plastocyanin family (plantacyanin, umecyanin, mavicyanin, stellacyanin, etc.)
Azurin family (azurin, auracyanin)	
Rusticyanin	
Nitrosocyanin	
Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit I	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit I
Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit II	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit II
Cytochrome <i>cbb</i> <sub>3</sub> oxidase	
Cu–Zn superoxide dismutase	Cu–Zn superoxide dismutase
Copper amine oxidase	Copper amine oxidase
Nitrous oxide reductase	
Nitrate reductase	Nitrate reductase
NADH dehydrogenase 2	
Amine oxidase	Amine oxidase
Methane monooxygenase	
Multicopper oxidases (nitrite reductase, CueO, CotA, laccase, bilirubin oxidase, phenoxazinone synthase, etc.)	Multicopper oxidases (laccase, Fet3p, hephaestin, ceruloplasmin, ascorbate oxidase, etc.)
Tyrosinase	Tyrosinase
MogA molybdenum cofactor synthesis <sup>b</sup>	Cnx1G molybdenum cofactor synthesis <sup>b</sup>
	Galactose oxidase
	Peptidylglycine R-hydroxylating monooxygenase
	Dopamine β-monooxygenase
	Galactose oxidase
	Cnx1G
	Hemocyanin

### 1.3. La toxicité du cuivre

Le cuivre est connu de longue date comme étant un biocide très efficace. Néanmoins, à ce jour les mécanismes de sa toxicité ne sont pas complètement compris. Ici, nous nous intéresserons aux connaissances actuelles sur ces différents mécanismes.

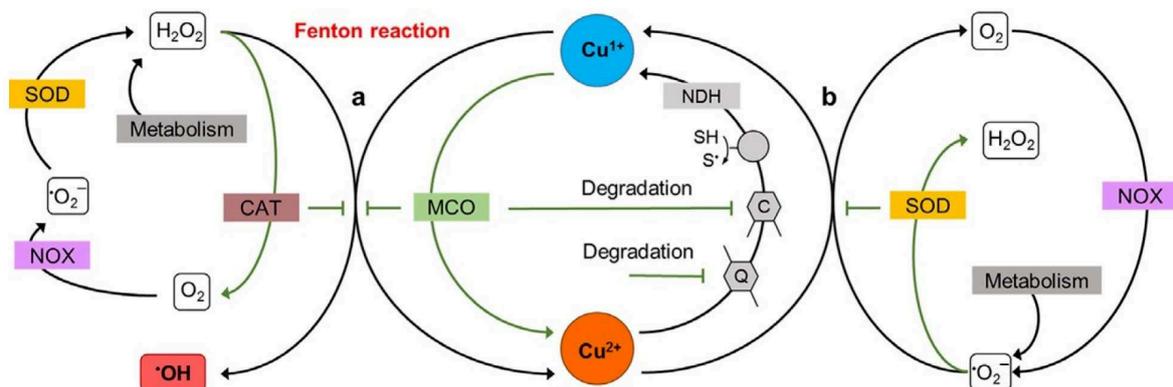
Certains de ces mécanismes comme la mismétallation seront expliqués dans les parties suivantes. Dans ce préambule nous expliciterons la relation entre cuivre et stress oxydant.

Les ions cuivre  $\text{Cu}^{1+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  possèdent un potentiel d'oxydoréduction correspondant à la réaction de Fenton. Cette dernière a particulièrement été étudiée dans le cas du fer mais il semble que le cuivre soit également capable d'induire la réaction (Dalecki et al., 2017; Solioz, 2018).



Le cuivre (comme le fer) va donc entraîner la formation du radical Hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ) très toxique. En effet ce dernier est extrêmement réactif et va donc réagir spontanément avec les molécules présentes dans son entourage direct. Sa demi-vie est estimée à  $10^{-19}$  seconde (Freinbichler et al., 2011). Cette réaction entraîne également la mise en place du cycle d'Haber-Weiss. Ce dernier voit réagir le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ) avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  donnant de l' $\text{H}_2\text{O}$ , un proton et surtout un anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Le potentiel rédox de l'anion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  lui permet de réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  et donc de redémarrer le cycle (Dalecki et al., 2017; Hodgkinson and Petris, 2012; Liochev and Fridovich, 2002; Solioz, 2018). Il est important de noter que certaines études ont mis en évidence la capacité du cuivre à déplacer le fer de certaines protéines, et l'ion fer libre  $\text{Fe}^{2+}$  va lui-même induire des réactions de Fenton. Enfin, la présence de protéines sous forme apo (sans fer) va induire la synthèse des systèmes d'importation du fer, augmentant la concentration cytoplasmique de ce métal (Dalecki et al., 2017; Imlay, 2013; Macomber and Imlay, 2009). La réduction du cuivre par les thiols du cytoplasme peut également aboutir à la formation de radicaux thiyl ( $\text{RS}^\cdot$ ) (Dalecki et al., 2017; Luc and Vergely, 2008) (Figure 2).

On peut préciser que le cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  est accidentellement formé par la chaîne respiratoire. En effet certains maillons de cette chaîne vont, soit directement produire un excès d'électrons réduisant le cuivre comme la NADH déshydrogénase du complexe 1, soit générer de l'anion superoxyde comme le complexe 3 (cytochrome C réductase) (Figure 2).

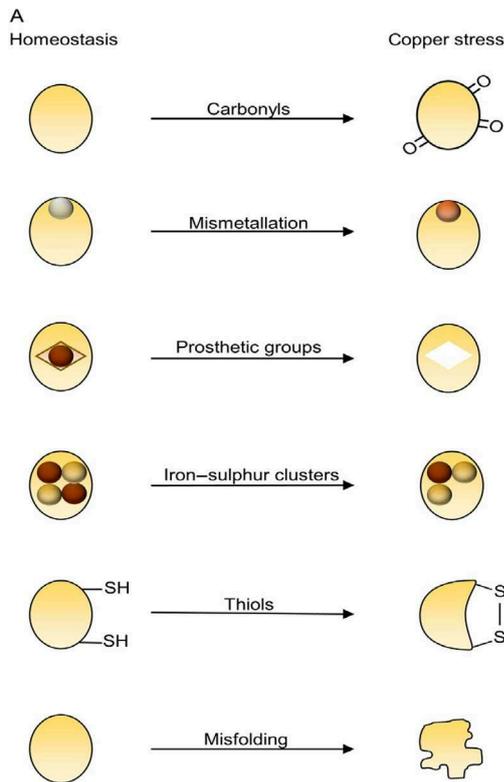


*Figure 2 : Représentation des différents cycles impliquant le cuivre et le stress oxydant. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est généré par le métabolisme de la chaîne respiratoire et par l'action des Superoxyde dismutases (SOD) sur l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). Ce dernier est généré par l'action de la catalase (CAT) sur l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produisant de l' $\text{O}_2$  qui à son tour sous l'action de la NADPH oxydase (NOX) (enzyme présente dans les cellules phagocytaires) va donner de l' $\text{O}_2^-$ . Le  $\text{Cu}^{1+}$  va entraîner la réaction de Fenton (a) catalysant la transformation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\cdot\text{OH}$  extrêmement toxique. Le  $\text{Cu}^{2+}$  formé va être réduit par l'action du  $\text{O}_2^-$  et/ou par les catéchols (C), quinones (Q), thiols (SH), et NADH déshydrogénase (NDH) reformant du  $\text{Cu}^{1+}$  pour alimenter la réaction de Fenton. La SOD inhibe l'action de l' $\text{O}_2^-$  sur le cuivre, la catalase inhibe la réaction de Fenton et la multicopper oxydase (MCO) diminue la concentration de  $\text{Cu}^{2+}$  en le transformant en  $\text{Cu}^{1+}$ , L'oxydation des catéchols par la MCO les empêche de réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$ . Source : Dalecki et al., 2017*

### 1.3.1. Interaction avec les protéines

Les principales cibles des effets délétères du cuivre semblent être les protéines. Il existe différents mécanismes rendant les protéines non fonctionnelles. Pour comprendre l'un des aspects majeurs de l'interaction directe entre le cuivre et les protéines, il est important de s'intéresser brièvement à la chimie du cuivre. Ce métal a la particularité de se trouver tout en haut de la série d'Irving-Williams ( $\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ) (Irving and Williams, 1953). Cette série représente la stabilité thermodynamique des complexes formés par ces métaux avec d'autres molécules. Le cuivre va donc se lier spontanément aux protéines de façon aspécifique. Cette propriété a entraîné une pression de sélection sur les organismes utilisant ce métal qui a abouti à l'émergence de protéines dites chaperonnes, essentielles à l'acheminement et à l'insertion du cuivre dans les sites actifs dont il fait partie (Robinson and Winge, 2010). L'affinité du cuivre pour les protéines constitue un des mécanismes de toxicité les plus importants. En effet, le cuivre a différents effets sur les protéines (Figure 3).

Comme dit précédemment, le cuivre est très affiné pour de nombreuses molécules biologiques et cette affinité pose des problèmes. Ce métal va former des complexes avec différents acides aminés ; mais certains, comme la proline, l'arginine, la lysine ou la thréonine, possèdent des chaînes latérales particulièrement sensibles aux radicaux hydroxyles que génère le cuivre (Dalecki et al., 2017; Holm et al., 1996), entraînant la formation de groupements carbonyles.



*Figure 3: Schéma des différentes attaques directes ou indirectes du cuivre sur les protéines. Source : Dalecki et al., 2017*

La forte affinité du cuivre pour les protéines touche particulièrement les protéines utilisant d'autres métaux. En effet, celui-ci est capable de prendre la place des différents métaux de transition lors de la biosynthèse de ces protéines. La mismétallation de ces protéines aboutit à leur dysfonctionnement (Dalecki et al., 2017; Solioz, 2018) (Figure 3). La conséquence de ces propriétés est que les cellules maintiennent une concentration en cuivre cytoplasmique extrêmement basse. Les protéines à cuivre reçoivent leur métal dans le périplasma et, que ce soit d'un côté ou de l'autre de la membrane plasmique, le cuivre est toujours transféré par des protéines chaperonnes dans le but de minimiser tout risque de mismétallation (Robinson and Winge, 2010; Trasnea et al., 2018; Utz et al., 2019).

Il semble que l'impact le plus dramatique du cuivre se manifeste sur les protéines possédant des clusters fer-soufre (Fe-S). L'effet du cuivre sur ces protéines apparaît comme la toxicité majeure du cuivre au sein des cellules (Macomber and Imlay, 2009). De très nombreuses enzymes essentielles sont touchées comme l'isopropyl isomérase, la fumarase A et la 6-phosphogluconate déshydratase chez *E. coli* (Macomber and Imlay, 2009) ou encore les systèmes de la synthèse de l'hème chez *Neisseria gonorrhoeae* (Djoko and McEwan, 2013). De plus, comme ces mécanismes de toxicité semblent indépendants de l'oxygène (Macomber and Imlay, 2009), il est probable que le cuivre ait une action directe sur ces clusters. Solioz propose une explication de ces mécanismes basée sur les propriétés chimiques du cuivre (Solioz, 2018). Cette hypothèse s'appuie sur le concept des acides et bases durs et mous de Pearson (Pearson, 1968). Dans des termes très simplifiés, ce concept stipule que les différents acides et bases vont s'associer préférentiellement avec les acides ou les bases de force équivalente (Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés en termes de dureté/mollesse des acide et bases les plus communs, ainsi que de certains métaux et leurs ligands. Source : Solioz, 2018

Hard acids <sup>a</sup>	Interm. acids <sup>a</sup>	Soft acids <sup>a</sup>	Hard bases	Interm. bases	Soft bases
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cu <sup>+</sup>	ROH	Imidazole-N	RSH
Mg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	RCOOPO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Aniline-NH <sub>2</sub>	RSR
Ca <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	RNH <sub>2</sub>	Pyridine-N	R-phenyl
Co <sup>3+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Hg <sup>+</sup>	ROR	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CN <sup>-</sup>
Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	RN <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> S
Mn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Au <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> <sup>-</sup>

Ce concept met en évidence l'affinité entre le Cu<sup>2+</sup> et les cycles imidazoles et entre le Cu<sup>1+</sup> et les groupements sulfhydryls RSH. Ces données sont cohérentes avec les observations biologiques. Les protéines utilisant les histidines pour coordonner le cuivre sont majoritairement dans le périplasma ou extracellulaires, où le cuivre est sous forme Cu<sup>2+</sup>. En revanche, les protéines cytoplasmiques utilisent majoritairement les cystéines pour la coordination du cuivre sous forme Cu<sup>1+</sup>. Dans le cas des clusters fer-soufre le Cu<sup>1+</sup> cytoplasmique est un acide plus « mou » que le Fe<sup>2+</sup> présent dans ces clusters, par conséquent le cuivre va déplacer le fer de la protéine détruisant son activité catalytique (Solioz, 2018).

Le cuivre est également connu pour sa capacité à induire la formation de ponts disulfures. Néanmoins, il semble que ce soit la réaction de Fenton induite par le cuivre qui soit à l'origine de cette formation, comme dans le cas de la RNase A chez *E. coli* (Hiniker et al., 2005). D'autres études ont mis en évidence que le cuivre peut également inhiber la réduction d'un pont disulfure comme dans le cas de l'assemblage du cytochrome C chez *Rubrivivax gelatinosus* (Durand et al., 2015).

Enfin, il semble que ce métal entraîne un défaut de repliement rendant l'accumulation de ces protéines mal repliées toxique pour les cellules. Peu d'études se sont penchées sur ce mécanisme, mais il est probable que ce soient les propriétés précédemment décrites qui entraînent ce mauvais repliement. Chez *Staphylococcus aureus* le cuivre entraîne la surexpression des certaines protéases et de chaperonnes impliquées dans le repliement (Baker et al., 2010). Il existe aussi des problèmes d'adressage des lipoprotéines mal repliées, comme dans le cas de NlpE qui va induire un stress de membrane (May et al., 2019).

### 1.3.2. Interaction avec les membranes

Le cuivre interagit également avec les lipides des membranes. Ce métal présente une affinité importante pour certains phospholipides comme la phosphatidyléthanolamine (Poyton et al., 2016) et la phosphatidylsérine (Cong et al., 2015; Monson et al., 2012). Ces lipides sont d'importants constituants des membranes de la plupart des organismes. À titre d'exemple, la phosphatidyléthanolamine représente plus de 70% des membranes d' *E. coli*. Le cuivre forme des complexes avec ces lipides, deux têtes hydrophiles chélatant un cuivre. Ces complexes vont altérer la fluidité des membranes plasmiques (García et al., 2005; Gehman et al., 2008). Mais le cuivre piégé dans les membranes va également augmenter la concentration locale de  $\text{OH}^\cdot$ . Chez les procaryotes, où le transfert d'électron de la chaîne respiratoire a lieu dans la membrane plasmique, le cuivre (et ses conséquences) vont perturber le potentiel rédox et les transferts d'électrons (Abicht et al., 2013; Macomber et al., 2007). Les lipides polyinsaturés vont être attaqués par les radicaux libres ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{ROO}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ , etc.) mais pas par  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{O}_2^\cdot-$  (Catalá, 2010). Les métaux comme le fer et le cuivre sont donc une source importante d'oxydation des lipides via la réaction de Fenton (Dalecki et al., 2017). L' $\text{OH}^\cdot$  généré réagit avec le lipide polyinsaturé, formant un radical lipidique  $\text{L}^\cdot$ . Ce dernier étant très instable, il va réagir spontanément avec l'oxygène pour produire du  $\text{LOO}^\cdot$ , réagissant lui-même avec le LH redonnant du  $\text{L}^\cdot$  et du  $\text{LOOH}$ . De plus, le  $\text{LOOH}$  peut réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$ , réalimentant la réaction de Fenton. Cette cascade de réactions entraîne des cycles qui s'autoalimentent et donc sont difficiles à arrêter. Les cellules vont alors induire la production ou l'import d'antioxydants, comme la vitamine E, capables d'interrompre ces cascades (Ayala et al., 2014; Dalecki et al., 2017).

### 1.3.3. Autres interactions

Les interactions entre le cuivre et l'ADN ne sont pas très connues. Il semble que l'ADN ne soit pas la cible principale de ce métal ou de ses conséquences. L'article Macomber et al., 2007, montre que la présence de cuivre ne provoque pas d'augmentation des dommages à l'ADN chez *E. coli*, même en présence d'un excès d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour accentuer les réactions de Fenton. Le métal est probablement intercepté par l'importante quantité de cibles et de défenses avant de pouvoir interagir avec l'ADN intracellulaire. Mais il est possible que l'ADN ait d'autres interactions avec le cuivre. En effet, nous savons que le cuivre a une forte affinité pour l'ADN (Sagripanti et al., 1991), et que les bactéries l'utilisent pour la formation de biofilms (Whitchurch et al., 2002). Teitzel and Parsek, 2003 ont montré que chez *Pseudomonas aeruginosa* la formation du biofilm entraîne une augmentation de la résistance au cuivre de près de 600 fois. Il est probable que le biofilm réduit fortement l'accès du cuivre aux bactéries, ce qui expliquerait en bonne partie cet effet. De plus, l'ADN et les autres molécules présentes dans le biofilm chélatent sûrement une part importante des métaux lourds susceptibles d'être délétères à la bactérie (Dalecki et al., 2017).

Le cuivre interagit aussi avec de nombreuses autres molécules. Par exemple, les sidérophores à base de catéchols causent la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  (Grass et al., 2004). D'autres agents réducteurs semblent délétères chez les bactéries. Les quinones, comme la ménaquinone (Vitamine K) et l'ubiquinone (Coenzyme Q) présentes dans les membranes plasmiques ont pour fonction le transfert d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire dans des conditions aérobies ou entre les complexes permettant la respiration en conditions anaérobies (respiration sur les composés azotés). Ces quinones semblent impliquées dans la réduction du cuivre et donc dans la toxicité de ce métal (Abicht et al., 2013; Dalecki et al., 2017; Volentini et al., 2011).

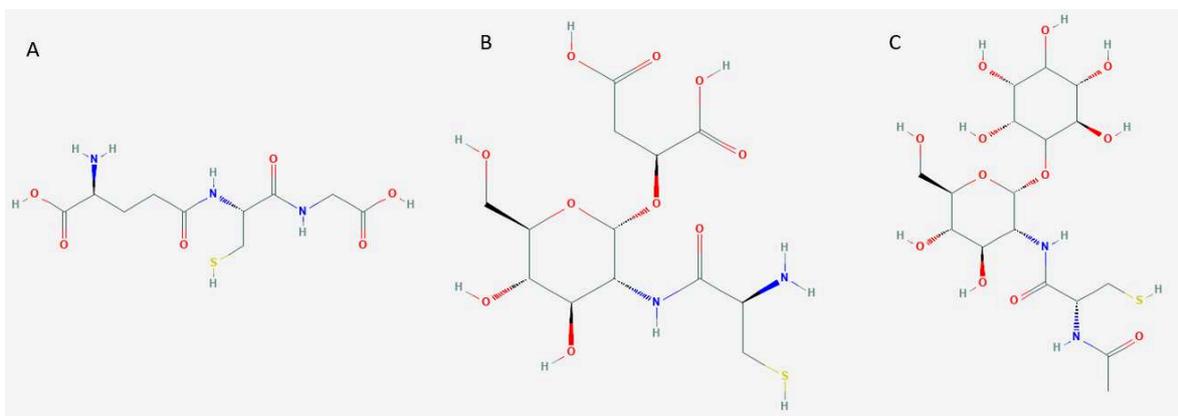


Figure 4 : Représentation semi-développée des trois thiols majeurs du vivant sous leurs formes réduites. A : glutathion ; B : bacillithiol ; C : mycothiol. Source : PubChem

Enfin, un métabolite important ayant une interaction majeure avec le cuivre est le glutathion. Ce dernier est essentiel chez les eucaryotes ainsi que chez la plupart des procaryotes (Forman et al., 2009). Chez certaines bactéries à Gram positif, le glutathion est remplacé par le bacillithiol (Chandrangsu et al., 2018) ou dans le cas des *Actinomycètes*, par des mycothiols (Newton et Fahey, 2002). Le glutathion (GSH) et le glutathion disulfide (GSSG) sont les deux membres du couple rédox le plus important du cytoplasme pour maintenir un potentiel réducteur, notamment du cytoplasme bactérien (Schafer and Buettner, 2001). La forme réduite GSH est prédominante dans le cytoplasme. Le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  est réduit par le GSH formant du GSSG, diminuant le pool de thiols réduits dans le cytoplasme (Solioz, 2018). De plus, le  $\text{Cu}^{1+}$  forme des complexes avec le GSH, ce qui diminue encore le pool de glutathion réduit libre et maintient une population de  $\text{Cu}^{1+}$  dans le cytoplasme (Pederson et al., 1996; Solioz, 2018). Le rôle de ce cuivre complexé n'est pas clairement défini. Dans le cas de *L. lactis* le complexe GS-Cu-SG semble être une source de destruction des clusters fer-soufre en conditions anaérobies (Obeid et al., 2016). Néanmoins, dans la plupart des cas décrits, le GSH semble plutôt jouer un rôle majeur dans la tolérance envers le cuivre (Helbig et al., 2008).

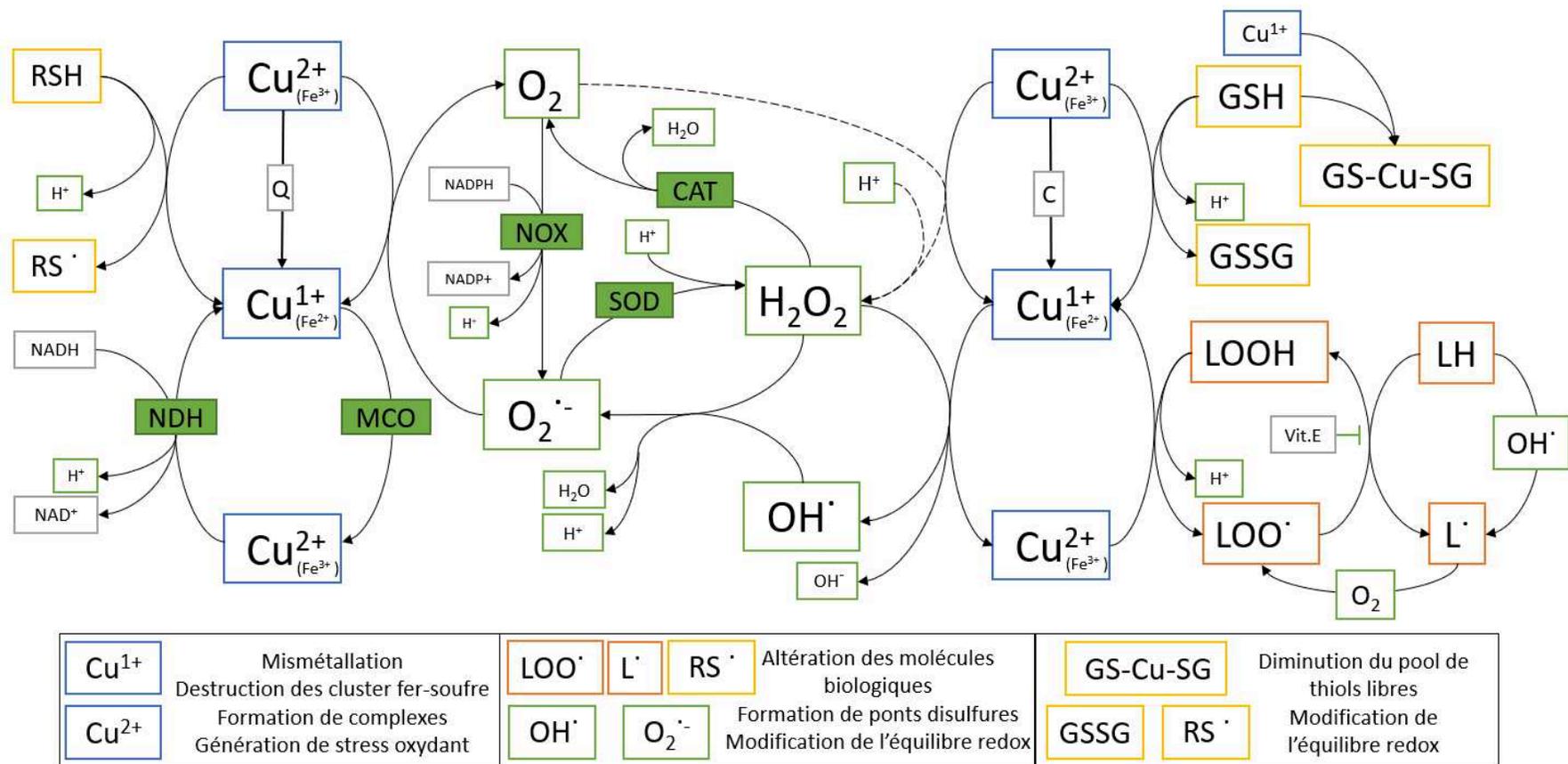


Figure 5 : Synthèse des réactions d'oxydoréduction impliquant directement ou indirectement le cuivre dans un contexte biologique. Les cases sans remplissage représentent des molécules simples. Les cases pleines représentent des protéines. Les cases vertes représentent les espèces chimiques impliquées dans les réactions de Fenton et de Haber-Weiss. Les cases bleues représentent les transitions d'états du cuivre. Les cases jaunes représentent les interactions avec les thiols. Les cases orange représentent les interactions avec les lipides. Les cases grises représentent différents métabolites ayant un rôle dans ces cycles. Les flèches en pointillés représentent des réactions supposées mais jamais caractérisées. NOX : NADPH oxydase qui est l'enzyme eucaryote responsable du Burst oxydatif chez les cellules phagocytaires ; MCO : Multicopper oxydase ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; NDH : NADH déshydrogénase qui est une enzyme du complexe 1 de la chaîne respiratoire produisant un excès d'électron provoquant la réduction du cuivre ; C : catéchols ; Q : quinones (vit.K et CoenzymeQ) ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : dimère de glutathion oxydé ; LH : lipide polyinsaturé ; L<sup>•</sup> : radical lipidique ; LOOH : hydroperoxyde lipidique ; LOO<sup>•</sup> : radical peroxyde lipidique ; OH<sup>•</sup> : radical hydroxyle ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde ; OH<sup>-</sup> : hydroxyle ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène ; RSH : thiols ; RS<sup>•</sup> : Radical thiyil .

## 1.4. L'homéostasie du cuivre

### 1.4.1. Chez les procaryotes

#### 1.4.1.1. Importation

Chez les bactéries à Gram positif, l'homéostasie du cuivre a particulièrement été étudiée chez quelques organismes modèles comme *Enterococcus hirae* et *Lactococcus lactis*. Les connaissances actuelles se concentrent sur la « défense » vis-à-vis de ce métal. En effet, très peu de recherches portent sur son importation. Certains articles tendent à montrer que le cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  est capable de traverser les membranes plasmiques contrairement au  $\text{Cu}^{2+}$  (Abicht et al., 2013). Il est donc envisageable que cette source de cuivre suffise aux bactéries.

Chez les bactéries à Gram négatif, l'importation du cuivre est mieux connue. Deux systèmes ont fait l'objet de caractérisation chez *E. coli* et chez les bactéries méthanotrophes.

Certaines souches d' *E. coli* pathogènes produisent un sidérophore particulier, la yersiniabactine. Cette dernière fut décrite chez *Yersinia pestis* mais son étude chez *E. coli* a mis en évidence que cette molécule pouvait lier le cuivre et l'importer comme source de nutriment (Koh et al., 2017). Néanmoins, son interaction avec le cuivre a d'abord été décrite comme facteur de résistance au cuivre (Chaturvedi et al., 2012). La yersiniabactine complexée à un métal de transition est importée par le transporteur TonB-dépendant FyuA à travers la membrane externe puis par l'ABC transporteur YbtPQ au travers de la membrane interne. Une fois dans le cytoplasme, le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  va être réduit en  $\text{Cu}^{1+}$ , provoquant la dissociation de celui-ci de la yersiniabactine qui pourra être à nouveau sécrétée (Solioz, 2018).

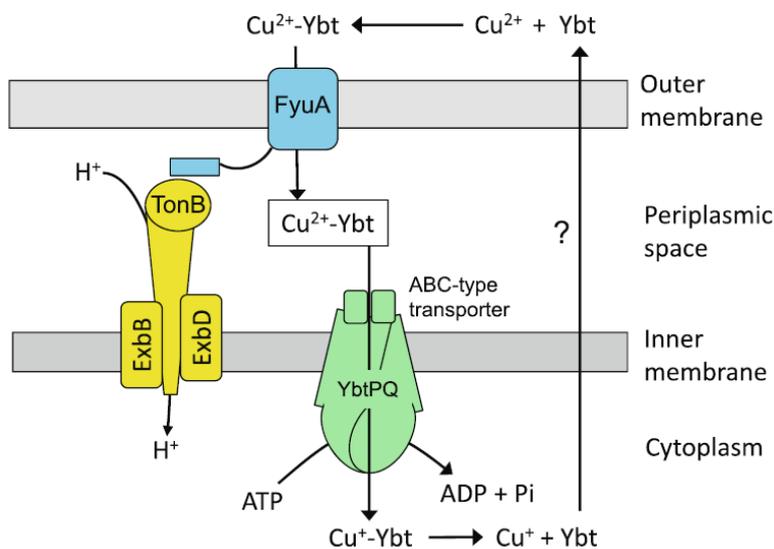
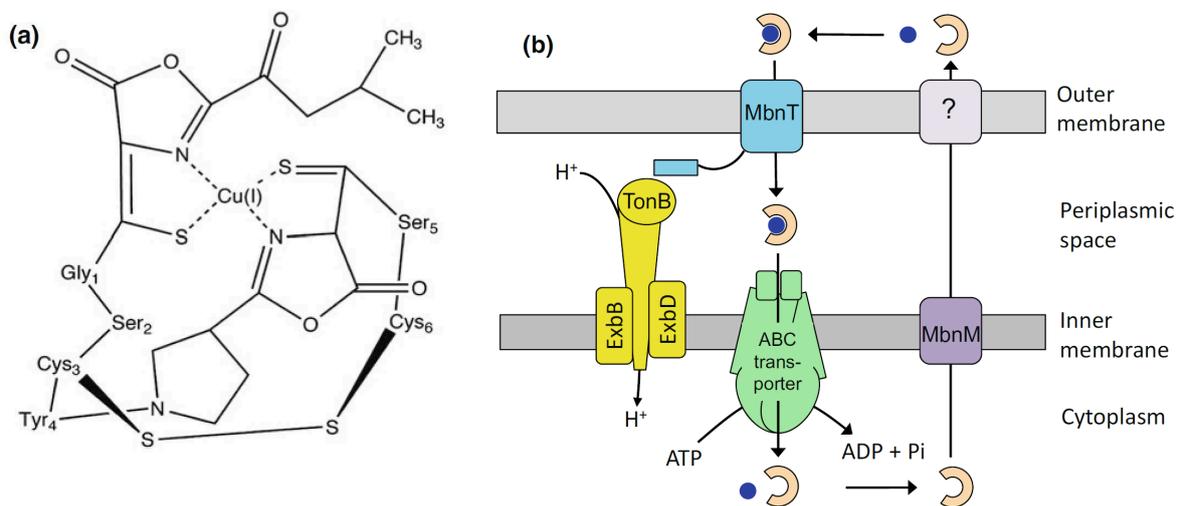


Figure 6 : Représentation schématique des interactions et des mécanismes de transport du complexe cuivre-yersiniabactin. Source : (Solioz, 2018).

Néanmoins, le mécanisme de dissociation n'est pas clair, car les travaux du groupe de Jeffrey P. Henderson présentés lors du 11<sup>ème</sup> *Copper meeting* à Sorrento en 2018 indiquent que le complexe métal-Ybt déclenche des régulations différentes en fonction de la nature du métal. Pour interagir avec le régulateur YbtA, il semble nécessaire que le complexe reste stable même dans le cytoplasme. Ces travaux mettent en évidence que l'importation de Fe<sup>3+</sup> via la Ybt entraîne une répression du système, tandis que la présence de Cu<sup>2+</sup> dans le complexe entraîne une surexpression. Il est probable que la présence d'une importante concentration de Ybt dans le milieu entraîne une diminution du cuivre libre et donc protège la bactérie.

Chez les méthanotrophes, la production des chalcophores (chalko=cuivre) permet l'alimentation en cuivre de la méthane monooxygénase. Pour cela les bactéries comme *Methylosinus trichosporium* (Sullivan et al., 1998), produisent une petite molécule ayant pour fonction la captation et l'importation du cuivre : la méthanobactine. Cette dernière est un petit peptide de 8 à 10 acides aminés codé par le gène *mbtA*, synthétisé par la voie ribosomale et qui subit des modifications post-traductionnelles par plusieurs enzymes (Kim et al., 2004). Le processus de sécrétion de la méthanobactine n'est pas complètement connu. En revanche, le système de réimportation est décrit : le transporteur Tonb-dépendant MbnT permet d'importer le complexe méthanobactine-metal dans le périplasma puis ce complexe sera pris en charge par un ABC transporteur (Balasubramanian et al., 2011; DiSpirito et al., 2016).



*Figure 7 : (a) Représentation semi développée de la méthanobactine et de sa coordination du cuivre. (b) Représentation schématique des interactions et des mécanismes de transport du complexe cuivre-méthanobactine. Source : Solioz, 2018 inspiré de Balasubramanian et al., 2011*

Un système proche a été décrit chez une bactérie à Gram positif, *Streptomyces thioluteus*. Il s'agit d'un opéron de biosynthèse d'une petite molécule : SF2768. Il a été montré que cette molécule est capable de se lier de manière spécifique au cuivre et d'être réimportée par un ABC-transporteur (Wang et al., 2017).

Ces systèmes demeurent les plus décrits actuellement mais il existe d'autres systèmes d'import encore peu caractérisés. Chez *Pseudomonas* on trouve un système complet NosADFYLYX permettant l'importation du cuivre jusqu'à NosZ, qui est la Nitrous oxide réductase (Wunsch et al., 2003). Au sein du genre *Pseudomonas* on trouve également deux protéines CopC et CopD qui semblent impliquées dans l'importation et la séquestration du cuivre dans le cytoplasme, mais actuellement leur rôle n'est pas caractérisé (Cha and Cooksey, 1993; Cooksey, 1994). Ces protéines sont également présentes dans les bactéries méthanotrophes mais il semble qu'elles ne soient pas impliquées dans l'importation de cuivre pour la méthane monooxygénase (Gu et al., 2017).

Enfin, il existe également la protéine CcoA qui appartient à la famille des « major facilitator superfamily » (MFS). Cette protéine est décrite comme impliquée dans l'importation du cuivre du périplasme vers le cytoplasme (Ekici et al., 2012). CcoA va importer le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ , qui sera réduit par la cuprique réductase CcoG (Marckmann et al., 2019) puis chélaté par la chaperonne CopZ (Utz et al., 2019). CopZ le transfère à l'ATPase CcoI (CtpA chez *Rubrivivax gelatinosus*) (Hassani et al., 2010; Utz et al., 2019) qui l'exporte vers le périplasme pour le donner à deux chaperonnes, PccA et SenC (Trasnea et al., 2018), permettant l'intégration du métal dans la cytochrome C oxydase cbb3.

#### 1.4.1.2. ATPases

Les ATPases à cuivre font toutes partie des ATPases de type P<sub>1</sub>B. Cette famille se caractérise par l'utilisation particulière de l'ATP : l'enzyme va utiliser le phosphate-γ de l'ATP pour s'autophosphoryler sur le groupe carboxyle de la chaîne latérale d'un résidu aspartate. Cette liaison covalente sera ensuite rompue afin de fournir l'énergie au transport du métal, c'est à dire son exportation du cytoplasme (Pedersen, 2007; Solioz, 2018). Les P<sub>1</sub>B ATPases sont spécialisées dans le transport des métaux lourds. Ces ATPases sont généralement composées de 8 hélices transmembranaires et présentent un site de liaison aux métaux (MBS) dans leur partie N-terminal flottant dans le cytoplasme (Purohit et al., 2018).

Chez les bactéries à Gram positif, il existe deux types d'ATPases à cuivre : les P<sub>1</sub>B-1 (ou CopA) qui sont les plus courantes et les P<sub>1</sub>B-3 (ou CopB) qui sont très rares. Par exemple, on trouve ces deux ATPases chez *Enterococcus hirae*. Les P<sub>1</sub>B-1 présentent un MBS constitué d'un à six domaines quasi identiques à la chaperonne CopZ avec son site de liaison caractéristique CXXC. À contrario, les P<sub>1</sub>B-3 ne présentent pas ce genre de motif mais sont très riches en histidines (15 dans le cas d'*E. hirae*), mais aucune étude n'a pour le moment mis en évidence la coordination du cuivre par ces résidus (Solioz, 2018). Les P<sub>1</sub>B-ATPases sont divisées en 7 sous-catégories définies par des motifs conservés dans les segments transmembranaires 4 et 6. En raison de ces motifs les ATPases à cuivre sont souvent nommées CPx-ATPases, en effet, parmi les différentes P<sub>1</sub>B-ATPases, toutes celles qui transportent du cuivre possèdent un motif CPx dans l'hélice transmembranaire 6 (Purohit et al., 2018). Par exemple, les P<sub>1</sub>B-1 ont le motif CPC et les P<sub>1</sub>B-3 ont un motif CPH.

Les ATPases à cuivre sont omniprésentes chez les bactéries. Elles constituent un des mécanismes majeurs de l'homéostasie du cuivre.

### 1.1.1.1. Chaperonnes et stockage

Il existe des chaperonnes à métaux, ou metallochaperonnes, dans tous les organismes et pour divers ions métalliques. La première chaperonne à cuivre a été découverte chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et se nomme ATX1 de par son rôle secondaire de détoxifiant des stress oxydants (Lin and Culotta, 1995). Chez les procaryotes, c'est chez *Enterococcus hirae* que la chaperonne à cuivre CopZ a été découverte en premier (Odermatt and Solioz, 1995). Jusqu'à récemment *E. coli* semblait faire exception, n'ayant pas d'homologue à CopZ. Mais l'article Drees et al., 2017 a mis en évidence qu' *E. coli* possède bien une chaperonne CopZ dont le gène est inclus dans le gène de l'ATPase CopA (Drees et al., 2017).

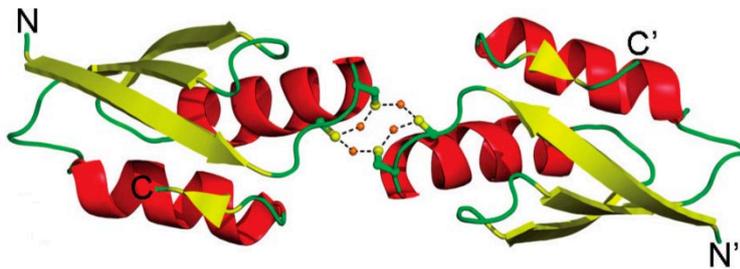
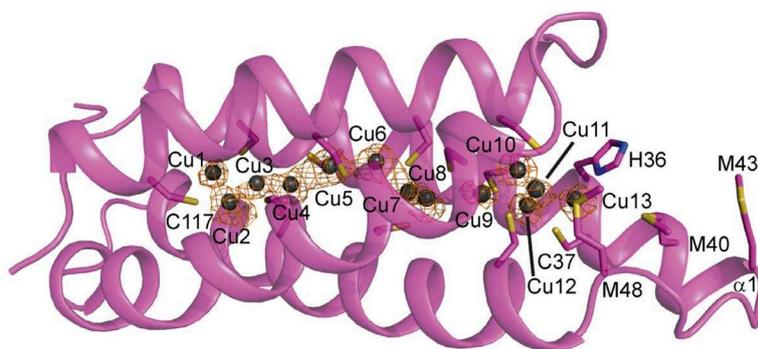


Figure 8 : Structure 3D d'un dimère de CopZ de *Bacillus subtilis* chélatant 4 atomes de cuivre. PDB : 2QIF. Source : Hearnshaw et al., 2009

Les protéines homologues à CopZ sont présentes dans presque tous les organismes. Il s'agit de petites protéines de 7-8 kDa avec un repliement de type  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  et dont le motif de liaison au cuivre est CXXC (Hearnshaw et al., 2009; Robinson and Winge, 2010; Wimmer et al., 1999). Cette structure et ce motif sont très conservés au cours de l'évolution, des bactéries aux mammifères, en passant par la levure (Hatori and Lutsenko, 2013). Les études actuelles tendent à montrer plusieurs rôles de CopZ. Sa principale fonction décrite chez les bactéries à Gram positif est son implication dans la tolérance et l'homéostasie du cuivre. Lors de l'entrée du métal dans la cellule bactérienne, CopZ va chélater le cuivre permettant dans un premier temps la passivation du métal de façon à ce qu'il n'interagisse pas avec d'autres protéines (Corbett et al., 2011). Puis la chaperonne va délivrer le cuivre aux ATPases d'export permettant l'efflux du métal (Kay et al., 2017). Ces propriétés ont également été montrées chez les bactéries à Gram négatif. Mais chez ces dernières, CopZ joue aussi un rôle crucial dans la métallation des protéines de la chaîne respiratoire, en fournissant du cuivre à un transporteur spécifique qui le délivre à une metallochaperonne périplasmique pour son incorporation dans des cuproprotéines de complexes respiratoires (Trasnea et al., 2018; Utz et al., 2019). Enfin plusieurs études supposent le rôle de passivation par chélation du cuivre cytoplasmique (Changela et al., 2003; Corbett et al., 2011; Dalecki et al., 2017).

La chaperonne CopZ n'est pas la seule à pouvoir détoxifier le cuivre cytoplasmique par « passivation ». Chez les mycobactéries, on trouve la protéine MymT qui est proche des métallothionéines eucaryotes. Cette protéine est capable de fixer 6 atomes de cuivre et est impliquée dans la tolérance au cuivre (Gold et al., 2008).

On trouve également des « Copper storage protein » (Csp) chez de nombreuses bactéries. Ces protéines sont composées de 4 hélices alpha en paquet qui renferment des motifs très riches en cystéines permettant la chélation d'un très grand nombre d'atomes de cuivre (Dennison et al., 2018). On trouve ces protéines dans le périplasma (Csp1/2) ou le cytoplasme (Csp3) (Dennison et al., 2018). Ces protéines sont impliquées dans la tolérance au cuivre tout en constituant un stock du métal pour des besoins ultérieurs (Vita et al., 2015).



*Figure 9: Structure 3D d'une CSP1 de Methylosinus trichosporium. PDB : 5AJF. Source : Vita et al., 2015*

Il existe également d'autres chaperonnes comme CupA chez *Streptomyces pneumoniae* (Fu et al., 2013) qui a la particularité d'être associée à la membrane plasmique et dont la délétion provoque une sensibilité extrême au cuivre.

Enfin le meilleur exemple d'une chaperonne impliquée dans la tolérance au cuivre est la protéine CueP chez *Salmonella enterica* : elle est essentielle à la survie de cette bactérie en condition d'excès de cuivre (Subedi et al., 2019).

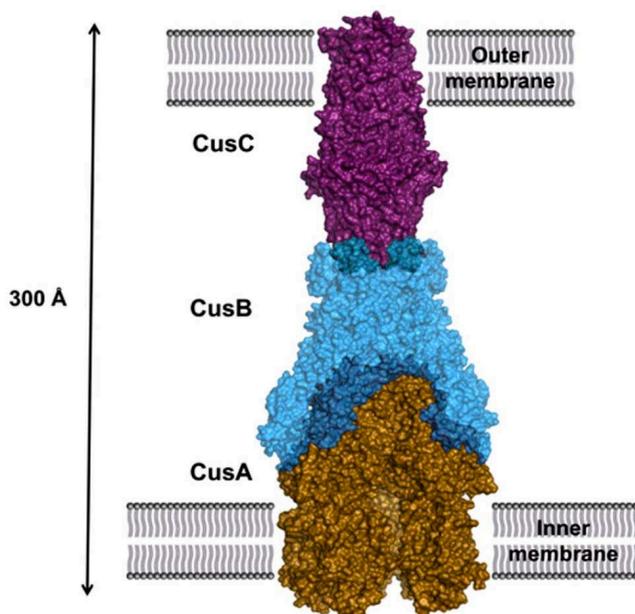
Il existe également des chaperonnes qui n'ont aucun rôle dans la tolérance au métal mais ont seulement un rôle bien spécifique dans le transport du cuivre vers une protéine. Par exemple, les chaperonnes périplasmiques PccA et SenC participent à l'assemblage de la cytochrome C oxydase (Trasnea et al., 2018).

### 1.1.1.2. Systèmes Cus de la famille RND

Les transporteurs **RND** (**R**esistance-**N**odulation-cell-**D**ivision) sont des complexes protéiques spécifiques des bactéries à Gram négatif (Delmar et al., 2015). Ils ont la particularité de connecter les deux membranes, interne et externe, permettant l'exportation de composés périplasmiques en utilisant la force proton motrice. Ces transporteurs se composent de trois types de protéines : une protéine de membrane interne, un adaptateur périplasmique et une protéine de membrane externe. Il existe différents types de RND, les HAE et les HME.

Les **HAE** (**H**ydrophobic and **A**mphiphilic **E**fflux) sont des systèmes d'efflux de nombreuses molécules et particulièrement d'antibiotiques. C'est le cas de AcrB (Yu et al., 2003), AcrD (Aires and Nikaido, 2005) ou YhiV (Kobayashi et al., 2001). Les **HME** (**H**eavy **M**etal **E**fflux) permettent l'efflux des cations métalliques comme dans le cas de CzcA, exportant les ions divalents du cadmium et du zinc (Nies et al., 1989).

Ici, nous nous intéresserons au système CusCFAB. Le premier gène identifié fut CusA par sa similarité avec la protéine SilA qui est un membre d'un RND d'exportation de l'argent chez *Salmonella* (Gupta et al., 1999). CusA est la protéine de membrane interne, CusC est la protéine de membrane externe et CusB est l'adaptateur les connectant (Delmar et al., 2015). La formation du complexe implique 3 CusA, 6 CusB et 3 CusC.



*Figure 10 : Représentation schématique de l'assemblage des éléments CusABC connectant les deux membranes. Source : Delmar et al., 2015*

Le cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  est pris en charge au niveau périplasmique par la protéine CusA. La coordination périplasmique du cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  est principalement assurée par des méthionines (Jiang et al., 2005). Le métal va alors transiter de motif en motif à travers CusA, CusB et CusC pour être expulsé à l'extérieur de la cellule (Delmar et al., 2015).

L'une des particularités de ce système est la présence d'une métallochaperonne périplasmique dévolue à l'accompagnement du métal lors de son transit dans le périplasme. Cette chaperonne, CusF, est une petite protéine possédant une affinité spécifique pour le cuivre et l'argent sous leurs formes monovalentes (Kittleson et al., 2006). Il semble que deux méthionines et une histidine constituent le motif de coordination du métal (Loftin et al., 2007). Cette métallochaperonne permet de maintenir le cuivre  $\text{Cu}^{1+}$  chélaté en vue de son extrusion. En effet, le cuivre cytoplasmique est pris en charge par la chaperonne cytoplasmique CopZ qui va le transférer à l'ATPase CopA (Multhaup et al., 2001). Cette dernière va à son tour le transférer à CusF (Padilla-Benavides et al., 2014), qui le donnera à CusA pour l'extrusion finale via CusB et CusC (Delmar et al., 2015).

### 1.1.1.3. *Multicopper-oxydases*

Les multicopper oxidases forment une famille de protéines qui catalysent diverses réactions d'oxydation (Kaur et al., 2019). De ce fait, ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de sporulation (Driks, 2004), de morphogénèse et de dénitrification chez les bactéries, mais elles ont bien d'autres rôles chez les eucaryotes, comme la dégradation de la lignine (Tarhan and Tongul, 2017) et l'importation du fer chez les champignons (Stoj et al., 2006), la formation de la cuticule chez les insectes (Dittmer and Kanost, 2010) ou encore la synthèse de la lignine et de l'ascorbate chez les plantes (Turlapati et al., 2011). Comme leur nom l'indiquent, elles portent plusieurs ions cuivre dans leur site actif.

La céruloplasmine fait partie de la famille des multicopper-oxydases, et elle est essentielle à l'homéostasie du fer chez l'humain. Nous en ferons une brève description car cette protéine eucaryote joue un important rôle dans la relation hôte-pathogène. Cette protéine présente une activité ferroxidase permettant d'oxyder le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ . Ce dernier va donc pouvoir être chélaté par la ferritine et la transferrine. Cette activité présente deux fonctions majeures. La première est la diminution du fer disponible. En effet le cuivre biodisponible dans le sang chez l'humain est maintenu à une concentration proche de  $10^{-17}$  M grâce à ces mécanismes, permettant d'entraver la croissance des microorganismes pathogènes. En effet, la croissance des bactéries nécessite une concentration de l'ordre de  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M en fer (Braun and Killmann, 1999). En parallèle, l'oxydation du fer va empêcher ce dernier de déclencher des réactions de Fenton et de Haber-Weiss et va donc diminuer la

formation de radicaux oxygénés (Kaur et al., 2019). Au-delà de ces fonctions enzymatiques, la céruloplasmine est le transporteur principal de cuivre dans le sang (Linder, 2016). Il existe de nombreuses autres multicopper oxidases ayant une activité de ferroxidase chez différents organismes. Par exemple, Fet3p chez *Saccharomyces cerevisiae* est essentiel à l'importation du fer (Stoj et al., 2006), tout comme Cfo1 chez *Cryptococcus neoformans* (Jung et al., 2009) mais on trouve également des ferroxidases chez les bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (Huston et al., 2002), etc.

Les laccases forment la deuxième grande famille de multicopper-oxidases. Chez les bactéries et les champignons, leur fonction la mieux décrite est la biosynthèse des pigments de type mélanine (Eisenman et al., 2007; Hullo et al., 2001) par l'oxydation de composés phénoliques (Kaur et al., 2019). Ces pigments permettent l'adaptation des microorganismes à leur environnement. Dans le cas de *Bacillus subtilis*, il a été montré que la délétion de la laccase CotA entraîne une perte de formation du pigment doublé d'une hyper sensibilité aux UV et à l' $H_2O_2$  (Hullo et al., 2001). Chez les champignons, les laccases sont également à l'origine de la synthèse de certaines molécules antibiotiques, comme l'acide hydroxyanthranilique actif sur les bactéries du genre *Streptococcus* (Eggert et al., 1998)

Enfin, le rôle qui nous intéresse ici, est l'implication de cette famille de protéines dans l'oxydation et l'homéostasie du cuivre. Ces multicopper-oxydases sont appelées « pseudo-laccases » (Kaur et al., 2019). Comme nous l'avons vu précédemment, le cuivre présente de nombreux risques pour les bactéries et va donc être éliminé du cytoplasme par l'ATPase CopA sous forme  $Cu^{1+}$ . En parallèle, la chaîne respiratoire provoque la réduction accidentelle du cuivre directement ou indirectement (par la génération de  $O_2^{\cdot-}$ ). Ce  $Cu^{1+}$  toxique va se faire expulser par le RND CusCFBA, mais ce système ne permet pas une protection totale, en particulier dans le cas d'un apport exogène de  $Cu^{1+}$  dans les phagolysosomes des cellules phagocytaire. Pour se défendre, les bactéries ont recours à ces multicopper-oxidases qui ont la capacité de coordonner le  $Cu^{1+}$  grâce à un domaine riche en méthionines afin de l'oxyder en utilisant de l'oxygène. Chez *E. coli*, il existe deux multicopper-oxydases présentant ce fonctionnement : CueO qui est codée par un gène chromosomique et PcoA qui est plus souvent issue de plasmides médiant la résistance au cuivre (Djoko et al., 2008; Grass and Rensing, 2001). Ces enzymes accroissent la résistance des bactéries au stress cuivrique. Il semble qu'un des mécanismes est l'inhibition du stress oxydant issu des réactions de Fenton dûes au cuivre. En effet, l'utilisation d'un suppresseur d'anion superoxyde, l'acide 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonique (Tiron), diminue la sensibilité au cuivre d'un mutant de délétion de CueO (Tree et al., 2005). Mais il semble que d'autres mécanismes soient mis en jeu dans cette résistance. Ces protéines sont capables d'oxyder certains substrats comme les catéchols, dont font partie les sidérophores de type entérobactine. L'oxydation de ces sidérophores entraîne la production d'un pigment de type mélanine permettant une résistance accrue au stress oxydant et également capable de lier le cuivre sous la forme  $Cu^{2+}$  après réduction par la MCO (Grass et al., 2004).

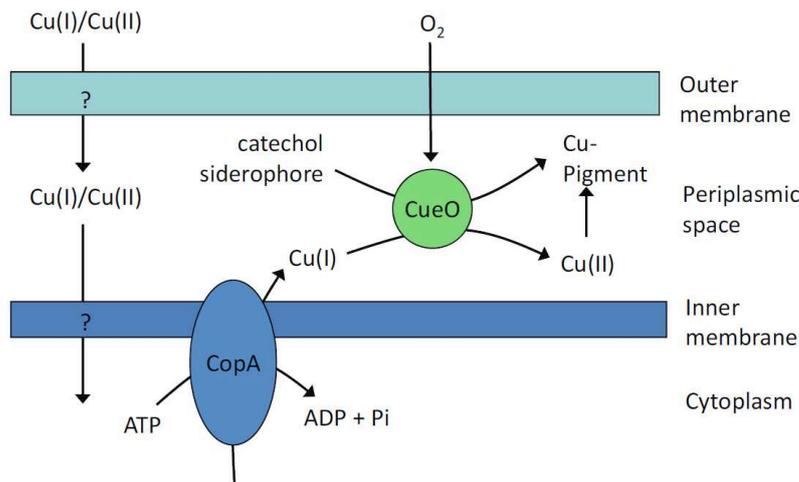


Figure 11: Représentation schématique des fonctions de la multicopper oxidase CueO. Source : Solioz, 2018

Les MCO ne sont pas à l'origine de l'importation ni de l'exportation du cuivre mais jouent un rôle capital dans la tolérance à ce métal en minimisant sa toxicité. Ce système est même essentiel à la virulence de nombreux organismes pathogènes comme *Salmonella enterica* (Achard et al., 2010) ou *Campylobacter jejuni* (Hall et al., 2008) qui sont soumis à des excès de cuivre dans les cellules phagocytaires.

#### 1.1.1.4. Régulateurs

Nous avons pu voir que le cuivre est un métal essentiel mais également toxique. Il est donc nécessaire de maintenir un équilibre homéostatique très strict. C'est grâce à une série de régulateurs susceptibles de réagir directement ou indirectement au cuivre que les bactéries doivent ce maintien de l'homéostasie.

Chez les bactéries à Gram positif, les régulateurs les plus décrits appartiennent à la famille CopY (Strausak and Solioz, 1997), présente chez presque tous les *Firmicutes*. Il s'agit d'un système à un composant ayant à la fois la capacité de senseur et de régulateur. En absence de cuivre, ce régulateur est porteur d'un ion Zn<sup>2+</sup>. Dans cette configuration le régulateur dimérise et acquiert une affinité importante pour un motif particulier de l'ADN, TACAnnTGTA (Cantini et al., 2009). Cette liaison entraîne la répression des gènes dont la région opératrice porte ce motif. Dans le cas d'un excès de cuivre, la chaperonne CopZ porteuse de cuivre sous forme Cu<sup>1+</sup> va interagir directement avec le régulateur pour lui transférer son cuivre tout en déplaçant le zinc, entraînant une monomerisation du régulateur et une perte d'affinité pour l'ADN (Cobine et al., 1999, 2002; Lu and Solioz, 2001). Ce processus va donc entraîner une perte de répression. Le site de liaison au cuivre peut coordonner 2 atomes de cuivre grâce à son motif CxCxxxxCxC (Cobine et al., 2002). Chez

*Lactococcus lactis* (où CopY se nomme CopR) cette protéine assure la régulation de plusieurs gènes comme ceux de la chaperonne CopZ et de l'ATPase CopA, mais aussi des gènes de systèmes de défense indirects envers le cuivre. Par exemple la lactate oxydase, qui métabolise le lactate en pyruvate en consommant du dioxygène, est déréprimée en présence de cuivre. Barré et al., (2007) suggèrent que la diminution de la concentration d'oxygène permettrait de minimiser le stress oxydatif induit par le cuivre. Ce régulateur entraîne la dérégulation de plusieurs autres systèmes que nous ne décrivons pas ici (Solioz, 2018).

Chez certaines bactéries à Gram positif (par exemple *L. monocytogenes*, *S. aureus*, etc.) il existe un autre régulateur à un composant, CsoR. Ce dernier est un répresseur qui perd sa capacité de répression après liaison du cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  (Fu et al., 2014). Cette protéine régule l'expression des gènes *csoR* et *cptV* codant respectivement le régulateur et l'ATPase d'exportation du cuivre chez ces bactéries (Rademacher and Masepohl, 2012). Chez d'autres bactéries, il régule également l'expression du gène *copZ*. Dans la même famille de régulateurs, on trouve également RicR, identifié chez *M. tuberculosis*. Cette protéine régule MymT (protéine de séquestration du cuivre) et LpqS (qui serait un système d'exportation) (Festa et al., 2011).

CopL est un régulateur spécifique codé sur un plasmide présent dans le genre *Xanthomonas*. Cette protéine est riche en cystéines et histidines, suggérant une interaction directe avec le cuivre, mais peu d'études se sont intéressées à ce régulateur. Il régule deux gènes présents sur le plasmide, *copA* et *copB* (Voloudakis et al., 2005). Ces noms ne correspondent pas à la nomenclature habituelle. Ici CopA est une multicopper oxidase et on ne connaissait pas d'homologues de CopB au moment de cette étude. Néanmoins, un alignement de séquences permet de mettre en évidence des homologies avec la protéine PcoB de *Caulobacter crescentus* (Lawarée et al., 2016) qui semble être un système d'extrusion du cuivre. Chez *C. crescentus*, le gène de PcoB est également précédé de celui codant pour une multicopper oxidase appelée PcoA.

Chez les Cyanobactéries, on trouve un régulateur de type ArsR, BxmR. Il s'agit d'un répresseur à un composant régulant l'expression des gènes *bxa1* et *btmA*, codant respectivement une ATPase d'export du cuivre et une protéine similaire à une métallothionéine séquestrant le cuivre via des domaines riches en cystéines (Liu et al., 2004). BxmR forme un dimère pouvant lier 4 atomes de cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$ . Cette protéine possède un second site de liaison pour le  $\text{Zn}^{2+}$  du côté C-terminal. La fonction de ce second site n'est pas connue (Liu et al., 2008).

Il existe un facteur sigma de 'fonction extracytoplasmique' (ECF) chez *Myxococcus xanthus* sensible au cuivre, CorE. Ce dernier semble lier à la fois le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{1+}$ . Le complexe CorE- $\text{Cu}^{1+}$  ne présente pas de liaison à l'ADN seul le complexe avec le  $\text{Cu}^{2+}$  se lie.

Cette protéine régule l'expression d'une multicopper oxidase et d'une ATPase d'export (Gómez-Santos et al., 2011).

Chez les bactéries à Gram positif comme *E. hirae*, on trouve également un régulateur de type TetR, ComR. Ce dernier régule l'expression de la protéine ComC, protéine de membrane qui semble impliquée dans la tolérance au cuivre. Néanmoins, les mécanismes d'interaction de ComC et ComR avec le cuivre n'ont pas encore été elucidés (Solioz, 2018).

Toujours dans les interactions non décrites, il semble que chez *E. coli* un régulateur de type MarR soit sensible au cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) par oxydation de ses cystéines. Ce régulateur est impliqué dans la résistance aux antibiotiques (Hao et al., 2014).

Chez les bactéries à Gram négatif et plus particulièrement les protéobactéries, il existe un système à un composant à la fois senseur et régulateur, CueR. Ce régulateur fait partie de la famille MerR, principalement connue pour réguler l'homéostasie des métaux. Le premier fut décrit pour le mercure, expliquant le nom de la famille. CueR est un activateur transcriptionnel. Il possède un domaine N-terminal de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation au milieu de la protéine et enfin un domaine C-terminal de liaison au cuivre (Rademacher and Masepohl, 2012). Chez *E. coli*, il a été montré que le métal est coordonné par une boucle contenant deux cystéines très conservées. De plus, la présence d'une sérine ou d'une cystéine un peu en amont permet la sélection des métaux (Ibáñez et al., 2015). Par exemple, dans le cas de CueR, c'est une sérine qui permet de sélectionner le cuivre monovalent. Yamamoto and Ishihama, 2005 ont mis en évidence le site de liaison à l'ADN du régulateur CueR, ce motif est CCTTCCnnnnnnnGGAAGG. Dans le cas d' *E. coli*, CueR induit l'expression de CopA (ATPase) et de CueO (MCO). Chez *P. aeruginosa*, CueR régule l'ATPase CopA<sub>1</sub>, le système CusABC, et les deux chaperonnes CopZ<sub>1</sub> et CopZ<sub>2</sub> (Quintana et al., 2017). Chez *Salmonella enterica* le système CusABC n'existe pas mais il existe une chaperonne périplasmique CueP jouant un rôle capital dans la tolérance au cuivre, qui est sous la régulation de CueR, tout comme l'ATPase CopA et la MCO CuiD (Espariz et al., 2007; Rademacher and Masepohl, 2012).

Enfin, le dernier système majeur de régulation de l'homéostasie du cuivre est le système CusRS (ou CopRS). Il s'agit d'un système à deux composants comprenant un senseur kinase transmembranaire (CusS) et un régulateur cytoplasmique se liant à l'ADN sur un motif AAAATGACAAnnTTGTCATTTT après phosphorylation (CusR) (Yamamoto and Ishihama, 2005). Ce système de régulation est très présent chez les proteobactéries mais il existe un représentant chez une bactérie à Gram positif, *Corynebacterium glutamicum* (Rademacher and Masepohl, 2012). Chez *E. coli* ce système de régulation module l'expression du transporteur RND CusCFBA permettant l'extrusion de cuivre à partir du périplasma (Yamamoto and Ishihama, 2005). Chez *P. aeruginosa*, CopRS régule l'expression de PcoA

(MCO), PcoB (système d'extrusion) et de différentes autres protéines impliquées dans la tolérance au cuivre (Quintana et al., 2017).

En parallèle de ces différents systèmes de régulation, il en existe d'autres qui ne réagissent pas directement au cuivre mais plutôt aux conséquences de celui-ci. Par exemple, les senseurs du stress oxydant (OxyR / SoxR) sont souvent activés lors des stress métalliques et sont impliqués dans leur tolérance (Lippard et al., 2017).

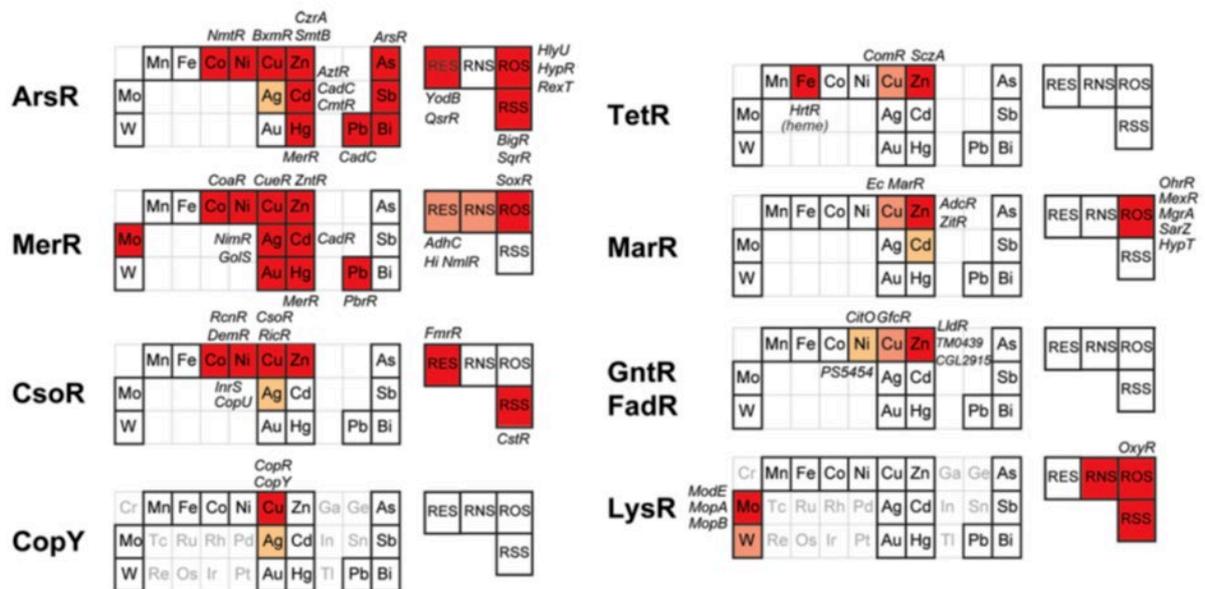


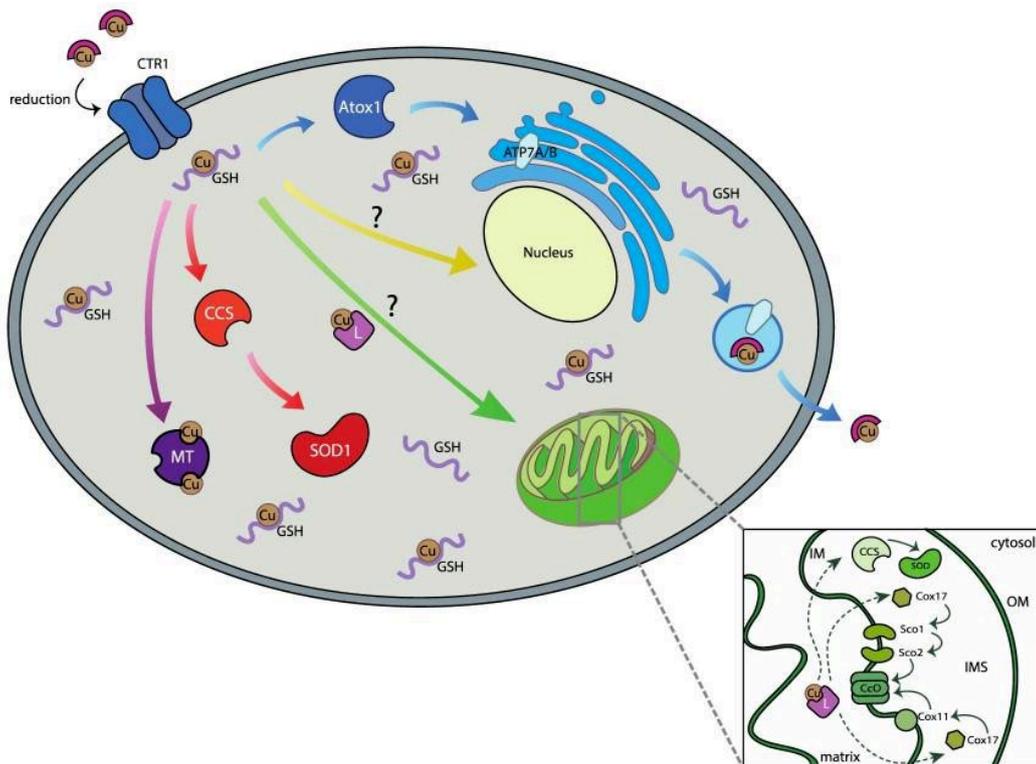
Figure 12 : Résumé des différentes familles de régulateurs et des signaux auxquels ils réagissent. Les interactions prouvées sont en rouge. Les autres couleurs représentent les mécanismes partiellement incompris. En jaune, sont représentés les senseurs impliqués dans la tolérance à ce métal mais sans interaction directe avec la cible. En rose, les interactions sont montrées mais le rôle physiologique n'est pas compris. RES : espèces électrophiles réactives (Farmer and Davoine, 2007) ; RNS : espèces azotées réactives ; ROS : espèces oxygénées réactives ; RSS : espèces soufrées réactives. Source : adapté de Lippard et al., 2017

Enfin, il existe aussi des cas de régulation post transcriptionnelle. C'est le cas de l'ARNm de la multicopper oxidase CutO chez *Rhodobacter capsulatus*. En condition d'excès de cuivre, le métal libre dans le cytoplasme va se lier à l'ARN, le stabilisant et permettant donc sa traduction (Rademacher et al., 2012).

### 1.4.2. Chez les eucaryotes

Au travers des chapitres précédents, nous avons survolé les rôles et les dangers du cuivre chez les organismes procaryotes. Mais les eucaryotes ont les mêmes problématiques et ont donc mis en place une homéostasie tout aussi pointue et stricte. Dans ce chapitre, nous effleurerons la complexité de l'homéostasie du cuivre chez les eucaryotes. En effet, bien que proches, les mécanismes diffèrent fortement entre les champignons et les animaux, les protozoaires et les métazoaires, etc. Même au sein d'un organisme comme l'humain, les mécanismes de cette homéostasie diffèrent en fonction des types cellulaires des tissus et des organes.

Le cuivre est importé par les transporteurs membranaires Ctr1 et Ctr2. Ctr1 est le plus abondant et permet d'acquérir le cuivre à partir des transporteurs sanguins du cuivre comme la céruloplasmine. Le rôle de Ctr2 n'est pas bien compris. En cas d'excès de cuivre, les protéines Ctr, qui habituellement se situent au niveau de la membrane plasmique, vont se retrouver à la surface de vésicules internes, empêchant ainsi l'importation de cuivre extérieur (Balamurugan and Schaffner, 2006; Cotruvo et al., 2015; Lutsenko, 2010; Petris, 2004).



*Figure 13: Représentation schématique simplifiée de l'homéostasie du cuivre chez les cellules eucaryotes. IMS : espace intermembranaire ; IM : membrane interne ; OM : membrane externe ; MT : métallothionéines ; GSH : glutathion ; L : ligand (petites molécules se liant au cuivre). Sources : Cotruvo et al., 2015*

Une fois internalisé, le cuivre va être pris en charge par différentes métallochaperonnes. La chaperonne CCS permet d'intégrer le cuivre dans la superoxyde dismutase à Cu/Zn (Sod1) (Skopp et al., 2019). La chaperonne Cox17 va adresser le cuivre à la mitochondrie où il sera ensuite pris en charge par les chaperonnes Cox11 et Sco, permettant l'intégration du métal dans certaines sous-unités de complexes respiratoires (Balamurugan and Schaffner, 2006). On trouve aussi des métallothionéines permettant de séquestrer le cuivre libre et potentiellement toxique en cas d'excès. La chaperonne Atox1 (homologue à CopZ) va adresser le cuivre au noyau pour la régulation de l'homéostasie mais va également transmettre le métal aux ATPases ATP7A et ATP7B (Hatori and Lutsenko, 2016; Lutsenko, 2010). L'expression et le rôle des deux ATPases homologues ATP7A et ATP7B sont dépendants des organes, tissus et types cellulaires. En conditions normales, ATP7A/B est située au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dans le but d'assurer la métallation des protéines. Dans le cas d'un excès de cuivre, ces ATPases vont subir une relocalisation à la membrane plasmique, permettant l'extrusion du cuivre. Cette relocalisation est médiée par l'état de phosphorylation de ces protéines (Balamurugan and Schaffner, 2006; Lutsenko, 2010).

Les maladies de Menkes et de Wilson sont des pathologies génétiques dûes à une perturbation de l'homéostasie du cuivre causée par la perte d'une des deux versions de l'ATPase à cuivre.

Dans le cas de la maladie de Menkes, c'est le gène codant ATP7A qui porte une mutation. Le gène étant sur le chromosome X, ce sont principalement les jeunes garçons qui sont touchés. Cette mutation entraîne des retards de croissance in-utero et après la naissance une hypotonie, une absence de prise de poids, une hypothermie chronique, de l'ostéoporose ainsi qu'une neurodégénérescence de la matière grise du cerveau. Il n'existe pas de traitement et les malades ont une espérance de vie extrêmement réduite (Tümer and Møller, 2010).

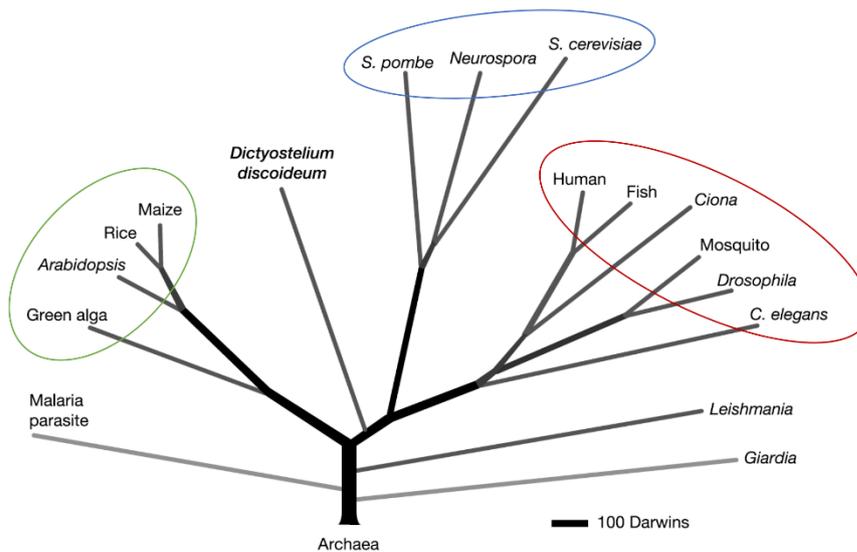
Dans le cas de la maladie de Wilson, c'est le gène de l'ATP7B qui porte une mutation. Cette maladie moins grave entraîne principalement l'accumulation de cuivre dans le foie et le cerveau. Cette accumulation entraîne un défaut de fonctionnement du foie entraînant une encéphalopathie hépatique et de l'hypertension dans la veine porte. A long terme cette accumulation provoque des cirrhoses et des cancers du foie. D'un point de vue neurologique, la maladie provoque des troubles de la personnalité et des démences ainsi que des troubles proches de la maladie de Parkinson. Il est également possible d'observer un dépôt de cuivre au niveau de l'iris appelé anneau de Keyser-Fleischer. Cette pathologie provoque encore d'autres troubles cardiaques, rénaux et hormonaux. (Schilsky, 2017)

Pour ces deux pathologies, les malades présentent un déficit immunitaire important car le cuivre est essentiel à l'élimination des pathogènes.

## 1.5. Le cuivre au sein de l'interaction hôte-pathogène

### 1.5.1. Histoire de la phagocytose : de l'amibe au macrophage

La phagocytose est un mécanisme complexe mais pourtant ancestral. Les capacités phagocytaires des cellules immunitaires des mammifères sont bien connues mais ces cellules ne sont pas les seules à en être dotées. En effet, il est possible de trouver des organismes unicellulaires très similaires aux macrophages : les amibes.



*Figure 14 : Arbre phylogénétique. Il est possible de voir que Dictyostelium discoideum représentant des amibes dans cet arbre se situe entre les plantes (en vert) et les Champignons / animaux (en bleu et rouge) avant la séparation de ces derniers.*

(Eichinger et al., 2005)

Les amibes sont des cellules eucaryotes, observées et « décrites » pour la première fois en 1701 par Antoni Van Leeuwenhoek (Leeuwenhoek, 1701), qui ont émergé tôt de la branche qui conduit aux moisissures et aux métazoaires, après séparation de cette branche d'avec celle des plantes (Eichinger et al., 2005). Les amibes sont ubiquitaires et très présentes dans les environnements (sols, eaux, animaux ...). Plus de 3000 espèces d'amibes ont déjà été décrites mais les estimations tendent vers 12000 à 13000 espèces (Adl et al., 2007). Les amibes évoluant relativement rapidement, elles possèdent une capacité d'adaptation importante qui a permis à ces organismes de coloniser très rapidement des structures créées par l'humain. On les trouve dans les piscines, les douches, les systèmes de distribution des eaux, les bassins de sédimentation et dans les tours aérorefrigérantes (Thomas and Ashbolt, 2011). Les amibes sont présentes sous deux formes : les trophozoïtes qui sont les formes actives et les kystes qui sont les formes de résistance. Ces derniers présentent une paroi à structure complexe permettant de résister à des conditions extrêmes (Thomas et al., 2004).

Les amibes environnementales sont capables d'importer les nutriments extérieurs comme n'importe quelle cellule, mais ce qui caractérise ces cellules sont leur capacité phagocytaire. En effet, dans les environnements pauvres en nutriments, les amibes utilisent la phagocytose pour se nourrir des microorganismes environnants. Divers microorganismes peuvent être phagocytés mais les principaux restent les bactéries. Les amibes sont donc des régulateurs importants des populations et communautés bactériennes (Rodríguez-Zaragoza, 1994). A l'instar des macrophages, les amibes « digèrent » les bactéries grâce à l'action de leurs phagolysosomes appelés vésicules digestives. La fusion de ces vésicules avec les endosomes contenant les bactéries phagocytées entraîne une acidification, un burst oxydatif, un appauvrissement en certains métaux ou une augmentation d'autres, et la production de nombreuses hydrolases (Greub and Raoult, 2004; Hao et al., 2016).

Il est intéressant d'observer que si les amibes se nourrissent de bactéries, de nombreuses bactéries ont évolué pour résister à la phagocytose (Hao et al., 2016). D'autres vont même jusqu'à persister et se multiplier dans les amibes comme *Legionella pneumophila* (Greub and Raoult, 2004). Même des bactéries du genre *Bordetellae* semblent capables d'utiliser les amibes pour se répandre, comme décrit récemment (Taylor-Mulneix et al., 2017). Il est probable qu'une certaine proportion de ces bactéries, passées de proies à parasites, ait continué leur évolution vers l'endosymbiose. En effet, de nombreuses amibes dépendraient de certaines de leurs bactéries intracellulaires (Jeon and Jeon, 1976). Les bactéries du genre *Chlamydia* sont très présentes dans les parasites et seraient devenues des endosymbiontes d'amibes. Par exemple, chez les amibes du genre *Acanthamoeba*, 5 % des bactéries sont des *Chlamydiae* (Fritsche et al., 2000).

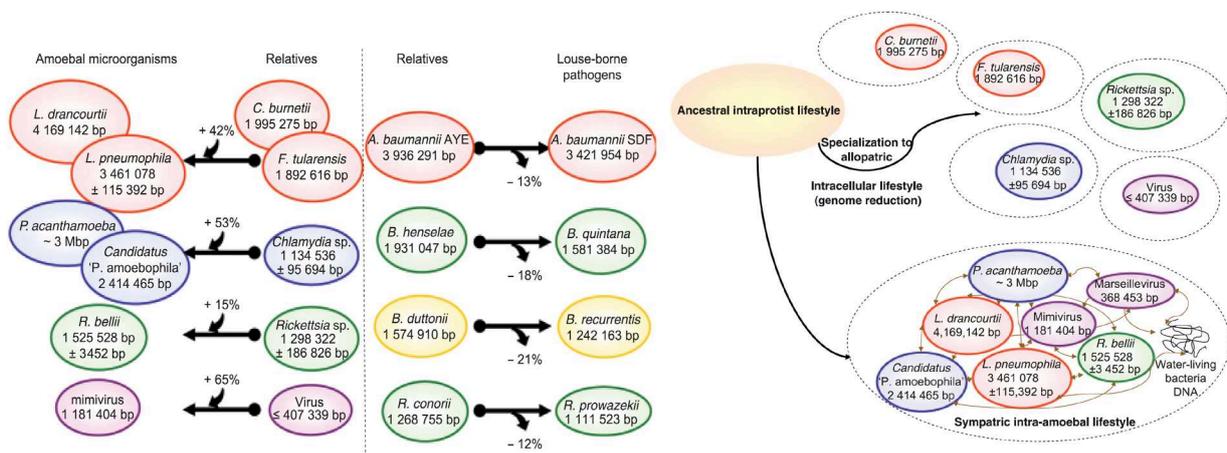


Figure 15 : Sur le panel de gauche, il est possible d'observer l'augmentation des tailles de génomes des bactéries présentes dans les amibes, alors que les bactéries pathogènes ont plutôt tendance à perdre des gènes, tendant à prouver que l'amibe est un lieu d'échange génétique. Sur le panel de droite on voit que les bactéries résistant aux phagolysosomes ont des génomes plus grands que les bactéries spécialisées à la vie intracellulaire dans un seul hôte. (Moliner et al., 2009)

En plus de la pression de sélection qu'exercent les amibes, elles permettent d'augmenter les échanges horizontaux chez les bactéries. Les *Rickettsia* sont de bons exemples dans ce domaine (Wang and Wu, 2017). Ces bactéries sont des parasites des cellules amibiennes et animales. Elles ont la particularité de détourner l'ATP produite par leur cellule hôte. Il semble que l'ATP/ADP translocase qui permet à ces bactéries d'importer l'ATP soit issue d'un transfert horizontal qui s'est produit avec une bactérie du genre *Chlamydia* au sein des amibes (Greub and Raoult, 2003).

Les amibes sont donc un lieu d'échange de matériel génétique entre bactéries, permettant l'adaptation accélérée à cette pression de sélection que représente l'amibe. En effet les bactéries vivant au sein des amibes semblent voir leur génome augmenter grâce aux transferts horizontaux (Moliner et al., 2009).

Comme nous avons pu le voir, de nombreuses bactéries semblent avoir acquis des systèmes de résistance aux cellules du système immunitaire au sein des amibes. L'amibe semble donc être l'étape évolutive majeure entre l'environnement et l'infection animale. Pour ces bactéries, les amibes ne représentent pas uniquement une pression de sélection mais tiennent aussi la fonction de réservoir. C'est le cas par exemple de *Legionella pneumophila* et des réseaux d'eau (Thomas et al., 2006), où les amibes sont une source de dispersion grâce à des mécanismes qui lui sont propres (comme la sporulation). Ces dernières sont capables d'empaqueter des bactéries cytoplasmiques et de les évacuer dans des vésicules permettant à l'amibe de limiter la multiplication des bactéries parasites intracellulaires et donc de retarder sa lyse (Greub and Raoult, 2002). Un autre exemple est l'utilisation comme vecteur des corps de fructification produisant des spores chez les amibes sociales (Taylor-Mulneix et al., 2017).

Quoique peu étudiée, l'amibe est considérée comme l'ancêtre évolutif des macrophages présents chez les métazoaires (Siddiqui and Khan, 2012). Nous avons vu que les mécanismes de phagocytose sont similaires entre les deux organismes. Il en est de même pour l'homéostasie des métaux, qui sera décrite dans la partie suivante. De nombreux autres systèmes sont très similaires. Les amibes possèdent des récepteurs semblables aux TLR des macrophages (Clarke et al., 2013) chargés d'induire la phagocytose et l'expression des gènes impliqués dans la bactéricidie. Chez *Acanthamoeba castellanii*, il existe une protéine NADPH oxydase quasi identique à celle présente chez les neutrophiles et dont la fonction est de générer un stress oxydant bactéricide (Davies and Edwards, 1991). Le cas le plus étonnant est l'amibe sociale *D. discoïdum*, qui développe un semblant de système immunitaire. En effet, des groupes pluricellulaires s'organisent de façon à ce que certaines cellules expriment une protéine avec un domaine Toll/interleukine 1 receptor, qui va permettre de détecter et d'éliminer les bactéries du genre *Legionella* (Chen et al., 2007).

### 1.5.2. Utilisation des métaux par les amibes et les macrophages

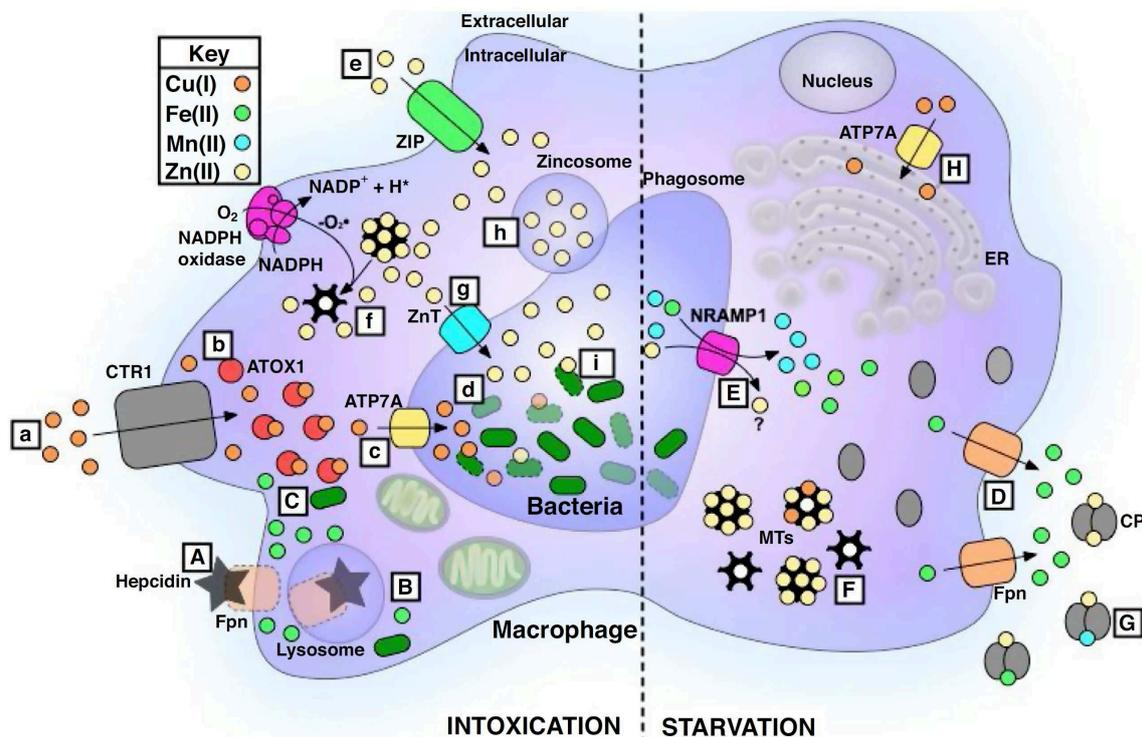
L'utilisation du cuivre par les cellules phagocytaires a principalement été étudiée chez les macrophages. Ici, nous décrirons les mécanismes mis en jeu chez les macrophages et soulignerons les recherches faisant le parallèle avec les fonctions homologues amibiennes.

Les métaux sont des acteurs majeurs des processus de bactéricidie lors de la phagocytose. Les différents métaux de transition possédant un potentiel rédox utile aux processus biologiques (Cu, Fe, Co, Ni, Zn, Mn) sont essentiels à tous les microorganismes. Lors de la phagocytose il va donc y avoir une compétition entre le prédateur et la proie pour ces métaux.

Deux de ces métaux font l'objet d'une carence savamment orchestrée, il s'agit du fer et du manganèse. Ces derniers sont utilisés par de nombreuses enzymes bactériennes, y compris les superoxydes dismutases à Fe/Mn, qui détoxifient les anions superoxydes. De plus, ces métaux ne présentent que peu de risque d'intoxication pour les bactéries, le fer et le manganèse ne traversant pas les membranes, la répression des systèmes d'import permet de minimiser une éventuelle toxicité. La stratégie des macrophages est de rendre le moins accessible possible ces deux métaux. À l'échelle de l'organisme, l'infection induit l'expression de l'hépcidine, se liant au seul exporteur de fer des eucaryotes, la ferroportine, et entraînant sa dégradation par le lysosome. Ceci a comme conséquence la diminution du fer circulant (Nemeth et al., 2004), sauf dans le cas d'infection intracellulaire pour laquelle la ferroportine est up régulée pour faire sortir le fer du cytoplasme (Nairz et al., 2013). Dans le même but, la lactoferrine pour le fer et la calprotectine pour le manganèse permettent de complexer ces métaux circulants pour les rendre indisponibles aux bactéries (Sheldon and Skaar, 2019). En ce qui concerne les bactéries phagocytées, les macrophages possèdent un système de transport NRAMP1 des ions métalliques divalents permettant de diminuer fortement la concentration de ces métaux dans la lumière du phagosome (Sheldon and Skaar, 2019; Wessling-Resnick, 2015).

Le cas du zinc est encore peu étudié et mal compris, mais les informations disponibles à ce jour sur son homéostasie dans le cas des infections sont intéressantes. Il semble que l'importation du zinc par les macrophages grâce au transporteur ZIP et sa complexation par la métallothionéine (MT) participent à l'immunité nutritionnelle en abaissant la concentration extracellulaire de zinc (Ong et al., 2018). À l'inverse, les macrophages vont augmenter la concentration phagosomale en zinc afin de déclencher une intoxication des bactéries capturées (Ong et al., 2018). Pour cela, la NADPH oxydase va oxyder la métallothionéine, entraînant la libération du zinc. Celui-ci va être transporté par la protéine ZnT directement dans le phagosome ou bien dans des vésicules, les zincosomes, qui fusionneront avec le phagosome (Botella et al., 2011; Kapetanovic et al., 2016; Sheldon and Skaar, 2019).

Enfin, le cuivre fait l'objet d'une unique utilisation par le système immunitaire : l'intoxication. En effet, au niveau de l'organisme une infection va induire un recrutement important du cuivre au niveau du site d'inflammation, vers lequel il est transporté par la céruloplasmine (Chaturvedi and Henderson, 2014). Au niveau du macrophage, la détection des LPS bactériens ou de l'interféron gamma (induit par l'infection) va induire la surexpression et le ré- adressage de deux types de transporteurs membranaires, Ctr1 et ATP7A (White et al., 2009). Ctr1 va importer le cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$  vers le cytoplasme où il sera pris en charge par la protéine Atox1. Celle-ci le délivrera à la protéine ATP7A qui transporte le métal vers la lumière du phagolysosome (Fu et al., 2014; Sheldon and Skaar, 2019; White et al., 2009).



*Figure 16 : Représentation schématique de l'homéostasie des métaux de transition chez le macrophage durant la phagocytose bactérienne. (a) Importation du cuivre par le transporteur Ctr1. (b) Le cuivre cytoplasmique est séquestré et escorté par la protéine Atox1. (c) ATP7A transporte le cuivre vers le phagosome. (d) Le cuivre libre empoisonne les bactéries. (e) Le zinc est importé par le transporteur membranaire ZIP. (f) Libération du zinc de la MT par action enzymatique indirecte. (g) Importation du zinc via ZnT dans le phagosome ou dans les zincosomes. (h) Les zincosomes fusionnent avec le phagosome. (i) Le zinc libre empoisonne les bactéries. (A,B) L'hepcidine se lie à la ferroportine et entraîne sa dégradation. (C) Accumulation cytoplasmique de fer. (D) Dans le cas d'une infection intracellulaire le fer et le manganèse sont évacués du cytoplasme. (E) La protéine NRAMP1 déplete le phagosome en fer et manganèse. (F) Les métaux libres sont chélatés par les MTs. (G) Les métaux divalents extracellulaires sont chélatés par la calprotectine. (H) ATP7A importe le cuivre au niveau du réticulum endoplasmique pour assurer la métallation des protéines. Source : Sheldon and Skaar, 2019*

L'un des points intrigants demeure l'importation de cuivre  $\text{Cu}^{1+}$  (Cuprous ion) qui est très peu soluble, donc il semble improbable que cet ion puisse circuler à l'état libre. Dans le cas des organismes complexes, il est vraisemblable que le  $\text{Cu}^{1+}$  soit acheminé par un transporteur. Kasper et al., (1963) ont mis en évidence que 40 % du cuivre transporté par la céruloplasmine est sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ , qui est paramagnétique. Néanmoins, cette explication ne s'applique pas aux amibes. Le sujet n'a pas été étudié à ce jour mais il est possible de faire des parallèles avec les macrophages ou d'autres eucaryotes unicellulaires. Par exemple, les champignons filamenteux comme *Aspergillus fumigatus* possèdent la protéine Fre associée à la membrane plasmique, qui réduirait le  $\text{Cu}^{2+}$  vers la forme  $\text{Cu}^{1+}$  lors de son importation par la protéine Ctr, un homologue de Ctr1 (Antsoetegi-Uskola et al., 2020). Dans un tout autre contexte, l'article Garner et al., 1997 montre la capacité des macrophages à réduire le cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$ .

Parmi les différents métaux décrits, le cuivre constitue celui le plus étudié dans la phagocytose chez les amibes. Des revues comme celle de German et al. (2013) compilent les analyses génomiques permettant de mettre en évidence les protéines similaires entre les macrophages et les amibes dans le domaine de l'homéostasie des métaux. Par exemple, les amibes des genres *Dictyostelium* et *Acanthamoeba* possèdent différents homologues à la protéine NRAMP1 des macrophages décrite précédemment (Clarke et al., 2013; Eichinger et al., 2005). Néanmoins, les principaux homologues identifiés et présents en plusieurs copies sont ceux des protéines du transport du cuivre. Par exemple, la protéine p80 est un homologue à la protéine Ctr1, permettant l'importation du cuivre. Chez *Acanthamoeba castellanii* et *D. discoideum* il existe 3 homologues de la protéine de macrophage ATP7A (German et al., 2013).

L'article Hao et al., 2016, s'est intéressé à l'impact des mécanismes de résistance au cuivre bactérien dans la survie au sein des vésicules digestives des amibes. Les premiers résultats ont permis de confirmer ce qui avait été montré en macrophages. Les systèmes répandus de l'homéostasie du cuivre tels que les ATPases, les RND et les multicopper oxidases sont des acteurs majeurs de la survie à la phagocytose. Par la suite, les auteurs se sont intéressés à la survie de souches d' *E. coli* issues de parcs d'élevage de porcs. Il se trouve que la nourriture des porcs est supplémentée en cuivre (Yazdankhah et al., 2014) dans le but d'accélérer leur croissance. Malheureusement, la présence abondante de cuivre pousse les bactéries à s'adapter et à développer des éléments génétiques mobiles de résistance au cuivre ou à produire la yersiniabactine pour se protéger. Dans cet article, 3 souches bactériennes présentant ces particularités ont été étudiées. Ces souches ont non seulement montré une survie accrue à la phagocytose amibienne mais aussi la mort précoce des amibes... Ces îlots de résistance au cuivre sont également souvent retrouvés chez les bactéries pathogènes (Hao et al., 2015).

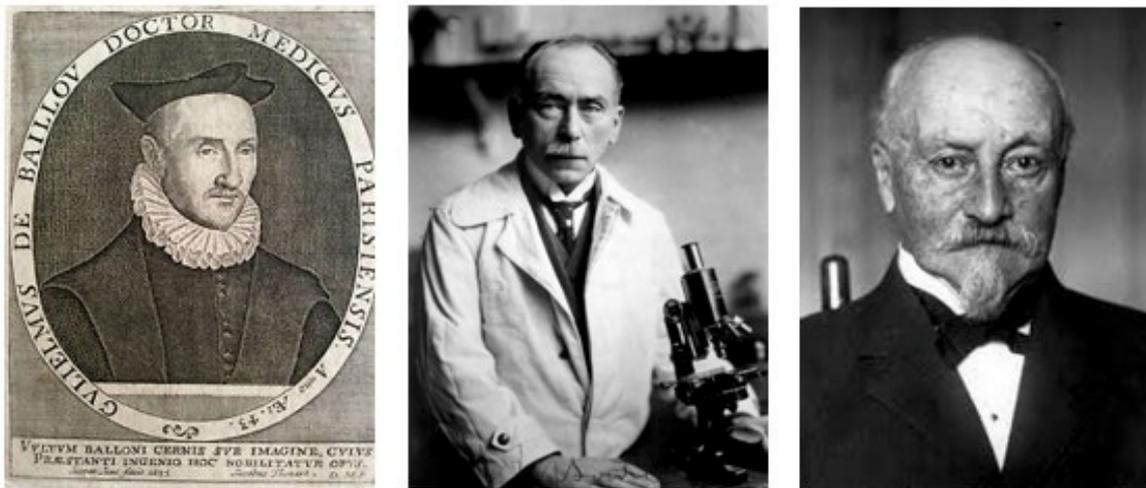
Ces études, comme d'autres, tendent à émettre l'hypothèse que la prédation par les amibes fut une des pressions de sélection majeures ayant permis l'apparition ubiquitaire chez les bactéries des systèmes de défense contre le cuivre. Ces systèmes ont donc également permis la survie aux attaques du système immunitaire inné des métazoaires. Malheureusement, les actions de l'être humain ont accentué des phénomènes d'adaptation par l'utilisation de la bouillie bordelaise et dérivés (Vázquez-Blanco et al., 2020), des surfaces cuivrées (Bryce et al., 2020), ou des suppléments alimentaires dans l'élevage (Yazdankhah et al., 2014).

Ces hypothèses suggérées par l'évolution de l'homéostasie du cuivre dans la relation bactéries-amibes semble être une évidence de plus que les amibes sont la première marche de l'évolution vers la pathogénie de nombreuses bactéries, l'exemple le plus décrit étant *L. pneumophila*.

## 2. Bordetella pertussis, pathogène à hôte restreint

### 2.5. Origine et découverte

La coqueluche est une pathologie respiratoire d'origine bactérienne. Cette infection fut décrite à Paris en 1578 par le médecin français Guillaume de Baillou qui baptisa cette maladie *Tussis quintina*. Cette maladie fut également décrite dans d'autres pays. En Allemagne, elle est connue sous le nom de *wolfshusten* (la toux du loup). En Angleterre, *whooping cough* évoque la toux caractéristique des personnes infectées. En France, le terme de coqueluche est apparu en référence à la toux des jeunes enfants rappelant le chant du coq (Cherry, 1996).



*Figure 17: De gauche à droite, représentation de Guillaume de Baillou (1538-1616), photo de Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet (1870-1961), photo d'Octave Gengou (1875-1957)*

Trois siècles plus tard, en 1900, deux belges, Jules Bordet (médecin) et Octave Gengou (bactériologiste), décrivent pour la première fois l'agent étiologique de la coqueluche après observation au microscope de la bactérie dans les expectorats d'un nourrisson malade. S'en suivirent six ans de recherche pour développer un milieu de culture leur permettant d'isoler la bactérie : le Bordet-Gengou. Ce milieu est constitué d'une infusion de pomme de terre supplémentée en sang (Rowatt, 1957). À cette époque, la bactérie responsable de la coqueluche fut nommée *Haemophilus pertussis*, puis *Bacillus pertussis*. En 1952, Monero Lopez décrit le genre *Bordetella* et en profita pour renommer la bactérie de la coqueluche *Bordetella pertussis* en hommage à Jules Bordet (Moreno Lopez, 1954).

### 2.5.1. Caractéristiques microbiologiques

*Bordetella pertussis* est un petit coccobacille de 1 µm de long. Les souches virulentes possèdent une capsule qui semble disparaître après passages sur milieu de culture solide (Neo et al., 2010). Sur milieu Bordet-Gengou des colonies isolées apparaissent après trois à quatre jours à 37°C et présentent une forme caractéristique dite en « Gouttes de mercures ». Autour des colonies il est possible d’observer un halo d’hémolyse totale (hémolyse Beta). En culture liquide dans le milieu Stainer-Scholte *B. pertussis* à un temps de division de 4 heures en phase exponentielle (Stainer and Scholte, 1970). Enfin cette bactérie est strictement aérobie.

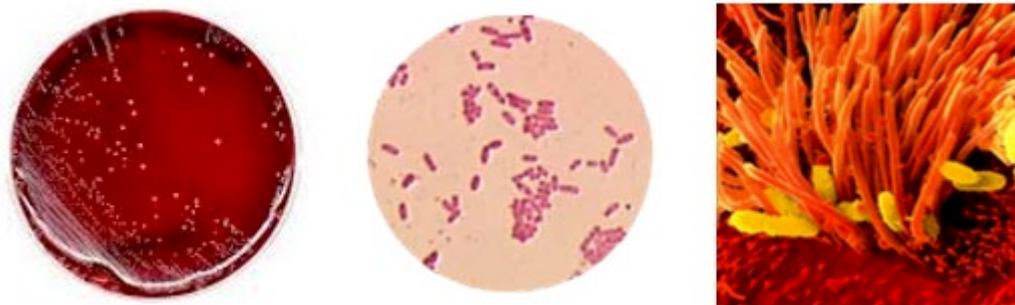


Figure 18: De gauche à droite, photo d’une boîte de pétri contenant du milieu Bordet-Gengou supplémenté avec 10 % de sang de mouton défibriné sur lequel il est possible de voir des colonies isolées de *Bordetella pertussis*, observation microscopique (x1000) de *B. pertussis* après coloration de Gram et image de microscopie électronique à balayage représentant les cellules ciliées de l’épithélium respiratoire (orange) avec des *B. pertussis* (jaune), Copyright 2004 Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings.

## 2.6. La coqueluche

### 2.6.1. La maladie

La coqueluche est une maladie très contagieuse dont l’agent étiologique est *Bordetella pertussis*. Cette bactérie survivant très mal dans l’environnement, elle a développé une infectiosité très importante en se transmettant d’hôte à hôte par des aérosols (Bock and Gross, 2001; Guiso, 2009; Trainor et al., 2015).

La contamination passe par les fluides de l’arbre respiratoire projetés autour du malade par des aérosols. La bactérie va alors coloniser l’arbre respiratoire supérieur durant la phase d’incubation (asymptomatique) qui peut varier de 7 à 21 jours. La bactérie produit un nombre important d’adhésines lui permettant d’adhérer à l’épithélium cilié de l’hôte, puis dans un second temps, va produire des toxines qui vont endommager cet épithélium ainsi que les cellules immunitaires recrutées par l’infection, comme les macrophages (Hewlett, 1997; Hewlett et al., 2006).

Suite à la phase d'incubation, se déroule la phase dite « catarrhale ». Cette période, d'une durée de 7 à 15 jours, se caractérise par des symptômes aspécifiques de la coqueluche, semblables à ceux d'une simple infection des voies respiratoires supérieures : syndrome pseudogrippal, rhinite, toux, éternuements, etc.. Vers la fin de cette période la toux deviendra progressivement spasmodique.

S'ensuit la phase paroxystique des quintes de toux. Cette période dure de 4 à 6 semaines. C'est la phase aigüe de la maladie, dont l'une des caractéristiques est l'absence de fièvre (apyrexie). La seconde caractéristique est l'organisation de la toux en quintes paroxystiques. Un « paroxysme » se compose d'une série de toux lors d'une même expiration, interdisant l'inspiration jusqu'à l'arrêt de la toux ; suivie d'une longue inspiration très bruyante appelée « chant du coq ». Les quintes se composent de 3 à 5 paroxysmes par épisode et se déroulent majoritairement la nuit. Suite à ces quintes, le malade va évacuer un expectorât blanchâtre, mais dans beaucoup de cas la toux est émétisante et provoque donc des vomissements. Durant ces quintes l'enfant aura le visage cyanosé par le manque d'oxygénation ainsi qu'une dilatation importante des veines de la face et du cou. Des pétéchies peuvent apparaître au niveau des orbites oculaires ainsi que des hémorragies sous- conjonctivales. Dans le cas du jeune nourrisson, ces symptômes peuvent entraîner une asphyxie responsable de pertes de connaissance, de convulsions hypoxiques, et d'un risque de mort si le malade n'est pas pris en charge. De manière indirecte, la coqueluche est également responsable de dénutrition des nourrissons à cause des vomissement fréquents.

Durant la phase paroxystique, la fréquence des quintes va progressivement augmenter pour atteindre 10 à 20 par jours.

Dans la dernière phase de la maladie (phase de déclin et de convalescence) le malade voit la diminution de la fréquence des quintes ainsi que de leur intensité. Cette période s'étend sur 3 à 5 semaines. Néanmoins, des « tics coqueluchoïdes » peuvent être observés ponctuellement, jusqu'à 5 mois après la phase paroxystique.

Chez l'adolescent et l'adulte, la pathologie est plus bénigne. En effet elle se caractérise simplement par une toux prolongée, accompagnée de douleurs thoraciques. Elle est alors souvent confondue avec des bronchites trainantes.

Dans de rares cas, la maladie entraîne des complications plus ou moins graves, comme des fractures des côtes dues aux contractions lors des quintes de toux, mais aussi des surinfections bactériennes ou virales caractérisées par l'apparition de fièvre. Enfin, chez 2.7% des nourrissons, on observe des complications neurologiques se manifestant sous forme de convulsions, le plus souvent provoquées par l'hypoxie, ou dues à l'action directe de la toxine pertussique (*E. PILLY Maladies infectieuses et tropicales 2014 ; Grimprel, 2007; HCSP, 2014*)

### 2.6.2. Le diagnostic

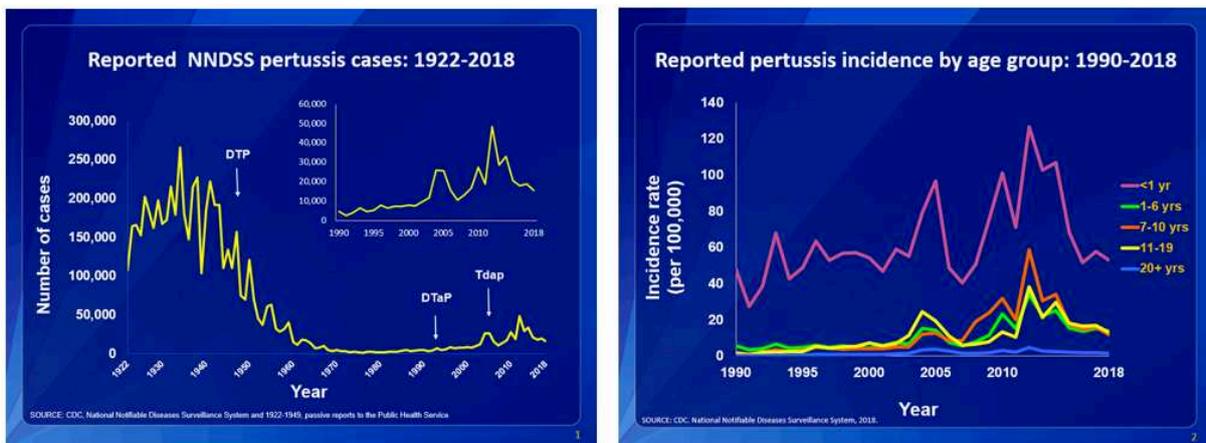
Le diagnostic commence souvent par l'observation des symptômes cliniques décrits précédemment, mais un certain nombre d'examen paracliniques permettent aussi de confirmer le diagnostic. L'hémogramme présente une hyperleucocytose (15 000/mm<sup>3</sup> à 20 000/mm<sup>3</sup>) avec une prédominance des lymphocytes (60 à 90%). L'examen bactériologique à partir d'un écouvillonnage du nasopharynx, réalisé par culture sur milieu solide et par PCR, vient confirmer le diagnostic. En France, depuis 2011, la sérologie n'est plus recommandée ni remboursée (*E. PILLY Maladies infectieuses et tropicales 2014; HCSP, 2014*).

### 2.6.3. Le traitement

Dans le cas du nourrisson, l'hospitalisation est systématique de manière à dégager voies respiratoires et à maintenir l'hydratation et la nutrition du patient. Du côté de l'antibiothérapie, le traitement « historique » reste l'érythromycine (von König, 2005). Néanmoins depuis plusieurs années, l'utilisation de deux autres macrolides, l'azithromycine et la clarithromycine, lui est préférée car ces antibiotiques occasionnent des effets secondaires bien moins importants (Altunaiji et al., 2007). Le traitement antibiotique, même prescrit très tôt dans la maladie, n'atténue que très peu la symptomatologie. En revanche, il diminue le portage et le risque de transmission (HCSP, 2014). Dans les formes graves de la pathologie, des corticoïdes peuvent être prescrits. Ils permettent de diminuer l'intensité des quintes de toux, là où la plupart des antitussifs classiques sont inefficaces (HCSP, 2014).

## 2.6.4. L'épidémiologie

La coqueluche est une maladie strictement humaine. L'OMS estime qu'il y aurait eu 16 millions de cas dans le monde en 2008, ayant provoqué 195 000 décès. Une étude plus récente estime à 24 millions le nombre de cas en 2014 et à 160 000 le nombre de décès (Yeung et al., 2017). Il est à noter que 95% des cas sont recensés dans les pays en voie de développement. En effets, les pays riches bénéficient d'une couverture vaccinale importante assurant une relative protection contre la pathologie, malgré le fait que la bactérie circule toujours dans la population (Pilly and Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France), 2015 ; "WHO | Pertussis," 2019).



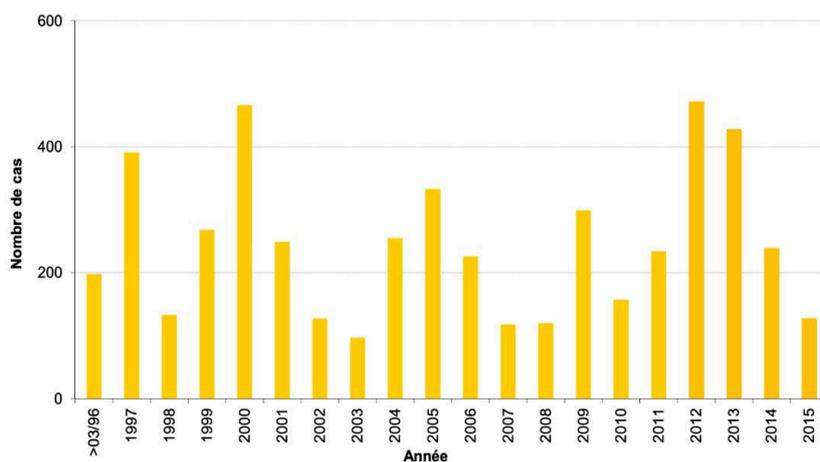
*Figure 19 : Représentation de l'évolution épidémiologique de la coqueluche aux États-Unis. Le panel de gauche présente le suivi entre 1922 et 2018 ainsi qu'un focus sur la période 1990-2018. Le DTP correspond à l'introduction du vaccin contenant la version « whole cell » (bactéries entières inactivées) du vaccin contre *B. pertussis*, le DTaP représente l'introduction de la version acellulaire du vaccin et Tdap représente la mise en place des rappels de vaccination. Le panel de droite représente la répartition des cas de coqueluche en fonction des groupes d'âges sur la période 1990-2018. Source : CDC.*

Il existe néanmoins de nombreux cas non ou mal diagnostiqués et certaines études estimerait plutôt à 50 millions le nombre de cas de coqueluche et à près de 300 000 le nombre de décès (Libster and Edwards, 2012; Locht and Mielcarek, 2014).

Depuis une dizaine années, certains pays industrialisés comme les États-Unis observent une recrudescence des cas de coqueluche. Le CDC a rapporté près de 18 000 cas de coqueluche sur le sol américain en 2017 (figure 19) ("Pertussis | Surveillance Trend Reporting and Case Definition | CDC," 2019).

Plusieurs hypothèses sont à l'étude concernant cette recrudescence, comme la variation antigénique de *B. pertussis* (perte de certains antigènes vaccinaux comme la pertactine dans les isolats circulants...), la durée de protection plus courte conférée par les vaccins acellulaires ou plus simplement une amélioration des technologies de diagnostic (Guiso et al., 2011).

En France, c'est le réseau RENACOO, piloté par l'Institut de veille sanitaire (Santé publique France depuis 2019), qui s'occupe de la surveillance épidémiologique de la coqueluche. Ce réseau a recensé 3414 cas âgés de moins de 17 ans entre 1996 et 2010 (figure 20). Parmi ces cas, 2070 étaient âgés de moins de 5 mois et parmi ces derniers 96% ont été hospitalisés, dont 16% en réanimation. Le réseau a observé une létalité d'environ 1%. Il est important de noter que parmi les 2070 cas recensés, moins de 1% avaient reçu les trois doses nécessaires à une immunisation efficace ("Institut de veille Sanitaire /Données épidémiologiques / Coqueluche / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses /," 2018).



*Figure 20: Représentation épidémiologique des cas de coqueluche identifiés par analyse bactériologique en France dans le période 1996-2015. Source : Renacoq*

### 2.6.5. Les vaccins

La vaccination demeure, encore aujourd'hui, la meilleure prévention contre la coqueluche. Peu après la découverte de la bactérie, de nombreux prototypes de vaccins ont vu le jour. Parmi eux, on peut noter celui de 1925 qui consistait en des cellules entières conservées dans une solution saline contenant du phénol (Howson and Fineberg, 1992). Plus tard, deux chercheuses étudièrent l'immunité induite par la maladie et aboutirent à un nouveau vaccin utilisant des cellules entières inactivées à la chaleur ou chimiquement, couplées aux antigènes vaccinaux de la diphtérie, du tétanos et de la poliomyélite (Kendrick, 1942).

Le vaccin à cellules entières fut utilisé avec succès jusqu'aux années 70, durant lesquelles plusieurs études pointèrent d'éventuelles complications neurologiques dues au vaccin (Kulenkampff et al., 1974). À la suite de la mise en lumière des effets secondaires, certains pays industrialisés interdirent l'administration de ce type de vaccin à la fin des années 70. Il en découla d'importantes épidémies de coqueluche dans tous les pays ayant proscrit la vaccination, en particulier l'Angleterre et la Suède (Kuchar et al., 2016). Néanmoins le vaccin à cellules entières (wP) est toujours utilisé dans certains pays en voie de développement (Locht and Mielcarek, 2014).

La recrudescence de coqueluche poussa à revoir la formule vaccinale. C'est donc dans les années 80 que les vaccins acellulaires font leur apparitions (Klein, 2014). Ces vaccins sont composés de sous-unités protéiques purifiées des principaux antigènes de *B. pertussis* comme la toxine pertussique (PTX) et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA). Selon les formulations, il est possible de trouver également la pertactine ou les fimbriae (Locht and Mielcarek, 2014).

D'après l'OMS la couverture vaccinale des enfants vaccinés avec trois doses du vaccin DTP (diphtheria-tétanos-pertussis) est de l'ordre de 86% (figure 21).

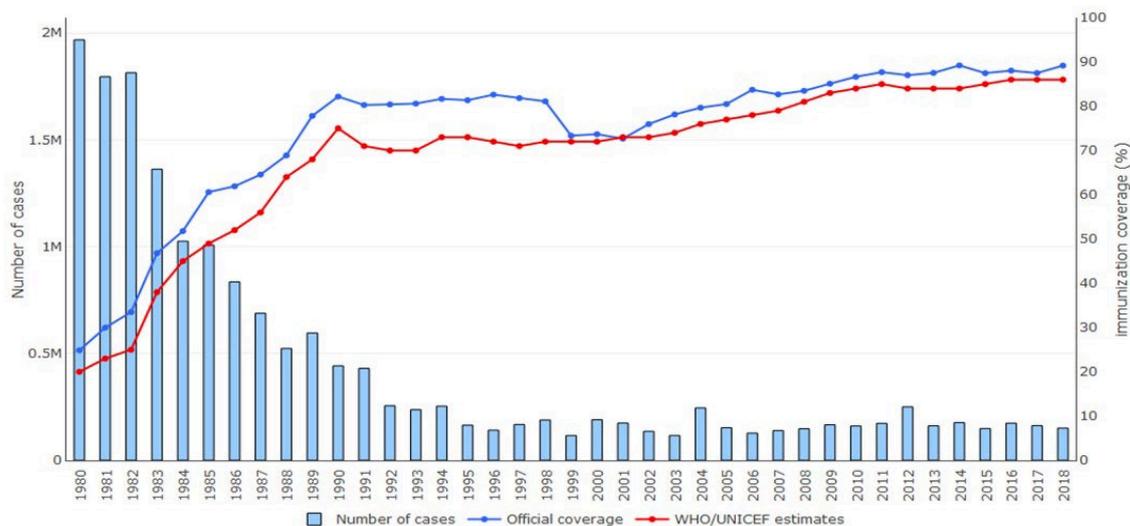


Figure 21 : Représentation du nombre de cas confirmés (histogrammes bleus) comparé à la couverture vaccinale officielle des états (ligne continue bleue) et à la couverture vaccinale réelle estimée par l'Organisation Mondiale de la Santé (ligne continue rouge). Source : Organisation Mondiale de la Santé.

Afin de comprendre le lien entre épidémiologie et couverture vaccinale, il est important de savoir que la réponse immunitaire au vaccin ne mime que partiellement l'immunité induite par la maladie naturelle. En effet, le vaccin permet d'acquérir une immunité contre la maladie durant une période de 4 à 12 ans, contrairement à l'immunité induite à la suite de la maladie qui peut durer près de 20 ans. La bactérie peut donc circuler entre individus non protégés (Wendelboe et al., 2005). De plus, des études sur les babouins semblent montrer que la vaccination protège contre les symptômes de la maladie mais n'empêche pas la colonisation du tractus respiratoire (Melvin et al., 2014; Naninck et al., 2018).

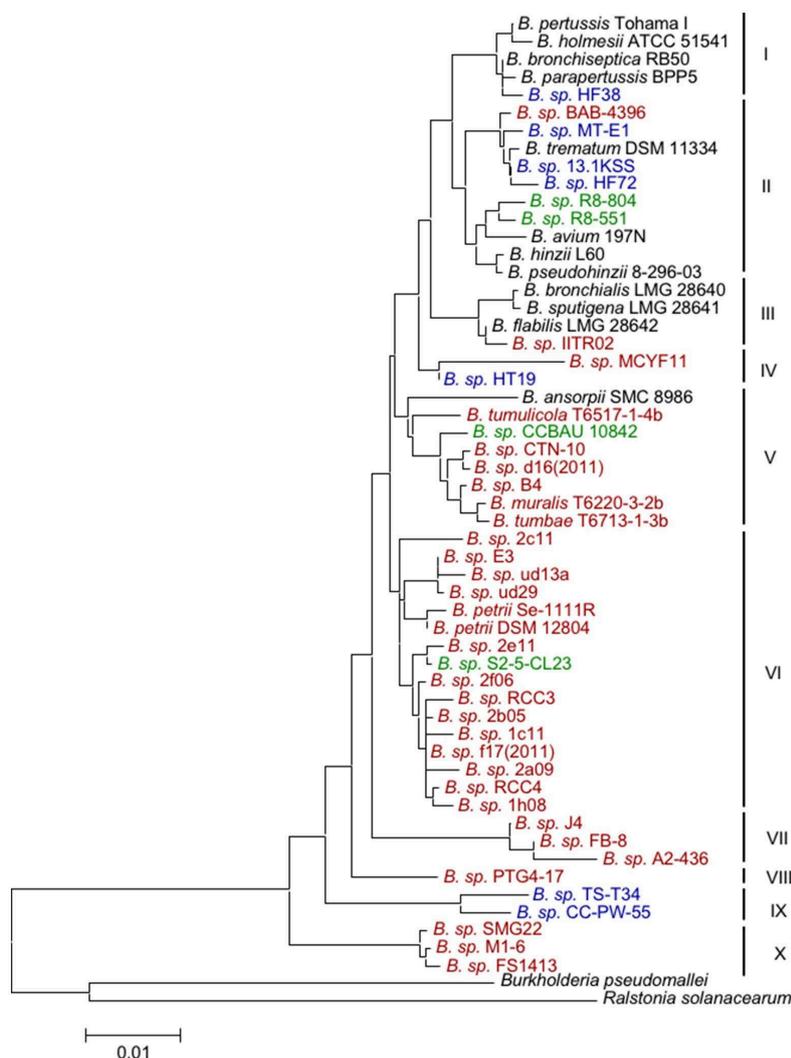
De nouvelles stratégies de vaccination sont actuellement à l'essai. Par exemple le vaccin vivant atténué BPZE1 a pour but de mimer l'infection naturelle au travers d'une colonisation du tractus respiratoire mais sans symptôme. Il semble que cette approche permette d'empêcher la colonisation et la transmission de la bactérie sauvage (Locht, 2016; Locht et al., 2017).

## 2.7. Mode de vie et pathogénie de *Bordetella pertussis*

### 2.3.1 Évolution du genre *Bordetella*

Le genre *Bordetella* contient de nombreuses espèces. Un faible nombre de celles dont le mode de vie a été étudié et dont on connaît le cycle de vie complet est considéré comme strictement environnemental, contrairement au genre *Achromobacter*, très proche des Bordetelles, dont la plupart des espèces connues sont environnementales, mais dont certaines sont néanmoins des pathogènes opportunistes.

Au sein du genre *Bordetella*, beaucoup d'espèces décrites sont au moins des pathogènes opportunistes. Néanmoins de nombreuses bactéries attribuées au genre *Bordetella* de par la séquence de leur gène 16S ont été isolées de l'environnement (figure 22).



*Figure 22: Arbre Phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARN 16S de 52 espèces de Bordetella. Ces espèces sont regroupées en 10 clades phylogénétiques (I-X). Les espèces en rouge ont été isolées d'échantillons de sols. Les espèces en bleu sont issues d'échantillons d'eau. Les espèces en vert sont issues d'échantillons de plantes et enfin les espèces en noir sont issues d'animaux. Source: Hamidou Soumana et al., 2017*

Ces bactéries proviennent de milieux très différents tels que des sols contaminés par des composés aromatiques (Hamidou Soumana et al., 2017), le sol de jardins (Bachate et al., 2012), des sols pollués par des composés dérivés du benzène (Wang et al., 2007), du compost, etc. Il existe même trois espèces, *Bordetella tumbae*, *Bordetella tumulicola* et *Bordetella muralis*, qui ont été isolées de peintures murales présentes dans le tombeau de Takatsuzaka dans la préfecture de Nara au Japon (Tazato et al., 2015). N'ayant que peu d'éléments sur le style de vie de ces bactéries, nous assumerons l'hypothèse que le genre *Bordetella* est issu de bactéries environnementales comme le genre *Achromobacter*.

Par exemple *Bordetella petrii* est une bactérie isolée d'un bioréacteur enrichie en sédiments de rivière (von Wintzingerode et al., 2001). C'est la seule des Bordetelles connues à ce jour capable de vivre en anaérobiose, néanmoins le séquençage de la souche a mis en évidence qu'elle possède des facteurs de virulence similaires à ceux présents chez les espèces pathogènes du genre (Gross et al., 2008). Plus récemment, des isolats de patients immunodéprimés ont montré la capacité de *B. petrii* à être un pathogène opportuniste (Nagata et al., 2015). Le genre *Bordetella* semble donc indissociable de sa composante pathogène.

*B. petrii* est souvent mise en avant comme évidence d'une transition de style de vie passant de l'environnement à l'animal. Cette bactérie serait donc une bactérie environnementale ayant acquis suffisamment de facteurs de virulence pour infecter quelques hôtes immunodéprimés. Néanmoins rien ne permet de déterminer le déroulement de l'évolution de *B. petrii*. En effet, la bactérie possède non seulement des facteurs de virulence comme l'adhésine FHA ou le système de régulation de la virulence BvgAS, mais également des systèmes d'acquisition de nutriments qui semblent dévolus à détourner les ressources de l'hôte. Par exemple *B. petrii* possède un transporteur à hème. La présence de ce transporteur est assez étonnante chez une bactérie environnementale qui ne cause qu'accidentellement des infections, alors que cette famille de protéines est plutôt retrouvée chez des bactéries en contact avec les animaux. De plus, selon certains auteurs, l'origine environnementale de *B. petrii* est attestée par la présence de certaines voies métaboliques permettant de vivre dans des sols pollués (Hamidou Soumana et al., 2017). Elle serait un membre de la communauté microbienne de dégradation des composés hydrocarbonés aromatiques comme le benzène. Néanmoins selon Gross et al. (2008), l'ADN codant ces voies métaboliques présente une proportion en nucléotides GC différente du reste du génome, suggérant que ces gènes sont issus de transferts horizontaux. Tous ces arguments n'ébranlent pas la théorie de l'origine environnementale mais la mettent en perspective. En effet, il n'est pas exclu d'imaginer que l'ancêtre de *B. petrii* était une bactérie pathogène opportuniste fréquente. En raison de la compétition des autres Bordetelles comme *Bordetella bronchiseptica*, la bactérie se serait détournée du style de vie pathogène grâce à l'acquisition voies métaboliques lui permettant de se développer dans des milieux moins compétitifs.

À partir d'ici, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux trois espèces de *Bordetella* les plus étudiées, qui sont aussi les plus courantes dans les infections humaines et animales : *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* et *Bordetella parapertussis*. Il est toutefois important de souligner que ces trois espèces ne sont pas les seuls pathogènes 'professionnels' du genre (Hamidou Soumana et al., 2017). *Bordetella avium* et *Bordetella hinzii* causent des infections respiratoires chez les oiseaux (Kerstens et al., 1984; Register and Kunkle, 2009; Vandamme et al., 1995), *Bordetella holmesii* est responsable d'infections respiratoires et de septicémies chez l'humain (Weyant et al., 1995), *Bordetella trematum* et *Bordetella ansorpii* sont responsables d'infections locales des plaies, etc. (Ko et al., 2005; Vandamme et al., 1996).

### 2.7.1.1. De l'environnement à l'animal

*B. bronchiseptica* constitue un bon modèle pour traiter du passage de l'environnement à l'hôte animal. En effet, cette bactérie présente la particularité d'avoir un cycle de vie complexe alternant entre une phase environnementale et une phase pathogène au sein d'hôtes mammifères. C'est d'ailleurs un des rares pathogènes professionnels du genre *Bordetella* (avec *B. hinzii*) à être capable de proliférer dans le sol (Hamidou Soumana et al., 2017).

Les bactéries du genre *Bordetella* possèdent un système à deux composants BvgAS contrôlant l'expression des facteurs de virulence. Ce système permet à la bactérie de passer de la phase virulente à la phase avirulente. Néanmoins, la phase avirulente ne se limite pas à la répression des facteurs de virulence mais comprend aussi l'expression d'un autre set de gènes, comme les éléments du flagelle nécessaires à la mobilité de la bactéries et certaines voies métaboliques permettant la croissance dans des milieux limités en nutriments (Taylor-Mulneix et al., 2017). De plus, en laboratoire ce système à deux composants détermine le passage en phase « virulente » à 37°C, température commune des mammifères, et en phase « avirulente » si la température chute en-dessous de 25°C (Melvin et al., 2014). Ce système de régulation semble donc être ce qui permet à la bactérie de s'adapter à l'hôte ou à l'environnement.

Néanmoins, ces informations ne permettent pas de comprendre quelle pression de sélection a permis à *B. bronchiseptica* d'acquérir des systèmes aussi spécifiques à la colonisation des mammifères que tout son régulon de virulence. Un nouvel élément de compréhension est arrivé avec la publication de l'article Taylor-Mulneix et al., 2017. Ce dernier met en évidence la capacité de *B. bronchiseptica* à survivre au sein des amibes. Comme vu précédemment, les amibes constituent des protozoaires prédateurs de bactéries comme source de nutriments. Nous avons également vu que les mécanismes de digestion des amibes sont extrêmement proches des mécanismes de bactéricidie des cellules

phagocytaires comme les macrophages présents au sein des mammifères. L'article met également en évidence la capacité de *B. bronchiseptica* à se disséminer en utilisant la sporulation des amibes comme *Dictyostelium discoideum* dans le but d'infecter des mammifères (figure 23). Les amibes pourraient donc constituer une étape capitale de l'évolution des Bordetelles vers l'infection d'hôtes mammifères.

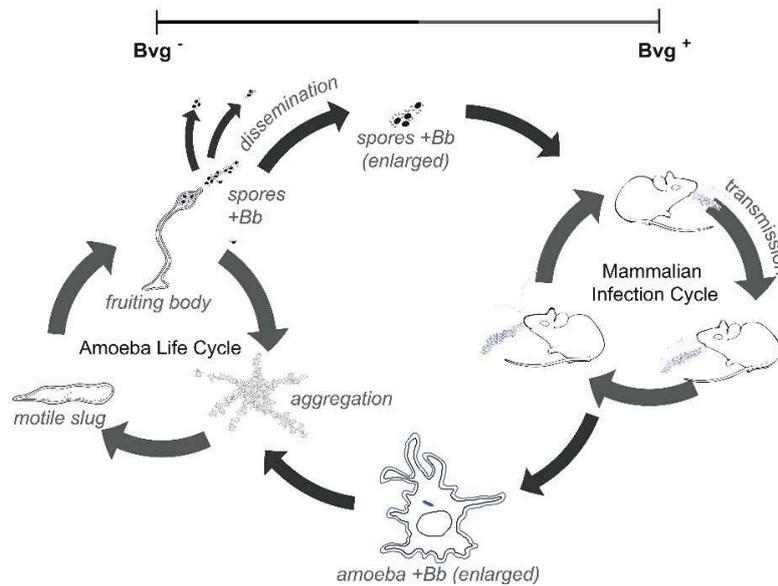


Figure 23 : Modèle de l'utilisation du système de régulation BvgAS pour passer d'un style de vie à l'autre. Les organismes impliqués sont *B. bronchiseptica*, *D. discoideum*, et les mammifères (ici une souris). La bactérie infecte l'amibe et profite de son cycle de vie pour se répandre via les fructifications disséminant des spores amibiennes embarquant des bactéries. Ces spores constituent un vecteur d'infection des mammifères. Source : Taylor-Mulneix et al., 2017

Cette étape évolutive est déjà relativement bien décrite pour d'autres organismes modèles. En effet, de nombreux pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* (José Maschio et al., 2015), *Listeria monocytogenes* (Greub and Raoult, 2004), *Legionella pneumophila* (Hägele et al., 2000; Solomon et al., 2000), *Mycobacterium* (Cirillo et al., 1997; Drancourt, 2014), *Burkholderia sp.* (DiSalvo et al., 2015), *Francisella tularensis* (Molmeret et al., 2005), ont été décrits comme pouvant vivre dans les amibes. *B. bronchiseptica* vient donc rejoindre les bactéries pathogènes ayant comme étape évolutive et réservoir environnemental les amibes. Cette capacité de survie en amibes fait écho à d'autres observations réalisées chez *B. pertussis* (et chez *B. bronchiseptica* également). Cette dernière

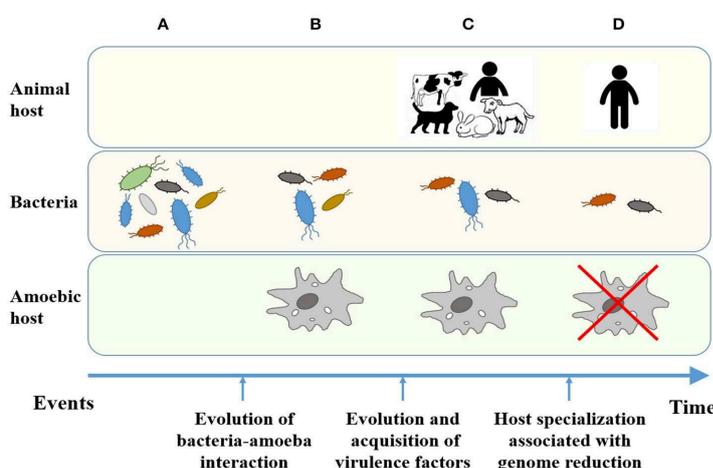


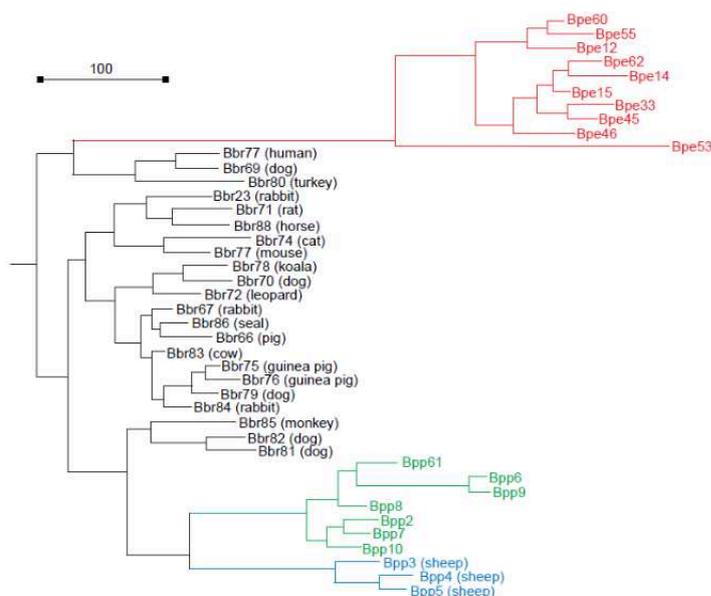
Figure 24 : Représentation de l'évolution des bactéries de l'environnement à l'hôte. A, les bactéries strictement environnementales sont autonomes et servent de source de nourriture aux amibes. B, les bactéries développent des stratégies de résistance à la phagocytose amibienne. C, utilisation des adaptations à l'amibe pour interagir avec les animaux. D, spécialisation à un hôte et perte des systèmes de survie à la phagocytose amibienne. Source : Taylor-Mulneix et al., 2017

est communément admise comme étant un pathogène extracellulaire, et pourtant quelques articles ont mis en évidence une capacité de survie au sein des cellules phagocytaires (Lamberti et al., 2013, 2008, 2010). *B. bronchiseptica* semble donc être un parfait exemple d'évolution d'une bactérie environnementale à une bactérie pathogène grâce, entre autres, à la pression de sélection appliquée par les amibes.

*B. pertussis* et *B. parapertussis* sont à l'étape évolutive suivante. Ces bactéries à génome réduit, comparé à *B. bronchiseptica*, ont perdu la capacité de survivre dans l'environnement et les amibes. Ces bactéries se sont spécialisées à leur hôte en changeant de stratégies d'infection et, de façon plus générale, de mode de vie (figure 24).

### 2.7.1.2. De l'animal à l'homme

*B. bronchiseptica*, *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont les Bordetelles pathogènes les plus présentes et étudiées, elles sont dites Bordetelles « classiques » et constituent 'le complexe bronchiseptica' (figure 25).



**Figure 25 :** Arbre phylogénétique basé sur la comparaison des génomes. L'échelle représente 100 événements d'évolution. Bpe représente les souches de *B. pertussis*, Bpp les souches de *B. parapertussis*, et Bbr les souches de *B. bronchiseptica*. Les espèces indiquées entre parenthèses constituent les hôtes de chacune des souches. Les souches n'ayant pas d'espèces indiquées infectent l'humain. Source : Bjørnstad et Harvill, 2005.

*B. bronchiseptica* est, comme nous l'avons dit précédemment, un pathogène de mammifères. Des sérologies d'animaux domestiques ont par ailleurs montrés que selon les espèces, de 25 à 100 % des individus présentent des anticorps dirigés contre des antigènes de *B. bronchiseptica*, faisant de cette bactérie un pathogène quasi ubiquitaire chez les mammifères (Bjørnstad and Harvill, 2005; Englund et al., 2003; Hoskins et al., 1998; Shashidhar et al., 1983).

Paradoxalement, l'être humain est très rarement infecté par cette bactérie. En revanche, ce dernier est colonisé par deux autres bactéries du genre *Bordetella* qui lui sont spécifiques : *B. pertussis* et *B. parapertussis* (He et al., 1998). Ces deux espèces ont perdu toute capacité de vivre dans l'environnement, contrairement à *B. bronchiseptica*, mais ce n'est pas la seule différence. En effet leurs stratégies d'infection semblent assez différentes. *B. bronchiseptica* n'est pas une bactérie très virulente (et contagieuse) pour les populations animales qu'elle infecte. En contrepartie, cette espèce est capable de persister durant des périodes très longues chez son hôte. Cette infection chronique permet à la bactérie de perdurer et d'infecter d'autres hôtes malgré son infectiosité moindre (Bjørnstad and Harvill, 2005).

*B. pertussis* et *parapertussis* ont développé une stratégie en opposition totale. Ces bactéries, surtout *B. pertussis*, présentent une infectiosité et une virulence extrêmes. Par exemple le  $R_0$  (c'est-à-dire le nombre de personnes immunologiquement naïves que peut contaminer un individu infecté) de *B. pertussis* durant l'ère pré vaccination était de 15 à 17 (Delamater et al., 2019), ce qui en fait l'une des maladies les plus contagieuses existantes (à titre de comparaison celui de la rougeole est entre 12 et 18 (Guerra et al., 2017), et celui de la variole entre 3.5 et 6 (Gani and Leach, 2001)). En parallèle à cette capacité de transmission très importante, ces bactéries provoquent une infection de relative courte durée avec une clairance par l'hôte assez rapide, en dehors des individus mourant sans parvenir à juguler l'infection (Bjørnstad and Harvill, 2005).

D'après l'hypothèse développée par Bjørnstad et Harvill en 2005, il est donc probable que *B. pertussis* et *B. parapertussis* soient apparues et aient adopté ce mode vie grâce à l'évolution de l'organisation sociale de l'être humain, dont la densité de population n'a cessé d'augmenter au fil de l'histoire (Novembre and Han, 2012). En effet, la proximité des hôtes va permettre aux bactéries capables de se transmettre facilement de perdurer dans la population en trouvant toujours de nouveaux hôtes naïfs. À l'inverse, dans une population de faible densité il est préférable pour les pathogènes de persister dans leur hôte pour des périodes longues s'ils ne peuvent pas en coloniser rapidement de nouveaux. L'article de 2005

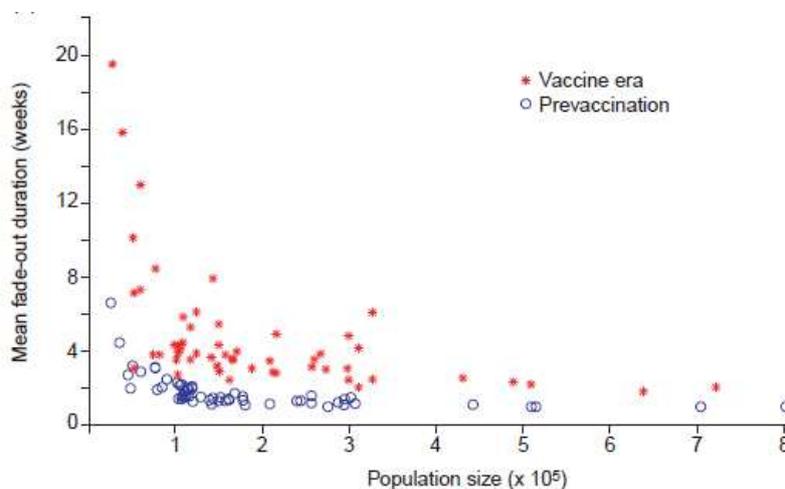


Figure 26 : Représentation des périodes sans cas de coqueluche recensés en fonction de la taille des populations avant et pendant la vaccination. Source : Bjørnstad et Harvill en 2005

précédemment cité s'appuie sur les données d'un article de Rohani et al.(2000) mettant en évidence une corrélation inverse entre la densité de population et la durée des périodes sans cas de coqueluche au sein de villes d'Angleterre et du Pays de Galles.

L'article de Diavatopoulos et al., 2005, a montré que les deux espèces, *B. pertussis* et *B. parapertussis*, sont issues d'un ancêtre commun proche de l'actuel *B. bronchiseptica*, mais que les deux émergences se sont déroulées indépendamment. La comparaison des séquences de 7 gènes de ménage ainsi que l'analyse des différents éléments génétiques mobiles comme les séquences d'insertion ont permis de déterminer que *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont issues de deux sous-groupes de *B. bronchiseptica* différents et qu'il s'agit bien de deux événements évolutifs différents.

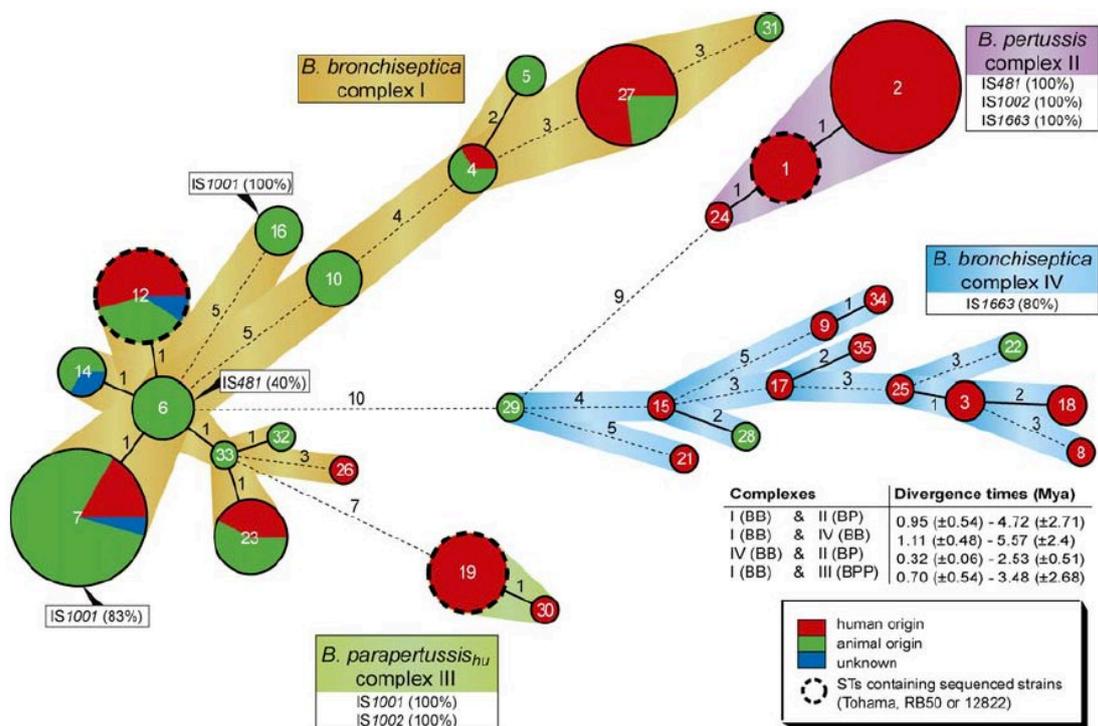


Figure 27: Arbre de « minimum spanning » des différentes souches des trois espèces *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, et *B. pertussis*. Cet arbre est construit en utilisant 7 gènes de ménage. Le chiffre sur les lignes pointillées représente le nombre de loci divergents. Les cercles représentent des groupes ayant les mêmes types de séquences (35 types identifiés dans cette étude) et leur taille représente le nombre de souches présentes avec ce type de séquences. Les couleurs représentent les sources des isolats. Source : Diavatopoulos et al., 2005

D'après les résultats précédemment décrits, nous pouvons dire que *B. pertussis* et *B. parapertussis* ont émergé de *B. bronchiseptica*. Ces événements étaient indépendants mais ces deux bactéries ont tout de même adopté un mode d'infection et une cible, l'humain, similaires. *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont certes optimisées pour l'homme mais *B. bronchiseptica* demeure une bactérie possédant tout l'arsenal de virulence nécessaire à coloniser l'homme. On a vu qu'elle possédait même la capacité de persister dans les fosses nasales de ses hôtes à long terme. Par conséquent, il devrait y avoir des infections humaines,

or ces infections sont extrêmement rares. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces observations. La première est que *B. bronchiseptica* est simplement incapable d'infecter l'homme, mais cette hypothèse est facilement réfutable. En effet, le séquençage des génomes des différentes Bordetelles n'ont pas mis en évidence d'acquisition de gènes durant la spéciation de bronchiseptica vers pertussis (ou parapertussis) (Parkhill et al., 2003). De plus il existe quand même des cas d'infection par *B. bronchiseptica* (Gupta et al., 2019). La seconde hypothèse repose sur le principe de Gause (Hardin, 1960). Ce principe d'écologie explique la dynamique des populations et propose que deux populations ne peuvent pas survivre au sein d'une même niche écologique si leurs exigences sont similaires. Ici, c'est une version quelque peu modifiée de ce principe qui s'applique. En effet, les bactéries ne sont pas en compétition directe : l'une ne va pas tuer l'autre ou entraîner un retard de croissance. De même, il n'y a pas de ressource limitante dans l'hôte humain pouvant expliquer l'avantage de l'une des bactéries sur l'autre. Dans ce cas, c'est une compétition indirecte au travers de l'hôte qui s'exerce. Les trois espèces étant extrêmement proches d'un point de vue génétique, il est possible que l'infection par l'une d'entre elle entraîne l'apparition de défenses immunitaires adaptatives ciblant des facteurs de virulence communs aux différentes espèces. Dans ce contexte, c'est bien *B. pertussis* et *B. parapertussis* qui semblent avoir l'avantage de par leur stratégie d'infection. Une maladie courte et une propagation rapide permettent à ces bactéries de persister dans la population. Une grande partie de la population humaine possédera donc des défenses immunitaires orientées contre les facteurs de virulence du genre Bordetelle. Par conséquent, *B. bronchiseptica* se verra désavantagée par sa stratégie d'infection causant des infections chroniques avec une transmission moindre.

Cette hypothèse peut expliquer la situation actuelle, mais pas la manière dont les pathogènes humains ont pris le dessus dans la population. En effet, il est probable qu'avant l'émergence de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* infectait couramment les humains au même titre que tous les autres mammifères. Par conséquent, lors de son émergence, *B. pertussis* aurait dû rencontrer les mêmes problèmes que *B. bronchiseptica* aujourd'hui. Les défenses immunitaires induites par les infections à *B. bronchiseptica* auraient dû empêcher la nouvelle espèce de coloniser cette niche écologique que constitue l'homme. Néanmoins, la comparaison des génomes (Park et al., 2012; Parkhill et al., 2003) a mis en évidence quelques différences qui pourraient expliquer ce phénomène. L'une des plus connues concerne le LPS de ces bactéries. Ce composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue une défense importante contre divers stress venant du milieu extérieur. Ces LPS sont constitués d'un lipide d'ancrage (le lipide A) et de polysaccharides, dont l'antigène O. *B. bronchiseptica* possède un LPS standard tandis que *B. pertussis* possède des Lipo-oligosaccharides (Burns et al., 2003), ou LOS dépourvu d'antigène O, ce dernier étant très immunogène. Les LPS ne constituent pas le seul exemple. Les protéines composant le flagelle bactérien sont aussi extrêmement immunogènes. Il apparaît que *B. pertussis* a perdu de nombreux gènes impliqués dans la formation du flagelle et ceux encore présents ne sont quasiment pas exprimés. Ces différences entre les espèces

pourraient constituer une des évolutions permettant d'échapper partiellement à l'immunité induite par l'espèce concurrente. Ces indices indiquent que *B. pertussis* aurait suffisamment modifié son profil immunologique pour échapper en partie à l'immunité induite par *B. bronchiseptica* chez l'homme et ainsi coloniser cette niche écologique.

Néanmoins, une interrogation persiste : comment *B. pertussis* et *B. parapertussis* persistent-elles dans la même niche ? Eh bien de la même manière ! En effet, si l'hypothèse de l'histoire évolutive des Bordetelles classiques est vraie, *B. bronchiseptica* a infecté l'homme puis *B. pertussis* a émergé en adoptant une stratégie infectieuse différente et en modifiant suffisamment son profil antigénique pour échapper aux défenses induites par *B. bronchiseptica*. Cette dernière a donc quasiment disparu des infections humaines. Par la suite *B. parapertussis* a émergé à son tour de *B. bronchiseptica* en adoptant une stratégie d'infection similaire à *B. pertussis*. Et cette bactérie persiste dans cette niche malgré la présence de sa concurrente grâce à la méthode décrite précédemment de modification du profil antigénique. Par exemple lorsque *B. pertussis* possède un LOS, *B. parapertussis* possède un LPS entier. En effet, *B. bronchiseptica* ayant été évincée de cette niche écologique, il n'était plus utile d'évoluer vers un LPS tronqué. Par conséquent les deux bactéries possèdent des capacités de transmission et de colonisation relativement similaires mais l'immunité induite par l'une des deux ne croise que partiellement avec l'autre.

Les hypothèses sur l'évolution des Bordetelles dites « classiques » décrites ici sont issues, pour la plupart, du groupe de recherche d'Eric T. Harvill de l'université de Géorgie aux États-Unis (Bjørnstad and Harvill, 2005; Linz et al., 2019). Ces hypothèses sont étayées par différentes données, observations et articles (Burns et al., 2003; Diavatopoulos et al., 2005; Park et al., 2012; Parkhill et al., 2003), etc. Néanmoins, l'un des arguments souvent repris dans ces différents travaux et présenté comme une évidence supplémentaire pose question. Le cas de la toxine pertussique (PTX) demeure intrigant quant à sa place dans cette chronologie évolutive. Cette toxine et son système de sécrétion font partie des plus complexes présents chez les bactéries. Seules les trois espèces de Bordetelles « classiques » possèdent les gènes correspondants. Aucune information ou étude n'a, à ce jour, permis de déterminer l'origine de ce système si complexe et absent des autres Bordetelles. Au sein des travaux de recherche décrits précédemment, le cas de la toxine pertussique est souvent cité au même titre que l'argument sur l'évolution LPS-LOS. En effet, bien que les trois Bordetelles possèdent ce locus génétique, seul *B. pertussis* exprime cette toxine (Aricò and Rappuoli, 1987). Le fait que *B. parapertussis* n'exprime pas la toxine semble cohérent avec l'hypothèse d'une émergence chez l'humain postérieure à celle de *B. pertussis* dans le but d'éviter l'immunité croisée. En revanche, le plus intrigant est que *B. bronchiseptica* n'exprime pas non plus cette toxine. Ce fait semble donc en contradiction avec la chronologie évoquée précédemment. Le locus de la toxine est conservé au sein de tous les isolats de *B. bronchiseptica* séquencés excepté dans quelques rares exceptions (Antoine et al., 2000). Et de nombreux articles ont mis en évidence l'impact pléiotrope qu'a cette toxine lors de l'infection de *B. pertussis* (Locht et al., 2011).

*B. bronchiseptica* étant la première des trois espèces à être apparue, pourquoi avoir renoncé à l'usage de cette toxine ? L'une des hypothèses les plus simples pourrait être qu'après l'apparition de *B. pertussis*, qui exprime fortement la toxine, les souches de *B. bronchiseptica* qui infectaient l'humain auraient évolué pour réprimer ces gènes de manière à échapper à la pression immunitaire induite par *B. pertussis*. Cette hypothèse s'avère relativement peu convaincante de par le fait que cet opéron est silencieux dans toutes les souches de *B. bronchiseptica* qui ont été étudiées, quel que soit leur hôte. Cela signifierait que toutes les souches de *B. bronchiseptica* actuelles auraient évolué à partir d'une souche ancestrale ayant colonisé l'homme en parallèle de *B. pertussis*. Or, l'histoire évolutive mise en évidence par les analyses de la dérive des génomes ne semble pas aller dans ce sens. La répression de ces gènes chez *B. bronchiseptica* constitue donc une ombre majeure dans l'histoire évolutive des Bordetelles. Néanmoins, il n'est pas possible d'exclure la possibilité que *B. bronchiseptica* exprime cette toxine dans un contexte bien précis encore inconnu et pour un usage potentiellement différent de celui de *B. pertussis*. Enfin il est aussi possible que la production d'une très faible quantité de cette toxine confère à *B. bronchiseptica* un avantage suffisant pour le maintien de ces gènes, et que c'est donc *B. pertussis* qui aurait évolué par accumulation de mutations au niveau du promoteur de l'opéron entraînant une surexpression. Certaines informations sur le mode de vie de *B. bronchiseptica* pourraient étayer cette théorie. *B. bronchiseptica* est capable de survivre au sein des amibes mais également des macrophages (Rivera et al., 2019) contrairement à *B. pertussis* qui semble avoir perdu une partie des gènes codant des protéines utiles à la survie dans les cellules phagocytaires. Parallèlement à cela, il s'avère que la toxine pertussique (PTX) exerce divers effets sur de nombreuses cellules de l'hôte, dont l'inhibition du recrutement des neutrophiles, cellules phagocytaires particulièrement efficaces contre *B. pertussis*. On pourrait donc supposer que *B. bronchiseptica* a considérablement moins besoin de la toxine pertussique que *B. pertussis*, et que ce serait donc *B. pertussis* qui a évolué pour surexprimer cette toxine.

Ces différentes hypothèses ne sont que des conjectures mais permettent de mettre en perspective des « dogmes » considérés comme acquis malgré les quelques failles qu'ils contiennent.

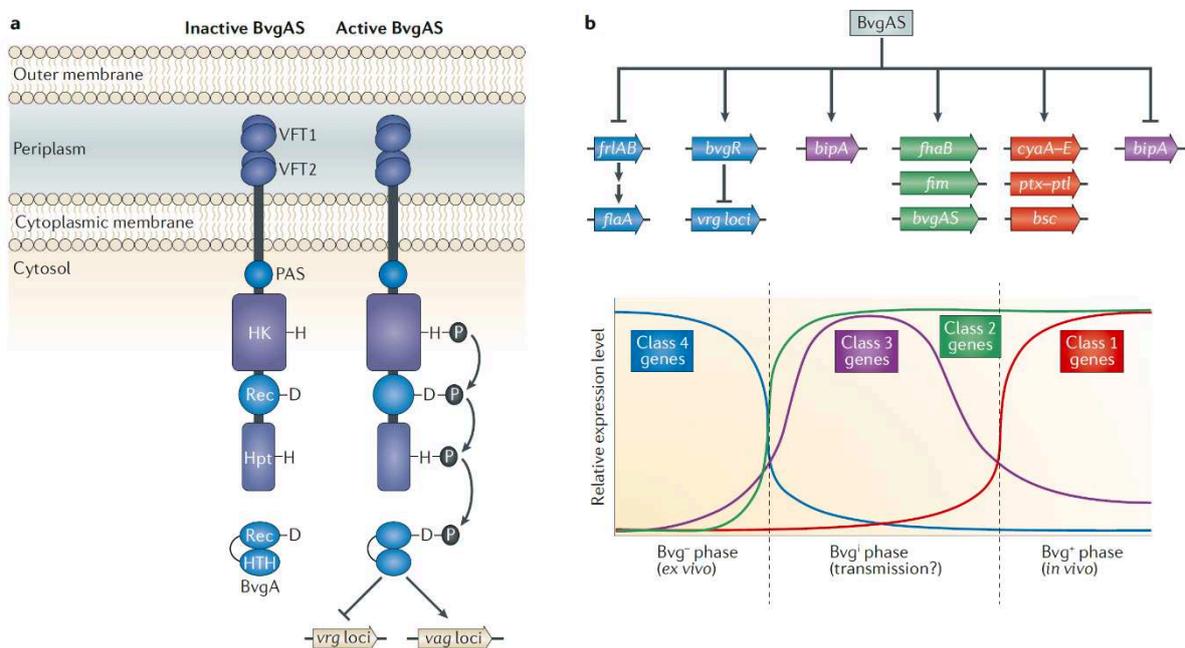
### 2.7.1.3. Spécialisation à l'humain de *B. pertussis*

*B. pertussis* est, comme nous l'avons vu précédemment, une bactérie pathogène à hôte restreint. Elle présente la particularité de s'être totalement spécialisée dans l'infection d'un seul mammifère : l'humain. Cette spécialisation passe évidemment par les stratégies d'infection déjà décrites, utilisant la structure sociale humaine comme vecteur de transmission, mais aussi de nombreux facteurs de virulence particulièrement bien adaptés aux interactions avec les cellules de l'hôte et au détournement de son métabolisme dans un but d'économie d'énergie.

#### 2.7.1.3.1. Les facteurs de virulence

##### 2.7.1.3.1.1. Système à deux composants BvgAS et autres régulations

L'évolution a doté *B. pertussis* de très nombreux facteurs de virulence faisant de cette bactérie un « pathogène professionnel » extrêmement contagieux. En effet, le régulon de virulence de *B. pertussis* comporte plus de 200 gènes, qui sont contrôlés de façon coordonnée par un système à deux composants nommé **BvgAS** (Melvin et al., 2014).



*Figure 28* : Sur le panel de gauche on trouve une représentation schématique de la structure du système à deux composants BvgAS. BvgS se compose de deux domaines VFT (venus flytrap) suivis du domaine PAS, puis Histidine kinase (HK), le domaine receveur (Rec) et se termine par le domaine histidine phosphoryl transférase (Hpt). Sur le panel de droite est représenté la variation de phase du système avec les différentes classes de gènes régulés. Source : Melvin et al., 2014

Les systèmes à deux composants sont des systèmes sensoriels très répandus chez les bactéries. Ils ont la capacité de sonder l'environnement de la bactérie et d'entraîner diverses réponses adaptatives. Dans le cas de *B. pertussis*, BvgS constitue le capteur-kinase du système. C'est une protéine possédant plusieurs domaines de perception de signaux ainsi qu'un domaine histidine-kinase cytoplasmique qui enclenche une cascade de phosphorylation. BvgA est un activateur transcriptionnel.

Chez *B. pertussis* le système BvgAS est actif par défaut puisqu'à 37 °C BvgS ne nécessite pas de ligand pour entraîner l'auto-phosphorylation de son domaine kinase. Ce groupement phosphate est ensuite transféré jusqu'au régulateur BvgA qui possède un domaine de liaison à l'ADN spécifique des régions promotrices des gènes du régulon de virulence. Ces gènes, qui codent notamment les toxines et les adhésines de *B. pertussis* ainsi que leurs machineries de sécrétion, sont appelés « virulence-activated genes » (*vags*). Parmi ceux-ci se trouve BvgR, qui régule de façon indirecte les « virulence-repressed genes » (*vrgs*), des gènes peu nombreux et de fonction non encore caractérisée. La phase active du système BvgAS est appelée phase de virulence ou phase Bvg<sup>+</sup>. En laboratoire, BvgS répond à certains stimuli comme les ions nicotines et sulfates ainsi qu'à des températures basses (< 25°C) en interrompant sa phosphorylation. Les bactéries passent donc dans la phase Bvg<sup>-</sup>, qui est la phase avirulente. Il existe également une phase intermédiaire, la phase Bvg<sup>i</sup>, durant laquelle certaines adhésines sont exprimées, mais pas les toxines. Les signaux auxquels BvgS répondraient *in vivo* ne sont pas connus (Melvin et al., 2014).

Il existe d'autres systèmes intervenant dans la régulation de certains facteurs de virulence et voies métaboliques impliqués dans la colonisation : les régulateurs RisAK et PlrRS (Gestal et al., 2019).

Le système à deux composants RisAS du genre *Bordetellae* est un orthologue du système EnvZ/OmpR, présent chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et connu pour réguler l'osmolarité, la motilité et dans certains cas la virulence (Gestal et al., 2019; Tipton and Rather, 2017). La particularité de *B. pertussis* réside dans son senseur RisS tronqué et donc non fonctionnel. Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence que RisA n'est pas un régulateur orphelin chez *B. pertussis*, mais a un partenaire en la protéine de Risk. Risk va phosphoryler RisA et ce dernier va déclencher la régulation différentielle de nombreux gènes en fonction de la concentration cellulaire de c-di-GMP, qui se fait hydrolyser en GMP par l'activité de la protéine BvgR, elle-même codée par un *vag*. De plus RisA exerce un contrôle sur des gènes régulés par BvgAS en phase Bvg<sup>-</sup>. Ces deux systèmes de régulation sont donc imbriqués de manière complexe et encore partiellement incomprise (Coutte et al., 2016; Gestal et al., 2019).

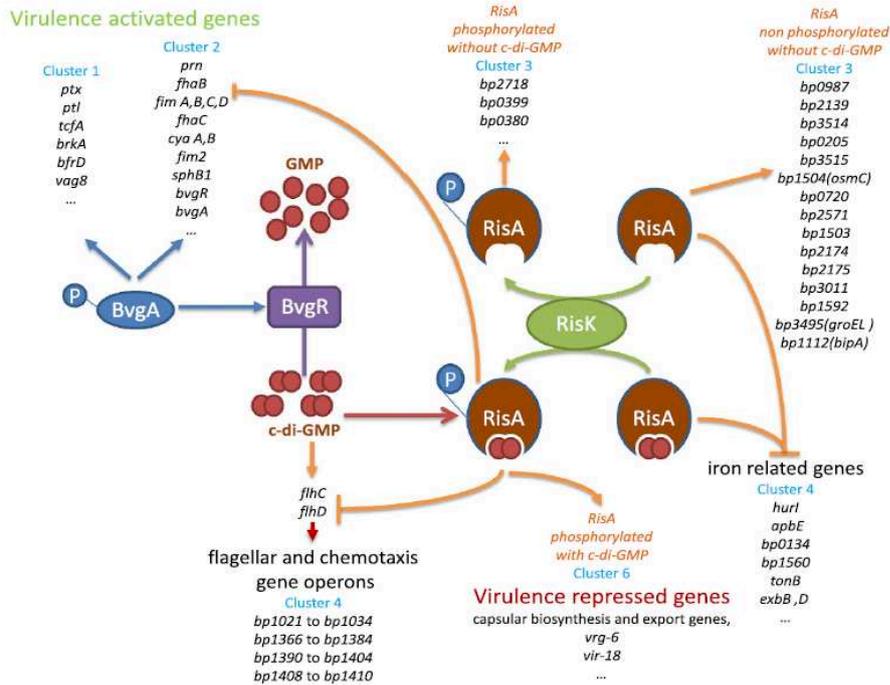


Figure 29 : Représentation schématique des modalités de la régulation du système RisAK. Les gènes impliqués sont différenciellement régulés en fonction de l'état de phosphorylation de RisA et de sa liaison au C-di-GMP.

Source : Coutte et al., 2016

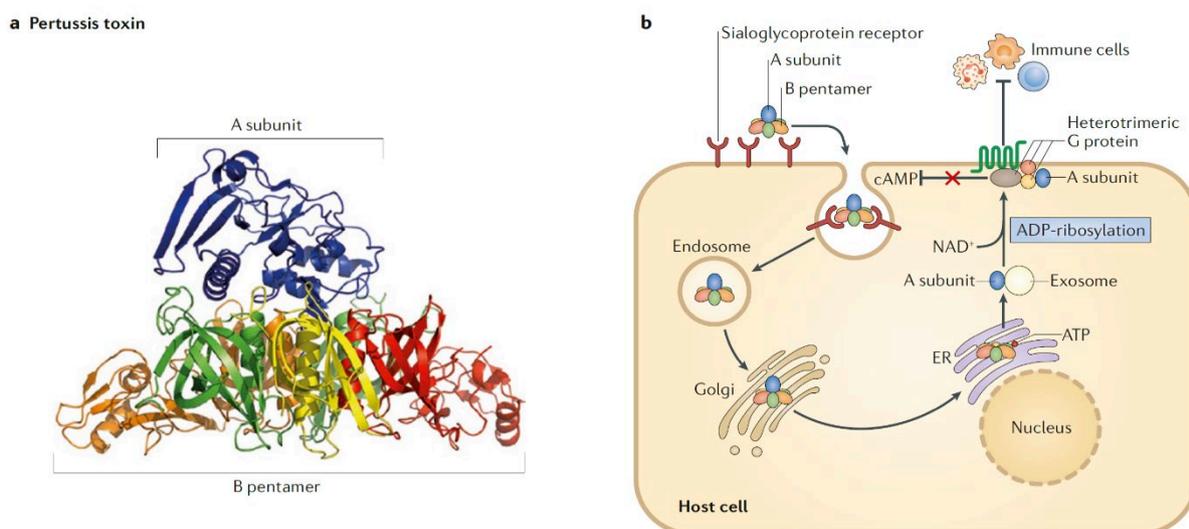
Enfin le système à deux composants PlrRS découvert dans le genre *Bordetella* semble impliqué dans la colonisation des parties basses du tractus respiratoire. En effet les délétants pour ce système présentent un défaut de colonisation du poumon des souris (Kaut et al., 2011). Ce système réagit à la concentration en CO<sub>2</sub> et va moduler l'expression de certains systèmes de virulence. Il apparait que cette modulation serait utile pour minimiser la réponse inflammatoire de l'hôte (Gestal et al., 2019).

Bien sûr, ces trois systèmes à deux composants constituent les régulateurs principaux de la virulence mais il existe aussi plusieurs systèmes Sigma/anti-Sigma régulant de nombreux aspects de la vie bactérienne et de la virulence. Par exemple BtrAS a été décrit à l'origine comme impliqué dans la régulation du T<sub>3</sub>SS. Mais il semble que ce système interagisse aussi avec la régulation de plusieurs autres facteurs de virulence comme la FHA, l'ACT, la pertactine, etc. (Gestal et al., 2019).

La régulation des systèmes de virulence au sein du genre *Bordetella* est donc très complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. Le schéma global de régulation de l'expression génétique chez *B. pertussis* échappe encore à une compréhension complète.

### 2.7.1.3.1.2. Toxines majeures

L'une des premières toxines identifiées chez *B. pertussis* est la **toxine pertussique (PTX)** (Morse and Morse, 1976). La découverte de cette toxine fut à l'origine d'une théorie faisant de la coqueluche une toxi-infection au même titre que le choléra ou la diphtérie (Melvin et al., 2014). Néanmoins, de nombreux travaux ont mis en évidence que la toxine pertussique, bien qu'importante, n'est pas le pilier de la pathogénèse de *B. pertussis* mais seulement un élément parmi de nombreux autres (Locht et al., 2001).



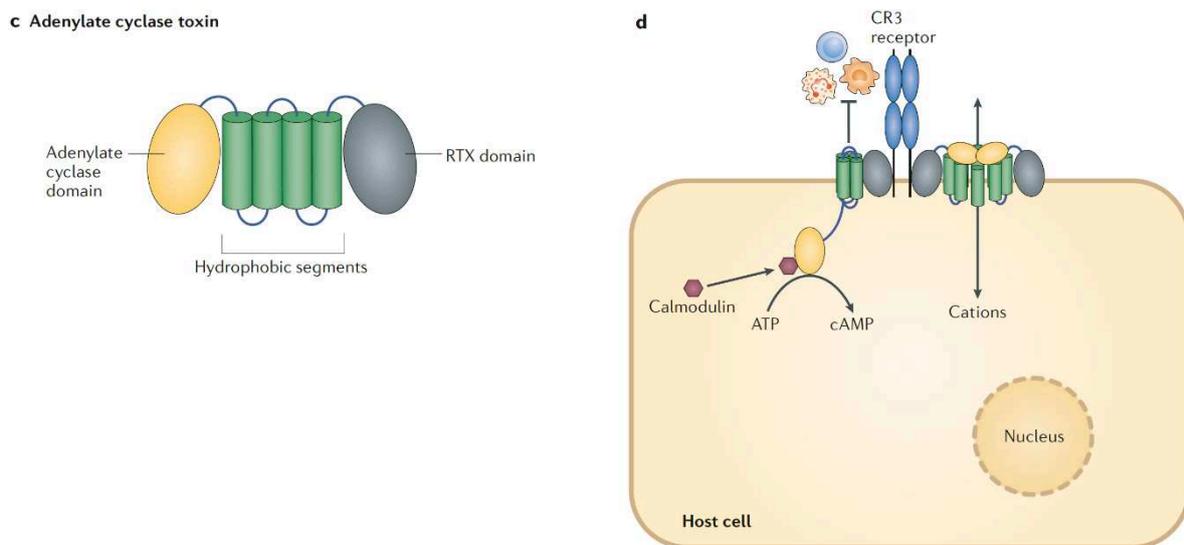
*Figure 30 : Le panel de gauche présente la structure de la toxine pertussique. Elle se compose de deux sous-unités A et B. La sous-unité A est composée d'un monomère portant l'activité enzymatique de la toxine. La sous-unité B est composée d'un pentamère permettant l'adressage de la toxine. Le panel de droite montre le trafic intracellulaire de la toxine. Source : Melvin et al., 2014*

La PTX est une toxine très complexe composée de plusieurs sous-unités pour une taille totale de 105 kDa (Locht et al., 2011). C'est une Holotoxine de type AB. La sous-unité A possède l'activité catalytique d'ADP-ribosylation. La sous-unité B est un pentamère permettant le transport et la liaison aux membranes des cellules cibles. La cible de l'activité enzymatique de la protéine est la sous-unité alpha de la protéine  $G_i$ . Cette protéine se lie au GTP dans le but de permettre la transduction de signaux entraînant une régulation négative de l'activité adénylate cyclase de la cellule hôte. Après l'ADP ribosylation de la protéine par la PTX, celle-ci perd son rôle de régulateur entraînant une accumulation d'AMP cyclique dans la cellule cible (Locht et al., 2011).

Cette toxine possède son propre système de sécrétion codé par les gènes *ptI*. Il s'agit d'un système de type IV, un type de système similaire à la machinerie conjugative permettant la sécrétion d'ADN et de protéines (Kotob et al., 1995; Melvin et al., 2014).

La PTX possède un nombre important d'effets et de cibles dans l'organisme hôte. Elle se lie aux acides sialiques de certaines glycoprotéines. Cette liaison entraîne une endocytose puis une translocation via l'appareil de Golgi à destination du réticulum endoplasmique. Ici, la sous-unité A se détache et continue son transit dans le cytoplasme via les exosomes à destination de la face interne de la membrane plasmique, où se trouvent les protéines G (Locht et al., 2011; Melvin et al., 2014).

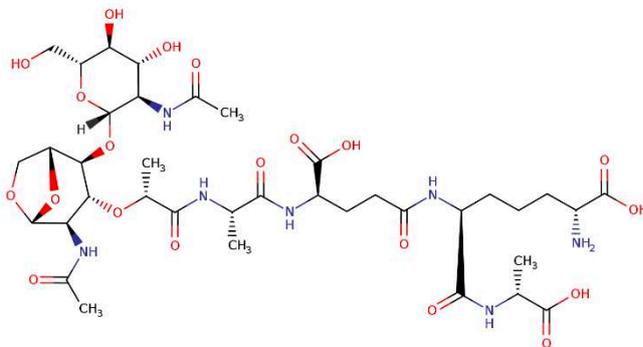
Les activités de la PTX et notamment ses effets sur le recrutement de certains types cellulaires seront traités dans les sections suivantes.



*Figure 31 : Le panel de gauche présente la structure schématique de l'ACT, avec le domaine catalytique, les segments hydrophobes et le domaine RTX. Le panel de droite présente l'adressage et le trafic de la toxine dans la cellule hôte. Source : Melvin et al., 2014*

La seconde toxine majeure de *B. pertussis* est l'**adénylate cyclase (ACT)**. Cette toxine fait partie de la famille RTX (repeats in toxin). L'ACT est codée par un unique gène mais est sécrétée par un système de Type I, codée par trois autres gènes. Cette protéine se compose de deux parties. Le premier contient le domaine RTX ainsi que 4 segments hydrophobes. Cette partie va permettre l'accrochage aux cellules cibles ainsi que la formation d'un pore dans la membrane plasmique (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003; Melvin et al., 2014). Le second domaine possède une activité catalytique d'adénylate cyclase dépendant de la calmoduline, qui transforme l'ATP en AMP cyclique. Cette toxine entraîne donc un déséquilibre ionique dû au pore, ainsi qu'une dérégulation des voies de signalisation de la cellule cible due à l'accumulation d'AMP cyclique et la déplétion d'ATP par l'activité enzymatique de la protéine.

Parmi les toxines majeures de *B. pertussis*, on trouve également la **cytotoxine trachéale (TCT)**. Il ne s'agit pas d'une toxine protéique mais d'un disaccharide-tétrapeptide produit lors du remodelage du peptidoglycane bactérien. La plupart des bactéries à Gram négatif recyclent ce fragment, mais pas *B. pertussis*. Cette toxine est relarguée en grande quantité par la bactérie et va induire une réponse pro-inflammatoire (Heiss et al., 1993) ainsi que la surexpression de l'oxyde nitrique synthase (Flak and Goldman, 1999) déclenchant in fine la destruction des cellules ciliées de l'arbre respiratoire supérieur. Cette cascade de régulation est déclenchée par la TCT via le récepteur intracellulaire NOD<sub>1</sub>, particulièrement sensible au peptidoglycane chez la souris, tandis que dans l'hôte humain les récepteurs NOD<sub>1</sub> semblent peu sensibles à cette toxine. Les mécanismes de toxicité chez l'hôte humain passent probablement par d'autres récepteurs non identifiés (Magalhaes et al., 2005; Melvin et al., 2014).



*Figure 32 : Structure semi développée de la toxine cytotrachéale (TCT) de *B. pertussis* issu d'un fragment de peptidoglycane non recyclé produit lors du remodelage de la paroi bactérienne. Source : PubChem*

Enfin, la dernière toxine qui sera présentée ici est la **toxine dermonécrotique (DNT)**. C'est également l'une des toxines les moins caractérisées. Des recherches ont mis en évidence l'activité enzymatique de la protéine ainsi que ses effets sur les cellules hôtes. Néanmoins, son rôle biologique est mal compris car cette protéine n'est pas sécrétée par la bactérie, elle reste donc prisonnière du cytoplasme bactérien (Melvin et al., 2014). Actuellement, aucune étude n'a su mettre en évidence la méthode d'administration de cette protéine (Cowell et al., 1979). Il est également possible que le rôle biologique de cette protéine prenne place dans le cytoplasme bactérien car les Bordetelles ne sont pas les seules bactéries possédant une DNT cytoplasmique dépourvue de signal et de machinerie de sécrétion. C'est également le cas de *Pasteurella multocida* (Nakai et al., 1985).

Son nom vient du fait que lorsque l'on inocule à des souris par voie sous-cutanée de petites doses de cette toxine, on observe une nécrose massive de la peau (Cowell et al., 1979). La DNT est une trans-glutaminase qui active les Rho GTPase des cellules cibles perturbant leur fonctionnement (Melvin et al., 2014; Schmidt et al., 1999).

### 2.7.1.3.1.3. Adhésines majeures

L'**Hémagglutinine filamenteuse (FHA)**, est une des adhésine majeures du genre *Bordetella*. C'est une grande protéine de conformation allongée dont la forme immature, FhaB, fait 370 kDa, alors que la FHA de 230 kDa résulte de maturations protéolytiques de FhaB. Cette adhésine traverse la membrane interne via la machinerie Sec. Puis c'est le transporteur FhaC qui permettra le passage de la membrane externe. Ensemble, FhaB et FhaC forment une voie de sécrétion à deux partenaires (TPS pathway) appelée système de sécrétion de type Vb (Leo et al., 2012). La FHA médie l'adhérence aux cellules ciliées de l'arbre respiratoire. Cette protéine est essentielle dans les tests d'adhérence *in vitro* (Melvin et al., 2014), pourtant *B. pertussis* possède de nombreuses autres adhésines, suggérant que d'autres stratégies d'adhérence sont nécessaires à la colonisation du tractus respiratoire.

La **pertactine (PRN)** est une adhésine appartenant à la famille des auto-transporteurs (Leo et al., 2012). Cette adhésine adopte une conformation en hélice beta comme la FHA et de nombreuses autres adhésines (Melvin et al., 2014). La particularité de cette adhésine reste que son rôle biologique est relativement peu compris. En effets, certaines études *in vitro* ont obtenu quelques évidences d'un rôle dans l'adhérence aux cellules ciliées de l'épithélium (Edwards et al., 2005). Néanmoins, le rôle *in vivo* de la pertactine n'est pas clair car sa délétion ne semble pas affecter la colonisation par *B. pertussis* (Khelef et al., 1994). Il est donc possible que cette adhésine ne joue pas un rôle crucial dans la colonisation. Récemment, certaines souches cliniques montrent la perte de l'expression de la pertactine (Hegerle et al., 2014; Melvin et al., 2014).

Les **fimbriae** sont des pili de type I. Leur assemblage et sécrétion se font grâce à trois protéines, FimBCD. FimD constitue la première sous-unité à être assemblée et est donc à l'extrémité distale du pilus. FimC est la protéine de membrane externe permettant la translocation du pilus. FimB est la protéine chaperonne permettant l'assemblage des monomères du pilus. Ces monomères sont constitués des protéine Fim2 et Fim3 (Melvin et al., 2014; Scheller and Cotter, 2015).

Les fimbriae sont impliqués dans l'adhérence aux cellules ciliées de l'hôte. Il semble également que ces derniers fonctionnent de concert avec la FHA dans le but d'adhérer mais également de réprimer une partie des réponses locales de l'hôte (Scheller and Cotter, 2015).

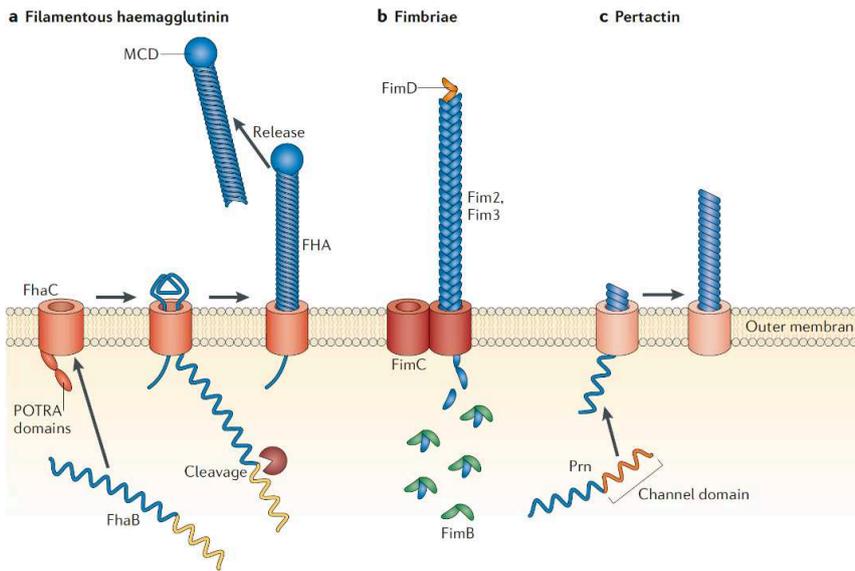


Figure 33: Schéma d'assemblage et de sécrétion de la FhA (a), des Fimbriae (b), et de la Pertactine (c). Le schéma ne traite que de la sécrétion au travers de la membrane externe. Source : Melvin et al., 2014

#### 2.7.1.3.1.4. Autres effecteurs

*B. pertussis* possède de nombreux autres effecteurs utiles à la pathogénèse de la bactérie. Ici, nous ne ferons pas une liste exhaustive mais donnerons seulement un exemple.

Certains de ces effecteurs sont sécrétés via un **système de sécrétion de type III (T<sub>3</sub>SS)**. Ces T<sub>3</sub>SS sont des structures très complexes traversant les deux membranes bactériennes et s'apparentant à une aiguille permettant l'injection dans les cellules cibles de différents effecteurs.

L'un des mieux caractérisés chez les *Bordetella* est **BteA**. Ce dernier a surtout été étudié chez *B. bronchiseptica* pour laquelle il a été montré que la sécrétion de BteA dans le milieu de culture est dépendant de la présence du système de type III (Kuwae et al., 2006). BteA entraîne une nécrose de certains types cellulaires *in vitro* (Kuwae et al., 2006). Pourtant les expériences *in vivo* en modèle murin n'ont pas montré de nécrose des cellules ciliées avec lesquelles la bactérie est en contact rapproché (Nagamatsu et al., 2009). Une étude plus récente a mis en évidence l'action de BteA sur les mécanismes de signalisation du cytosquelette d'actine, induisant la nécrose de certains types cellulaires mais également l'inhibition de la phagocytose chez les macrophages (Kuwae et al., 2016).

### 2.7.1.3.2. Immunomodulation

L'une des adaptations à son hôte la plus aboutie chez *B. pertussis* est son pouvoir immunomodulateur. Cette bactérie est un pathogène obligatoire capable d'infecter un seul hôte et dans la niche très restreinte qu'est la surface de l'épithélium de l'arbre respiratoire supérieur. Cette surface constitue l'interface entre l'hôte et le milieu extérieur et par conséquent, ce tissu est extrêmement bien défendu au travers d'un système immunitaire cellulaire et humoral dont la pression de sélection a forcé l'adaptation de *B. pertussis*.

Parmi les nombreuses stratégies d'échappement et de modulation du système immunitaire, la première consiste à ne pas déclencher les systèmes de défense de l'hôte. Les garants de cette surveillance sont en premier lieu les cellules de l'immunité innée comme les macrophages (et leur variante alvéolaire dans le cas des poumons) ainsi que les cellules dendritiques très présentes dans les muqueuses (de Gouw et al., 2011; Gestal et al., 2019). Ces cellules possèdent des systèmes de détection appelés PRRs (pour récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires). Ces PRRs vont reconnaître des motifs spécifiques appelés PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes). Il existe plusieurs catégories de PRRs mais les deux principales sont les TLRs (toll-like récepteur) qui sont des récepteurs membranaires et les NOD-like récepteurs qui sont cytoplasmiques et solubles (Kawai and Akira, 2009). Mais il existe également des composés solubles et extracellulaires de reconnaissance et de neutralisation des pathogènes, comme les protéines du complément dans le sérum ou les protéines du surfactant dans les poumons.

Ici, nous nous intéresserons au TLR<sub>4</sub>. Ce dernier permet la détection des lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont des composants essentiels de la face extérieure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ces molécules complexes se composent de trois parties : l'antigène O qui est constitué d'une répétition de 2 à 40 sucres, d'un core oligosaccharidique et enfin d'un lipide A enchâssé dans la membrane (figure 34).

Les cas des LPS chez *B. pertussis* est très particulier. Cette dernière possède un antigène O tronqué et donc des LPS sensiblement plus courts appelés lipo-oligosaccharides (LOS). Chez *B. pertussis*, ces LOS présentent la particularité de ne pas être reconnus par les protéines A et D du surfactant (Schaeffer et al., 2004a, 2004b) et il est probable que cette modification affecte le reste de l'immunité humorale.

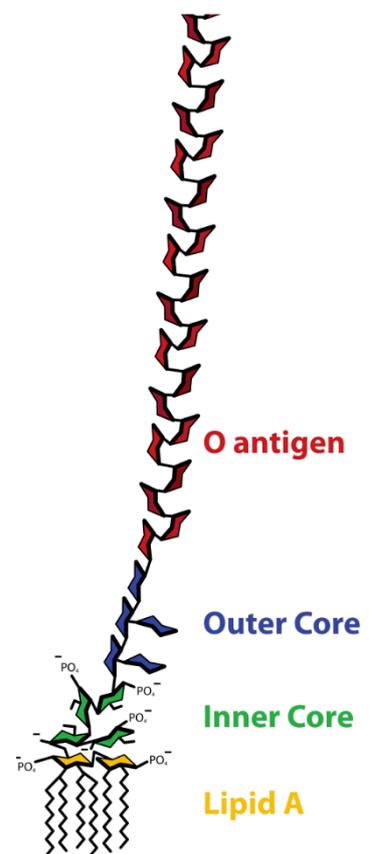


Figure 34 : Schéma de la structure d'un LPS bactérien « Classique ». Source : Wikipedia

L'échappement aux protéines du surfactant n'est pas la seule particularité des LOS de *B. pertussis*. En effet, le lipide A joue un rôle important dans la reconnaissance par les TLR<sub>4</sub> mais c'est aussi lui qui est au cœur de l'activité endotoxique des LPS bactériens. *B. pertussis* a inactivé via une séquence d'insertion certaines enzymes comme PagP, une palmitoyl transférase responsable de l'ajout d'un acide palmitique dans le lipide A. Il a été montré que la réactivation de ce gène entraîne une augmentation de l'endotoxité des LOS de *B. pertussis* (Geurtsen et al., 2006). Cette modification (ou plutôt absence de modification) permet donc d'échapper partiellement à la détection par le système immunitaire de l'hôte. Néanmoins, il existe un autre mécanisme de modification des LPS chez *B. pertussis* (de Gouw et al., 2011). Celui-ci se produit uniquement en phase Bvg<sup>+</sup> c'est-à-dire en phase active de la virulence, à 37°C. Il s'agit d'une substitution du phosphate du lipide A par un résidu glucosamine (Marr et al., 2008). Étrangement cette modification entraîne une légère augmentation du pouvoir endotoxique des LOS de *B. pertussis* et de l'induction des réponses pro-inflammatoires par sécrétion d'IL6, IL1beta et de TNF alpha (Geurtsen et al., 2009; Marr et al., 2010). Des études plus récentes ont permis de comprendre l'avantage qu'accorde cette modification à la bactérie. Il se trouve que l'ajout d'un résidu glucosamine à la place du phosphate du lipide A permet d'augmenter la résistance de la membrane externe aux perturbations engendrées par les peptides antimicrobiens cationiques (Shah et al., 2014).

En ce qui concerne les LPS, tout est une question d'équilibre entre la 'défectibilité' par le système immunitaire de l'hôte, le pouvoir endotoxique et la défense qu'il octroie à la bactérie.

*B. pertussis* possède de nombreux autres systèmes d'échappement et de détournement du système immunitaire. Parmi ces derniers, les facteurs de résistance au complément sont relativement bien connus. BrkA est une protéine de la famille des autotransporteurs qui est un des principaux acteurs de la résistance au complément. En effet, ce facteur de virulence va interagir avec le complexe C<sub>1</sub> du complément, empêchant le dépôt des protéines C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> et C<sub>9</sub> à la surface bactérienne. BrkA va donc à la fois inhiber la voie classique mais aussi la voie alternative du complément (de Gouw et al., 2011; Thiriard et al., 2018). *B. pertussis* possède d'autres moyens plus ingénieux encore pour se prémunir de la lyse par le complément. Rappelons que les protéines du complément entraînent, après reconnaissance et activation par un pathogène, la formation d'un complexe d'attaque membranaire provoquant la lyse de la cellule ciblée. Les cellules de l'hôte ne sont pas censées déclencher ce système, mais disposent malgré tout d'une stratégie de défense les prémunissant d'une erreur. Il s'agit de deux protéines C<sub>4</sub>BP et C<sub>1</sub>INH qui permettent aux cellules de l'hôte d'empêcher la cascade du complément. Il se trouve que *B. pertussis* est capable de détourner ces deux systèmes pour se défendre (de Gouw et al., 2011; Thiriard et al., 2018). La protéine C<sub>4</sub>BP est recrutée par la bactérie via la FHA (Berggård et al., 2001) tandis que le C<sub>1</sub>INH est subverti par la protéine Vag8 de *B. pertussis* (Hovingh et al., 2017).

Parmi tous les facteurs de virulence de *B. pertussis*, certains agissent sur le recrutement des cellules immunitaires. Par exemple la PTX a des effets pléiotropiques sur les cellules de l'hôte et parmi ces effets on trouve l'inhibition du recrutement de différents types cellulaires comme les neutrophiles, et la diminution de la production de certaines chimiokines (Andreasen and Carbonetti, 2008; Kirimanjeswara et al., 2005). La TCT peut avoir des effets similaires à la PTX sur les neutrophiles (Cundell et al., 1994). Il semblerait que la PTX soit également capable de tuer ou tout du moins de rendre inopérants les macrophages alvéolaires utiles dans l'élimination des bactéries (Carbonetti, 2010; Carbonetti et al., 2007).

Le T3SS a surtout été étudié chez *B. bronchiseptica*, mais *B. pertussis* possède le même système. Une étude de Skinner et al., 2005, a montré que le T3SS permettait de reprogrammer les cellules dendritiques présentes au niveau de la muqueuse pour qu'elles migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques et produisent de l'IL10, une cytokine anti-inflammatoire qui limite la réponse immunitaire (Gestal et al., 2019).

La FHA a également des effets sur certaines cellules immunitaires entraînant indirectement la sécrétion d'IL10 anti-inflammatoire et diminuant la production d'IL17, qui est une des cytokines à l'origine de la réponse Th17, efficace pour éliminer la bactérie (Henderson et al., 2012; Villarino Romero et al., 2016). Dans le cas de la FHA, on peut également citer une publication de 2001 ayant mis en évidence de façon indirecte un éventuel rôle de cette adhésine dans l'apoptose des cellules phagocytaires et des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire (Abramson et al., 2001).

Enfin, l'un des effecteurs ayant le pouvoir immunomodulateur le plus important est l'ACT. Cette toxine cible particulièrement les cellules possédant le récepteur au complément 3 (CR3), aussi appelé antigène 1 des macrophages (Mac-1), c'est-à-dire la majorité des cellules immunitaires avec une capacité phagocytaire de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, et cellules dendritiques) (de Gouw et al., 2011; Gestal et al., 2019). L'activité enzymatique de la toxine va entraîner une augmentation de la concentration cytoplasmique d'AMP cyclique. L'un des principaux effets de cette augmentation est l'inactivation d'une GTPase spécifique, RhoA (Kamanova et al., 2008). RhoA est une des protéines G majeures, impliquée dans la régulation des mouvements du cytosquelette d'actine. Cette inactivation va entraîner une modification importante du cytosquelette d'actine entraînant une incapacité à produire des invaginations membranaires efficaces permettant la phagocytose (de Gouw et al., 2011; Fedele et al., 2017; Kamanova et al., 2008). La toxine va aussi entraîner une inhibition du 'burst' oxydatif utilisé par les cellules phagocytaires à des fins bactéricides (Pearson et al., 1987). L'accumulation d'AMP cyclique va également inhiber la signalisation permettant l'opsonophagocytose médiée par le FcR et entraîner l'inhibition des pièges extracellulaires des neutrophiles (Eby et al., 2014; Fedele et al., 2017). Certaines études tendent à montrer que l'intoxication des cellules dendritiques par l'ACT entraîne un défaut de présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4. D'autres études mettent en évidence les capacités de l'ACT à induire l'apoptose en altérant la voie des caspases dans certains types

cellulaires (de Gouw et al., 2011). Enfin, l'équipe de recherche dirigé par Peter Sebo a récemment mis en évidence les capacités d'inhibition de la différenciation monocyte/macrophage de l'ACT, qui va même jusqu'à causer la dédifférenciation des macrophages alvéolaires (Ahmad et al., 2019).

Nous avons vu ici que *B. pertussis* est très bien adaptée à son hôte, ou plutôt à la pression immunitaire induite par ce dernier (Higgs et al., 2012)(Figure 35). Néanmoins, l'hôte n'est pas dépourvu d'adaptations à l'infection par *B. pertussis*. Lorsque *B. pertussis* modifie ses LPS pour les rendre moins immunogènes et donc moins détectables par le TLR<sub>4</sub>, le complexe TLR<sub>4</sub>/TLR<sub>2</sub> de l'hôte va être activé par la présence de la PTX (Fedele et al., 2010; Nasso et al., 2009). La TCT de *B. pertussis* n'induit pas l'activation du récepteur NOD<sub>1</sub> humain contrairement à celui de la souris. Pourtant, les hôtes présentent des réponses inflammatoires à cette toxine signifiant qu'une autre voie de signalisation permet la détection de la TCT (Magalhaes et al., 2005). Enfin, dans le cas de l'ACT, des études sur une toxine purifiée et inactive du point de vue enzymatique ont pu mettre en évidence la présence d'un autre impact de cette toxine sur les cellules dendritiques. Le domaine RTX hémolysine forme des pores sélectifs pour les cations en s'oligomérisant, entraînant une entrée de potassium dans les cellules cibles. Cette modification de l'homéostasie du potassium se traduit par l'activation des cellules dendritiques aboutissant à une réponse immunitaire à médiation cellulaire de l'hôte (Fedele et al., 2017; Svedova et al., 2016).

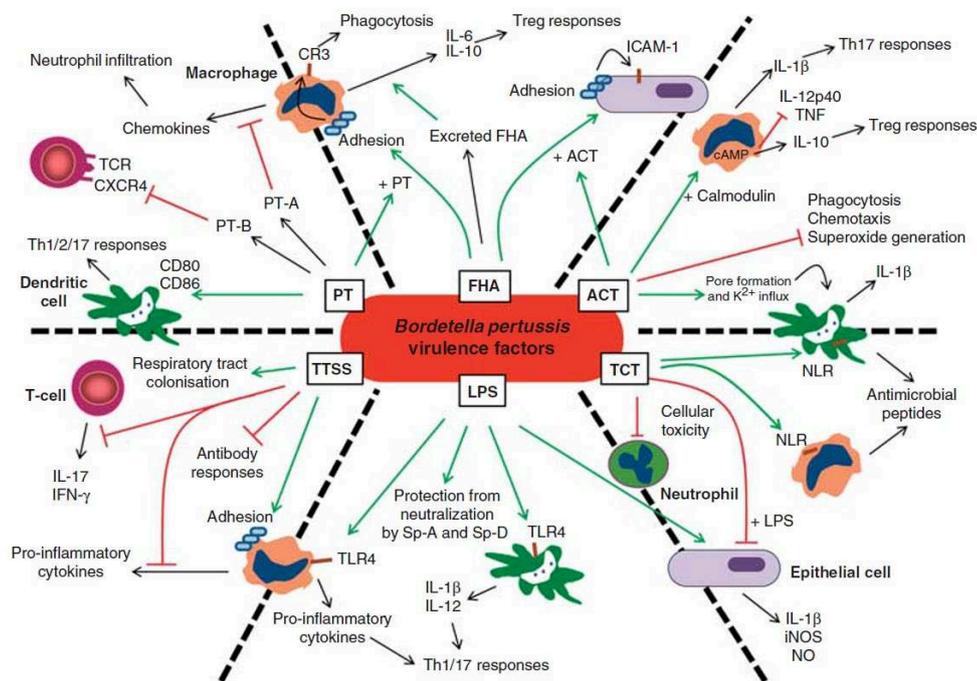


Figure 35: Schéma récapitulatif de la majorité des interactions entre *B. pertussis* et les cellules immunitaires humaines. On retrouve ici les actions de l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), l'adénylate cyclase (ACT), la toxine cytotrachéale (TCT), les lipopolysaccharides (LPS), les systèmes de sécrétion (TTSS), et la toxine pertussique (PT). Source : Higgs et al., 2012

Cette interaction complexe entre ces deux organismes que constituent *B. pertussis* et l'humain est fascinante. Si l'on regarde ces adaptations d'un point de vue uniquement évolutif, on distingue assez bien l'hypothèse de la Reine Rouge. Cette dernière fut développée dans les années 1970 par un biologiste de l'évolution américain, Leigh Van Valen. Son nom fait référence un passage du livre : « Through the Looking-glass » de Lewis Carroll (qui est le second tome d'« Alice au pays des merveilles »). Dans ce conte la Reine Rouge explique à Alice que dans ce monde il est nécessaire de courir en permanence pour rester sur place et que si l'on veut avancer et changer d'endroit il faut courir deux fois plus vite. Van Valen a donc repris cette idée comme un des éléments principaux de sa « Law of Extinction » (Liow et al., 2011; Van Valen, 1977). Dans ces travaux le scientifique s'est intéressé aux espèces fossiles et à leur extinction. L'hypothèse de la Reine Rouge est une des nombreuses conjectures ayant abouti à sa théorie de l'extinction. Cette dernière est complexe et a été améliorée à plusieurs reprises. Néanmoins, ici nous nous intéresserons à sa forme la plus simplifiée. Celle-ci stipule qu'un organisme précis dans un environnement précis doit évoluer en permanence pour ne pas s'éteindre car les autres organismes vivants dans cet environnement évoluent également et vont donc entraîner une pression de sélection sur le premier. Par exemple, si un prédateur acquiert de nouvelles tactiques de chasse ou des attributs de prédation plus efficaces, il sera nécessaire pour ses proies d'évoluer en conséquence afin de ne pas disparaître (Dercole et al., 2006). Cette hypothèse fut également étendue à la relation qui lie les parasites (incluant plus largement les pathogènes et les symbiotes) à leur hôte (Decaestecker et al., 2007).

Cette hypothèse évolutive s'applique parfaitement à *B. pertussis* et à son hôte. Toute évolution de l'un entraîne une adaptation de l'autre. Cette coévolution permet à la bactérie de rester stable dans la population humaine en gardant toujours un pouvoir infectieux malgré les défenses immunitaires de l'hôte. On peut même étendre ce principe aux évolutions non biologiques propres à l'être humain. En effet, ce dernier a bien évidemment évolué au contact des pathogènes comme *B. pertussis* pour s'en prémunir ou tout du moins pour le maîtriser. Mais actuellement les moyens de défense que les humains utilisent sont artificiellement accélérés par l'essor de la technologie. Il ne s'agit plus uniquement d'une accumulation de mutations aléatoires entraînant un avantage sélectif. L'exemple le plus évident est l'utilisation massive des antibiotiques. Comme dans la phrase de la Reine Rouge, l'humain a avancé deux fois plus vite que les autres organismes et a donc pris de l'avance. Néanmoins nous voyons que la pression de sélection que nous avons imposée à nos pathogènes a forcé l'accélération de leur évolution. Par conséquent les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont devenus omniprésents chez nos pathogènes. Dans le cas de *B. pertussis*, c'est la couverture vaccinale qui entraîne une pression de sélection. L'un des faits étayant cette hypothèse dans le cas de *B. pertussis* est l'apparition de souches ne produisant pas la pertactine, qui est un des antigènes composant les vaccins acellulaires (Barkoff and He, 2019).

### 2.7.1.3.3. Détournement et manipulation du métabolisme de l'hôte

Les capacités de transmission, de colonisation et d'immunomodulation de *B. pertussis* sont très étudiées. En revanche, les autres aspects de la vie de *B. pertussis* au sein de l'organisme hôte sont moins investigués. Dans cette partie nous nous intéresserons à deux aspects assez bien caractérisés de l'interaction entre la bactérie et le métabolisme de l'hôte.

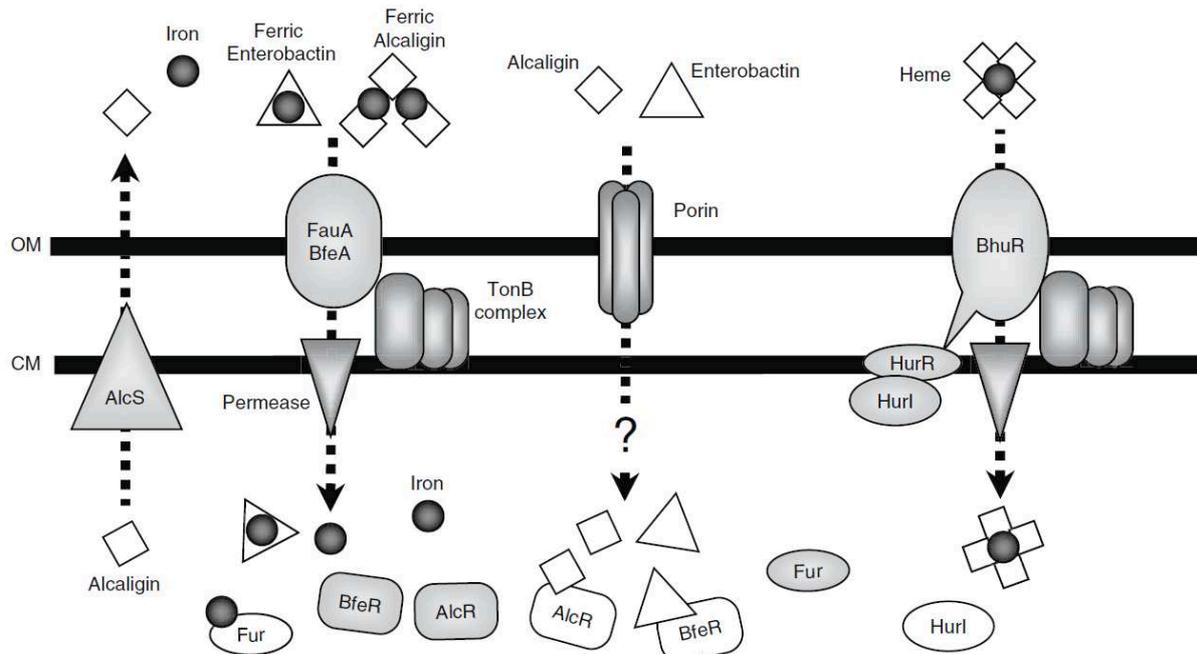


Figure 36 : Représentation schématique des différents systèmes d'importation du fer au sein du genre *Bordetella*. Source : Brickman et al., 2007

Le premier est l'acquisition du fer. Ce métal est un cofacteur essentiel à de nombreux processus biologiques rendant son acquisition capitale pour la survie bactérienne. De ce fait, les mammifères ont mis en place des systèmes de séquestration du fer libre de manière à le rendre indisponible pour les microorganismes. Cette stratégie repose sur plusieurs éléments comme la rétention du fer dans la rate et le foie mais aussi la sécrétion de molécules avec un pouvoir chélatant important. La lactoferrine est une de ces protéines, elle est particulièrement présente au niveau des muqueuses intestinales et de l'arbre respiratoire. Grâce à cette stratégie la concentration en Fe libre au niveau de la surface des muqueuse est de l'ordre de  $10^{-23}$  M, bien en deçà des concentrations nécessaires à la croissance bactérienne (de Gouw et al., 2011; Ratledge and Dover, 2000).

*B. pertussis* possède trois stratégies majeures pour acquérir le fer. La première est la synthèse, l'exportation et la ré-importation d'un siderophore appelé alcaligine. Ce peptide modifié possède une affinité très forte pour le fer et va donc déplacer ce dernier des protéines de l'hôte comme la lactoferrine. L'alcaligine va ensuite pouvoir être réimportée par le transporteur FauA pour utiliser le fer (Brickman et al., 2007).

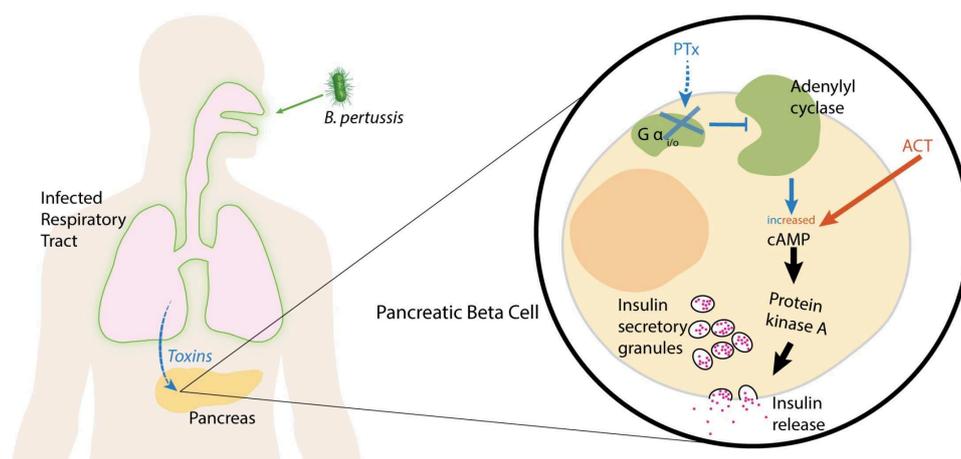
La seconde stratégie, consiste à détourner les sidérophores d'autres bactéries. En effet, *B. pertussis* est capable d'importer via le transporteur BfeA l'entérobactine qui est un sidérophore produit par les entérobactéries (Brickman et al., 2007; de Gouw et al., 2011).

Enfin, la lyse des cellules de l'hôte entraîne la libération de nombreuses protéines à hème et donc constitue une source de fer pour la bactérie. Cette dernière possède donc le système BhuR permettant l'importation de l'hème ferrique de l'hôte (Brickman et al., 2007; Vanderpool and Armstrong, 2001).

Le fer est donc un bon exemple de ressource de l'hôte que la bactérie pathogène s'approprie en la détournant. Évidemment l'acquisition du fer est bien connue dans le cas de cette infection, mais *B. pertussis* détourne et utilise de nombreuses autres ressources de l'hôte étant donné que cette bactérie vit uniquement dans le tractus respiratoire. Mais *B. pertussis* comme d'autres pathogènes est également en capacité de manipuler le métabolisme de l'hôte afin de minimiser ses défenses à l'infection.

La manipulation du métabolisme la plus étudiée dans le cas de *B. pertussis* est la modification de la glycémie de l'hôte.

Lors d'une infection, la réaction inflammatoire entraîne un phénomène appelé résistance à l'insuline (Straub, 2014). Ce mécanisme complexe fait intervenir de nombreuses hormones et permet de forcer une glycémie élevée et de l'allouer aux défenses immunitaires. En effet, en temps normal, chez un être humain moyen avec un mode de vie sédentaire, la consommation énergétique de tout l'organisme est d'environ 10 000 kJ (2400 kcal) par jour et le système immunitaire à lui seul draine presque autant d'énergie que le cerveau, soit près de 2000 kilojoules (500 kcal) (Freyberg and Harvill, 2017; Straub, 2014).



*Figure 37 : Représentation schématique de l'action de la toxine pertussique sur les cellules beta des îlots de Langherans du pancréas. La toxine provoque l'inhibition des protéines G aboutissant à la sécrétion d'insuline par perturbation des voies de signalisation intracellulaire. Ce mécanisme est accentué par l'adénylate cyclase qui va directement produire de l'AMPC. Source : Freyberg and Harvill, 2017*

A l'instar de *Plasmodium falciparum* ou *Trypanozoma cruzii*, *B. pertussis* manipule la glycémie de son hôte afin de moduler les réponses de l'hôte (Freyberg and Harvill, 2017). Les bactéries localisées au niveau du tractus respiratoire vont sécréter des toxines, dont la PTX. Cette toxine va passer dans le sang et cibler différentes cellules, dont diverses cellules du système immunitaire mais également les cellules Beta des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules sont à l'origine de la régulation négative de la glycémie via la sécrétion d'insuline. Certains tissus comme le foie, le tissu adipeux et les muscles vont développer une résistance à l'insuline, diminuant le stockage et l'utilisation du glucose pour le rediriger vers le système immunitaire. Mais la toxine pertussique, via son action sur les protéines G, va entraîner une surproduction d'insuline par ces cellules induisant une hypoglycémie. Cette ingérence dans le métabolisme de l'hôte va avoir pour conséquence une immunomodulation importante. En effet, l'hypoglycémie entraîne un défaut d'activation des lymphocytes T, clé de voute de la réaction immunitaire adaptative (MacIver et al., 2008).

Au travers de cette manipulation du métabolisme de son hôte, *B. pertussis* parvient à altérer ses capacités de réponse à l'infection. Pour ne rien gâcher, il est intéressant de noter que *B. pertussis* ne métabolise pas les sucres et qu'elle n'est donc pas impactée par l'hypoglycémie qu'elle déclenche chez son hôte.

#### 2.7.1.3.4. Evolution du métabolisme

L'adaptation de *B. pertussis* à son hôte n'est pas uniquement axée sur la colonisation et l'immunomodulation mais aussi sur la modification de son métabolisme. En effet, les bactéries du genre *Bordetella* vivant dans l'environnement ont pour la plupart des génomes plus grands que celui de *B. pertussis*. Par exemple *B. bronchiseptica* possède près d'un million de paires de bases en plus. De plus, ces bactéries environnementales ont la capacité de vivre dans des milieux très pauvres (Hamidou Soumana et al., 2017).

Nous avons vu par exemple que *B. pertussis* entraîne, lors de l'infection, une hypoglycémie, cette propriété semble en adéquation avec le fait que cette bactérie ne métabolise pas les sucres (Rowatt, 1957). En effet les enzymes glucokinase et phosphofructokinase sont absentes du génome tout comme certains composants du système d'importation PTS (Izac et al., 2015; Parkhill et al., 2003). Néanmoins *B. pertussis* semble posséder un cycle de Krebs complet ainsi que les enzymes nécessaires à la néoglucogenèse, à partir d'acides aminés (Izac et al., 2015; Parkhill et al., 2003; Santos et al., 2017).

Un autre exemple de la réduction de certains processus métaboliques, pourtant essentiels, est l'auxotrophie pour la niacine (Hornibrook, 1940; Santos et al., 2017). La niacine est aussi appelée vitamine B<sub>3</sub> ou encore vitamine PP (*pellagra preventive*). Cette vitamine est le précurseur du NAD<sup>+</sup> et du NADP<sup>+</sup> qui sont des cofacteurs essentiels d'un très grand nombre

de réactions d'oxydoréduction. Cette vitamine étant essentielle à tous les organisme, *B. pertussis* va donc utiliser les vitamines de l'hôte.

*B. pertussis* a réduit ses sources de carbone et d'azote aux acides aminés et petits acides gras ou métabolites comme le glycérol, très abondants au niveau des muqueuses de l'hôte. Mais cette bactérie possède une stratégie d'utilisation du soufre similaire. En effet, *B. pertussis* ne possède que très peu de voies métaboliques capables d'utiliser le soufre inorganique (Rowatt, 1957). La seule molécule inorganique pouvant être utilisée est le Thiosulfate (Santos et al., 2017). Néanmoins, l'ajout de cystéine permet une meilleure croissance dans les milieux de culture, la bactérie préférant probablement importer l'acide aminé plutôt que de le synthétiser avec ses propres voies de biosynthèse.

Enfin, l'une des pertes les plus étonnantes est la perte d'une des deux enzymes de biosynthèse du glutathion puisqu'un de ces deux gènes chez *B. pertussis* est non fonctionnel. En culture *in vitro* le glutathion est essentiel à une bonne croissance. Des articles ont montré le rôle de source de cystéine du glutathion (Santos et al., 2017). Mais le glutathion a de nombreuses fonctions dans les cellules : il est impliqué dans le maintien du potentiel rédox du cytoplasme et de l'osmolarité, c'est aussi un cofacteur pour des enzymes qui maintiennent les thiols réduits dans des protéines du cytoplasme, etc. (Masip et al., 2006) et, comme nous l'avons vu précédemment, le glutathion joue un rôle crucial dans la complexation et la tolérance aux métaux (Helbig et al., 2008). La plupart des organismes utilisent du glutathion, y compris l'humain (Brose et al., 2014). Le glutathion semble présent en relative importante quantité dans les voies respiratoires, vu que cette molécule est systématiquement retrouvée dans les exhalats condensés (Rosso et al., 2014). Elle est aussi présente dans chaque cellule. Nous savons que *B. pertussis* provoque la lyse d'un certain nombre de cellules. Puisqu'elle peut en trouver chez son hôte, il a donc été possible à *B. pertussis* de perdre une des enzymes de la voie de biosynthèse du glutathion.

Nous avons pu voir au travers de ces quelques exemples que *B. pertussis* a considérablement réduit son génome en fonction des voies métaboliques que son hôte pouvait substituer. Cette stratégie évolutive est déjà connue en biologie évolutive, il s'agit de l'hypothèse de la Reine Noire (Morris et al., 2012). Cette hypothèse est un clin d'œil à la première théorie évolutive décrite précédemment, mais son origine viendrait du jeu de carte « Hearts » (Dame de Pique en français) où la dame de pique constitue la carte à ne pas avoir à la fin du jeu. Cette hypothèse suggère que dans certains cas, les organismes n'évoluent pas via la dérive génétique avec une accumulation de mutations mais tout simplement par la perte de certains gènes. En effet, au sein d'une communauté d'organismes, un organisme pourra perdre certains gènes si les autres membres de la communauté produisent et libèrent le produit final du gène ou de la (ou des) protéine(s) dans le milieu, permettant d'économiser de l'énergie et des ressources (Morris et al., 2012). Cette théorie a été bien décrite pour de nombreux endosymbiontes qui sont totalement dépendants des voies métaboliques de leurs cellules hôtes (et de l'organisme de cette cellule). L'endosymbiose est l'exemple le plus

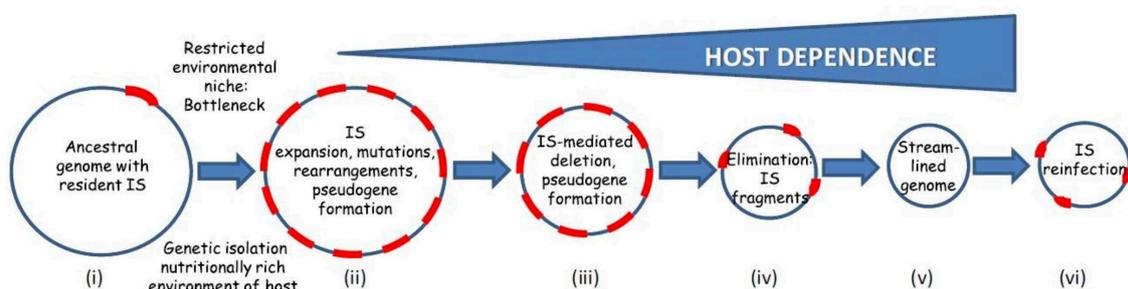
abouti, mais l'hypothèse de la Reine Noire s'applique très bien aussi aux bactéries pathogènes. Une étude a mis en évidence chez *Salmonella* que de nombreux passages successifs sur le même milieu de culture riche va aboutir à une perte génétique importante et fréquente (Nilsson et al., 2005).

Si l'on s'intéresse à la taille des génomes des *Bordetellae*, on peut voir que *B. petrii* qui est une bactérie environnementale a un génome de 5.29 Mb, dont 5129 gènes ; *B. bronchiseptica* qui alterne entre vie environnementale et vie pathogène a un génome de 5.26 Mb, dont 4812 gènes ; *B. parapertussis* qui est un pathogène strict à hôte restreint ( mais n'aurait adopté ce style de vie que « récemment ») a un génome de 4.89 Mb, dont 4559 gènes ; enfin *B. pertussis* qui est la bactérie la mieux adaptée à l'humain, mais aussi la plus dépendante de son hôte, a un génome de 4.09 Mb, dont 3856 gènes.

### 2.7.1.3.5. Evolution par réduction génomique : rôles des IS

Il apparait assez clairement que l'évolution du genre *Bordetella* vers un mode de vie strictement pathogène est partiellement due à la délétion de pans entiers de son génome. Dans le cas de *B. pertussis*, cette plasticité génomique est due aux séquences d'insertion (IS). Ces séquences sont de petits éléments génétiques mobiles très présents chez les procaryotes (Vandecraen et al., 2017).

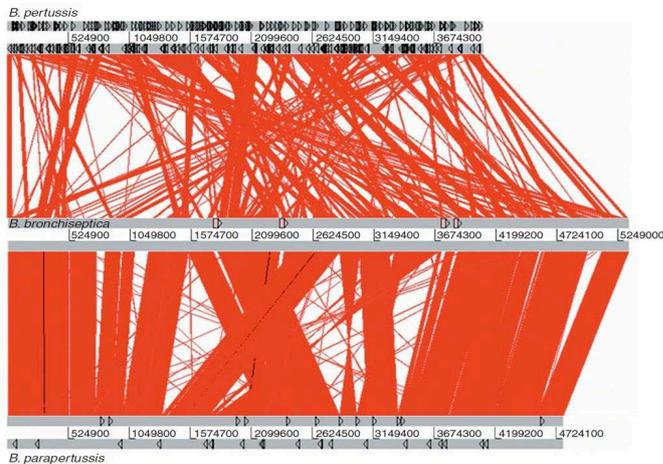
Les IS se composent de séquences répétées à leur extrémité et d'un gène codant une transposase. D'après les travaux de Siguier et al., 2015, les IS se comportent comme des sortes de parasites uniquement composés d'ADN. Ils se répliquent au sein des bactéries de manière à persister et offrent un avantage sélectif au travers de la plasticité génétique qu'ils apportent à la bactérie hôte de manière à ne pas être éliminés du génome. Fait intéressant : la transposase est le gène le plus abondant sur terre (Aziz et al., 2010).



*Figure 38 : Illustration de la colonisation des génomes bactériens par les séquences d'insertions (IS) et de leur histoire évolutive durant l'adaptation à l'hôte. Source : Siguier et al., 2014*

Les séquences d'insertion peuvent apporter différents avantages à la cellule hôte. Par ailleurs, la théorie de l'expansion des IS décrite par Siguier et ses collaborateurs (Siguier et al., 2014, 2015) rejoint l'hypothèse de la délétion génétique de la Reine Noire. En effet, selon ces travaux, les IS s'insèrent dans les génomes de certaines bactéries, mais sous l'effet d'un stress elles vont se répliquer de manière à offrir à la cellule hôte une méthode d'évolution rapide. Et dans le cas de pathogènes ou symbiontes les IS vont entraîner une réduction du génome proportionnelle à la dépendance de la bactérie à son hôte, jusqu'à disparaître elles-mêmes, n'étant plus utiles à la bactérie (figure 38).

Dans le cas de *B. pertussis*, les IS lui confèrent une importante plasticité génétique lui permettant de remanier son génome, de déléter ou d'inactiver des gènes, voire même de modifier leur expression. Cette bactérie possède différents types d'IS, mais la séquence d'insertion majoritaire est l'IS481, qui lui est propre (Parkhill et al., 2003). Cette dernière est présente en plus de 230 copies dans le génome de *B. pertussis*. Elles sont probablement responsables de la réduction génomique de cette bactérie par rapport à ses ancêtres environnementaux, mais aussi de l'inactivation de nombreux gènes. Chez *B. pertussis*, près de 10% des gènes sont des pseudo gènes, et bon nombre d'entre eux ont été inactivés par une IS. Chez *B. paraptussis* le nombre de pseudogènes tombe à 5% et chez *B. bronchiseptica* à 0.4% (Parkhill et al., 2003). Enfin, bien que les génomes des trois Bordetelles classiques sont très proches, on voit que les IS sont responsables d'importants remaniements par recombinaison homologue (figure 39).



*Figure 39: représentation de la réorganisation génomique provoquée par la présence des différentes IS dans les génomes des trois Bordetelles « classiques », B. pertussis (en haut), B. bronchiseptica (au milieu), et B. paraptussis (en bas). Source : Parkhill et al., 2003*

En conclusion, il semble que les IS soient un des moteurs évolutifs principaux de *B. pertussis* dans sa spécialisation à l'homme, au détriment de son passé environnemental.

## Objectifs

Au travers de cette revue bibliographique nous avons pu voir que le cuivre semble être un acteur majeur à l'interface hôte-pathogène. Dans un contexte d'antibiorésistance, il est intéressant de comprendre les interactions entre les bactéries pathogènes et le cuivre, qui est de plus en plus utilisé sur les surfaces ou sous forme de nanoparticules comme agent antibactérien. Les bactéries dont l'homéostasie du cuivre a été étudiée sont soit des bactéries environnementales qui vivent dans les sols pollués, soit des pathogènes majoritairement intracellulaires comme *L. pneumophila*, *L. monocytogenes*, ou *M. tuberculosis*.

*Bordetella pertussis* est un pathogène strictement humain ayant un impact sur la santé publique non négligeable. Cette bactérie présente la particularité d'avoir un style de vie spécialisé à l'extrême avec une seule niche écologique, à savoir la surface de l'épithélium respiratoire humain. *B. pertussis* constitue donc un modèle original et encore non exploré d'étude de l'homéostasie du cuivre. De plus, les diverses niches écologiques occupées par les espèces du genre *Bordetellae* permettent d'étudier les stratégies évolutives relatives à l'homéostasie du cuivre.

Les objectifs de cette thèse sont donc l'identification et la caractérisation des effecteurs majeurs de l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*, ainsi que l'identification des stratégies évolutives mises en place chez les Beta protéobactéries.

L'étude des protéines liées au cuivre au sein des génomes des différents genres des Beta protéobactéries a été réalisée dans le but d'établir un schéma de l'utilisation du cuivre en fonction du style de vie de chaque bactérie.

Enfin, le cœur des travaux présentés ici portera sur l'identification des mécanismes de l'homéostasie chez *B. pertussis*. Pour cela, des analyses transcriptomiques et protéomiques ont permis d'identifier les acteurs majeurs de cette homéostasie. Ces acteurs et leur régulation seront comparés entre *B. pertussis* et sa proche parente *B. bronchiseptica*. Enfin les systèmes les plus intéressants seront étudiés en détail.



## Résultats

### 1. Analyse Bio-informatique du protéome en lien avec le cuivre chez les $\beta$ -protéobactéries et relations avec leurs styles de vie

#### 1.1. Contexte

Dans le but d'orienter nos recherches sur l'homéostasie du cuivre chez *Bordetella pertussis* nous avons réalisé un état des lieux des connaissances sur le sujet. Rien n'étant connu chez *B. pertussis* nous avons étendu cette investigation à de nombreuses bactéries appartenant aux  $\beta$  protéobactéries. Initialement, ces recherches n'avaient pas été menées en vue d'une publication, néanmoins nous avons réalisé que la compilation de ce type de données pourrait s'avérer utile à d'autres scientifiques. Par conséquent, après avoir rassemblé une quantité importante de données il nous a paru intéressant de publier ces données qui font l'état des lieux du 'Copper-Related-Proteome' chez les  $\beta$  proteobactéries.

#### 1.2. Article: **Relationships Between Copper-Related-Proteomes and Lifestyles in $\beta$ -Proteobacteria**



# Relationships Between Copper-Related Proteomes and Lifestyles in $\beta$ Proteobacteria

Rudy Antoine<sup>†</sup>, Alex Rivera-Millot<sup>†</sup>, Gauthier Roy and Françoise Jacob-Dubuisson\*

Université de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Marina G. Kalyuzhanaya,  
San Diego State University,  
United States

### Reviewed by:

Soufian Ouchane,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique (CNRS), France  
Angelica Reyes-Jara,  
University of Chile, Chile

### \*Correspondence:

Françoise Jacob-Dubuisson  
francoise.jacob@ibl.cnrs.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Genomic  
Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 04 June 2019

Accepted: 11 September 2019

Published: 24 September 2019

### Citation:

Antoine R, Rivera-Millot A, Roy G  
and Jacob-Dubuisson F (2019)  
Relationships Between  
Copper-Related Proteomes  
and Lifestyles in  $\beta$  Proteobacteria.  
*Front. Microbiol.* 10:2217.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.02217

Copper is an essential transition metal whose redox properties are used for a variety of enzymatic oxido-reductions and in electron transfer chains. It is also toxic to living beings, and therefore its cellular concentration must be strictly controlled. We have performed *in silico* analyses of the predicted proteomes of more than one hundred species of  $\beta$  proteobacteria to characterize their copper-related proteomes, including cuproproteins, i.e., proteins with active-site copper ions, copper chaperones, and copper-homeostasis systems. Copper-related proteomes represent between 0 and 1.48% of the total proteomes of  $\beta$  proteobacteria. The numbers of cuproproteins are globally proportional to the proteome sizes in all phylogenetic groups and strongly linked to aerobic respiration. In contrast, environmental bacteria have considerably larger proportions of copper-homeostasis systems than the other groups of bacteria, irrespective of their proteome sizes. Evolution toward commensalism, obligate, host-restricted pathogenesis or symbiosis is globally reflected in the loss of copper-homeostasis systems. In endosymbionts, defense systems and copper chaperones have disappeared, whereas residual cuproenzymes are electron transfer proteins for aerobic respiration. Lifestyle is thus a major determinant of the size and composition of the copper-related proteome, and it is particularly reflected in systems involved in copper homeostasis. Analyses of the copper-related proteomes of a number of species belonging to the *Burkholderia*, *Bordetella*, and *Neisseria* genera indicates that commensals are in the process of shedding their copper-homeostasis systems and chaperones to greater extents yet than pathogens.

**Keywords:** copper homeostasis, metalloproteome, *in silico* analyses,  $\beta$  proteobacteria, lifestyles

## INTRODUCTION

$\beta$  proteobacteria form a large phylogenetic group mainly composed of environmental species and a few important pathogens, notably of the *Burkholderia*, *Bordetella*, and *Neisseria* genera.  $\beta$  proteobacteria also comprise a few known phytopathogens, commensals, endophytes, symbionts, and endosymbionts. Thus, members of this phylogenetic group represent a broad range of lifestyles, though information is scarce for most identified species.

Copper is a transition metal whose redox properties are widely used notably in electron transfer chains for respiration and photosynthesis, and in enzymes involved in oxido-reduction and hydrolytic reactions. Thus, bacteria need to acquire copper ions from the milieu

(Stewart et al., 2019). However, Cu(I), which can cross the cytoplasmic membrane, is toxic at high concentrations (Fu et al., 2014; Djoko et al., 2015). Toxicity is thought to be caused by the reactive hydroxyl radical generated in Fenton and Haber-Weiss type reactions, and by copper displacing iron from its sites in metallo-proteins (Solioz, 2018). In particular, the biogenesis of 4Fe-4S centers is vulnerable to copper (Macomber and Imlay, 2009), and copper can also displace iron from assembled 4Fe-4S clusters (Azzouzi et al., 2013; Djoko and McEwan, 2013). As a consequence of this toxicity, bacteria have developed ways to strictly control intracellular copper concentrations (Nies, 2003; Ladomersky and Petris, 2015). A number of systems that ensure copper homeostasis, including extrusion of copper from the cytoplasm or from the periplasm and oxidation of Cu(I) into less toxic Cu(II), have been described in a few model bacteria including *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae*, and *Mycobacterium tuberculosis* (Wolschendorf et al., 2011; Fu et al., 2014). In contrast, little is known for most other bacteria (Solioz, 2018).

Expression of copper-related proteins is controlled by specific two-component signal transduction systems and transcriptional regulators. Typically, transcription of genes or operons involved in the export of copper or its detoxification is activated when excess copper is detected in the periplasm using two-component systems such as CusRS or CopRS, or in the cytoplasm using regulators of the MerR, ArsR, or CsoR families (Ma et al., 2009; Capdevila et al., 2017; Chandrangu et al., 2017). Acquisition systems in case of copper starvation are less well-known. Few specific import systems of copper have been described, and they are mainly dedicated to the assembly of respiration and denitrification complexes (Ekici et al., 2012; Khalifaoui-Hassani et al., 2018).

$\beta$  proteobacteria include *Cupriavidus metallidurans*, aptly named from its capacity to survive in environments heavily contaminated with transition metals, as it was first isolated from the sludge of a decantation tank in a zinc factory (Mergeay et al., 1985). This organism is extremely well equipped to deal with excessive concentrations of those elements including copper, either by efflux, complexation or reducing precipitation (Von Rozycki and Nies, 2009; Grosse et al., 2016; Herzberg et al., 2016). Rather far from this type of niche is the obligate, host-restricted pathogen *Bordetella pertussis*, the whooping cough agent (Melvin et al., 2014; Linz et al., 2019). *B. pertussis* lives in the respiratory mucosa of humans, mainly as an extracellular pathogen. It has no known environmental reservoir and is believed to be transmitted directly between humans. We have initiated the study of copper homeostasis in *B. pertussis* and discovered that it has considerably streamlined its defense against copper relative to model pathogenic bacteria. *Bordetella bronchiseptica*, a close relative of *B. pertussis* with a larger genome and a more promiscuous lifestyle, that can survive in the environment in addition to infecting mammals (Taylor-Mulneix et al., 2017), has more copper-regulated defense systems against excess of this metal than *B. pertussis* (our unpublished observations). This finding prompted us to analyze the predicted copper-related proteomes of a large range of  $\beta$  proteobacteria to

investigate more broadly the links between their lifestyles and the homeostasis of this metal.

## MATERIALS AND METHODS

### Retrieval of $\beta$ Proteobacterial Proteomes

All  $\beta$  proteobacterial species with genomic sequences in the NCBI database (release Nov 2018) were collected, resulting in 465 distinct species. Among them, those for which the genomes are completely sequenced were selected. A single bacterial species was selected for most genera, based on the numbers of publications available in the Pubmed database on each species. However, we selected one representative isolate of all the species of the three  $\beta$  proteobacterial genera – *Bordetella*, *Burkholderia* and *Neisseria* – that include important pathogens. The RefSeq genome files of the selected species were retrieved whenever available, and assembled genome files were used in the other cases. We generated the predicted proteomes of the selected species by translating all their annotated open reading frames. The proteins thus obtained were analyzed in the CLC main package to predict protein domains according to the Pfam nomenclature.

### *In silico* Searches for Cu-Related Domains

An exhaustive search was conducted to identify all types of known copper-related protein domains that can be found in  $\beta$  proteobacteria. Instead of using a Blast approach to retrieve putative members of known copper-related protein families, we used family signatures as found in Pfam. Firstly, all proteins whose three-dimensional structures contain a copper ion were retrieved from the metal-specific MetalPDB database (Putignano et al., 2018) as described previously (Sharma et al., 2018). The 1397 distinct 3-dimensional structures of proteins with bound Cu were found to correspond to 4391 protein sequences, as some entries include several polypeptide chains. Pfam predictions were performed for all sequences, and 233 distinct Pfam domains were identified in that set. Among those, we determined which domains provide amino acyl residues that coordinate copper. The binding sites of Cu are mainly formed by the side chains of His, Cys, and Met residues (Rubino et al., 2011), as well as Asp and Glu according to MetalPDB. A metal binding site was considered plausible if all coordinating residues belong to a single predicted Pfam domain, yielding 27 potential Cu-binding domains. Mismetallated domains and eukaryote-specific domains were discarded.

Secondly, we used the BACMET database to identify additional Cu-related Pfam domains absent from MetalDB as described (Li et al., 2019). In BACMET, 97 proteins are reported to be involved in copper resistance in eubacteria, but this list is highly redundant. This additional search identified two new domains, CopD and CopB. BACMET also led to the identification of domains involved in metal sensing, in particular histidine sensor-kinases of

two-component systems and cytoplasmic transcriptional regulators of the MerR family. However, we chose to disregard metal-sensing domains of regulation systems in our analyses, because of the difficulty to determine their metal specificity based on sequence alone (Ibanez et al., 2015). Functional studies and three-dimensional structures are generally required to establish selectivity (Pennella et al., 2003; Ma et al., 2009).

Thirdly, we searched the Pfam database by text mining for copper-related domains that might have been missed in the first two approaches. A few additional domains were found, namely CutC, NosL, Cu-oxidase\_4, and NnrS.

After having identified all known copper-related domains, we searched for their presence in each of our predicted  $\beta$  proteobacterial proteomes using `hmmsearch`<sup>1</sup>. For most domains, there is no ambiguity regarding their specificity for copper. However, for others further analyses were necessary. To identify metal-specific exporters, we retrieved all the putative proteins identified as P1-type ATPases (domain E1-E2\_ATPases) and RND (domain ACR-tran) transporters according to Pfam in our set of proteins. We performed BlastP analyses against the 17545 proteins of the TCDB database<sup>2</sup> (link: TCDB FastA Sequences), which provides subcategories of transporters according to their substrates. Only hits with E values of 0.0 were selected, namely the copper resistance ATPases (TCDB category 3.A.3.5) and the metal-specific RND HME transporters (heavy metal efflux; TCDB 2.A.6.1). Note that ATPases providing copper to respiratory complexes (Gonzalez-Guerrero et al., 2010; Hassani et al., 2010) are part of a distinct TCDB category (3.A.3.27) that we did not consider in our analysis.

Multicopper oxidases (MCO) harbor at least two copper-containing domains that can also be found in other types of proteins of various functions. X-ray structures of *bona fide* MCOs were analyzed to determine their specific domain organizations, which are Cu-oxidase\_3/Cu-oxidase/Cu-oxidase\_2; Cu-oxidase\_3/Cu-oxidase\_2; and Cu-oxidase\_3//Cu-oxidase\_2. The same approach was used for copper-containing nitrite reductases, yielding the following domain organizations:

Cu-oxidase\_3/Cu-oxidase; Cu-oxidase\_3//Cytochrome\_CB B3; Copper-bind/Cu-oxidase\_3; Copper-bind/Cu-oxidase\_3/Cu-oxidase\_2. For nitrous oxide reductases (N<sub>2</sub>OR), the `nos_propeller` domain was used as the defining signature according to MetalPDB.

Three complexes of aerobic respiration, cytochrome bo ubiquinol oxidases, cytochrome C oxidases aa3, and cytochrome C oxidases cbb3, use copper and contain a COX1 domain. Cytochrome C oxidases cbb3 can be defined by the presence of a FixO Pfam domain in one of their components. TIGRFAM<sup>3</sup> was used to determine the identities of the other two complexes. Cytochrome bo ubiquinol oxidases have a component with a CyoB domain signature (TIGR02843). For cytochrome oxidase aa3 identification, the TIGRFAM

signature QoxB (TIGR02882) was used. As some nitric oxide reductases also harbor this domain, we used the KEGG oxidative phosphorylation and nitrogen metabolism reference pathways to assign unambiguously the cytochrome C oxidases aa3 in our set of proteomes.

For Copper Storage Proteins (CSPs) (Dennison et al., 2018), the only available signature is a domain of unknown function (DUF326; PF02860), and therefore we created a new, unique CSP signature. A DUF326 domain is found in 18 proteins of our set that are annotated in GenBank RefSeq files as “four-helix bundle copper-binding protein.” Using those keywords, 22 additional proteins were identified. Sequence alignments of the 40 proteins with ClustalW was used to create a new CSP profile, called CSP.hmm (Supplementary File S1), using `hmmbuild`<sup>1</sup>. Searching for this profile in our proteomes retrieved seven additional proteins. As CSPs can be periplasmic or cytoplasmic, they were distinguished based on the prediction of a Tat signal peptide using the Tatfind server<sup>4</sup>. Eight proteins belong to the extracytoplasmic group (Csp1/2\_Ecsp), and the other 39 are cytoplasmic (Csp3\_Ccsp).

## Hierarchical Clustering Analyses

Hierarchical clustering was performed using the Cluster 3.0 software<sup>5</sup> to group bacteria based on the occurrence and abundance of the various types of copper-related proteins. We used medians of copy numbers of each type of proteins in each species and dispersion of the values around the medians for hierarchical clustering, with the Correlation (uncentered) similarity metric parameter. All other parameters were kept at their default values. Hierarchical clustering was also used to identify co-occurrences of the various proteins in our bacterial set without centering around medians. Note that those analyses were performed on 86 species, as only one species was selected for the *Burkholderia*, *Bordetella*, and *Neisseria* genera to avoid their overrepresentation in our bacterial set. The dendrograms were exported to Figtree for visualization<sup>6</sup>.

## Phylogenetic Analyses

A phylogenetic tree was built based on 16S RNA sequences using one species for each genus (86 sequences). They were aligned with `cmalign` of the Infernal package<sup>7</sup> using the bacterial small subunit ribosomal RNA profile (SSU\_rRNA\_bacteria, RF0077). The MEGA X software<sup>8</sup> (Kumar et al., 2018) was used to build a Neighbor-joining-tree using the Maximum likelihood algorithm with the Tamura-Nei nucleotide substitution model (Tamura and Nei, 1993) and 1000 replicates using the Bootstrap method (Felstenstein, 1985). The phylogenetic tree was visualized with FigTree.

<sup>4</sup><http://signalfind.org/tatfind.html>

<sup>5</sup><http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>

<sup>6</sup><http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

<sup>7</sup><http://eddylab.org/infernal/>

<sup>8</sup><http://www.megasoftware.net>

<sup>1</sup>[hmmer.org](http://hmmer.org)

<sup>2</sup><http://www.tcdb.org/download.php>

<sup>3</sup><https://www.jcvi.org/tigrfams>

## RESULTS

### Diversity of $\beta$ Proteobacteria

After collecting all  $\beta$  proteobacterial species whose genomes are completely sequenced, we selected one species for each genus in order to obtain as wide a range of lineages as possible while keeping the analyses to a manageable level. For the *Bordetella*, *Neisseria*, and *Burkholderia* genera, we selected one isolate as representative of each species. Altogether, this yielded 119 distinct species of  $\beta$  proteobacteria, with the largest possible variety of genera and lifestyles, including a few unclassified species (**Supplementary Table S1**). As no completely sequenced genomes from the Ferritrophales, Ferroplasmales, and Procabacteriales orders were available at the time of our analyses, no representatives of those phylogenetic groups were included.

Many species in our set are described to live in natural milieus such as water and soils and will be called hereafter environmental bacteria, although limited information is available in many cases. The environmental species reported to frequently cause infections in specific conditions were placed in a category called environmental/opportunists. *Bona fide* pathogens were sorted according to their types of hosts, yielding animal pathogens and phytopathogens. The single species of fungus pathogen was included in the group of environmental bacteria. We also identified a few endophytes, symbionts, endosymbionts, and commensal species. Commensals responsible for opportunistic infections were placed in a separate category.

We generated the complete predicted proteomes of all selected isolates and determined the Pfam domain(s) present in each protein. The largest proteome sizes in the various categories of bacteria are those of opportunists, environmental/opportunists and pathogens, although there are considerable variations within each of those groups (**Figure 1A**). Endosymbionts are at the other end of the spectrum, as expected. Strikingly, the proteome size of *Verminephrobacter eisiniae*, a heritable extracellular earthworm symbiont, is similar to those of environmental  $\beta$  Proteobacteria (Pinel et al., 2008; Lund et al., 2014).

### Identification of Copper-Related Proteins in the Selected Set of $\beta$ Proteobacteria

We inventoried all predicted proteins that harbor Cu-related domain(s). As several of those domains are frequently associated with one another, some proteins or protein complexes in our set include more than one Cu-related domain (**Table 1**). Copper-related proteins were sorted in several categories. The first encompasses cuproproteins, i.e., proteins that harbor copper ion(s) necessary for their activity. Fourteen distinct families of cuproproteins are present in  $\beta$  proteobacteria. The second group corresponds to proteins mediating copper homeostasis, in particular defense against copper. Resistance to excess copper mainly consists in transporting it from the cytoplasm to the periplasm via  $P_{1B}$ -type copper ATPases (Migocka, 2015) and from the periplasm to the external milieu via heavy metal exporters (HME) of the resistance/nodulation/division (RND) superfamily of transporters (Kim et al., 2011). An additional line

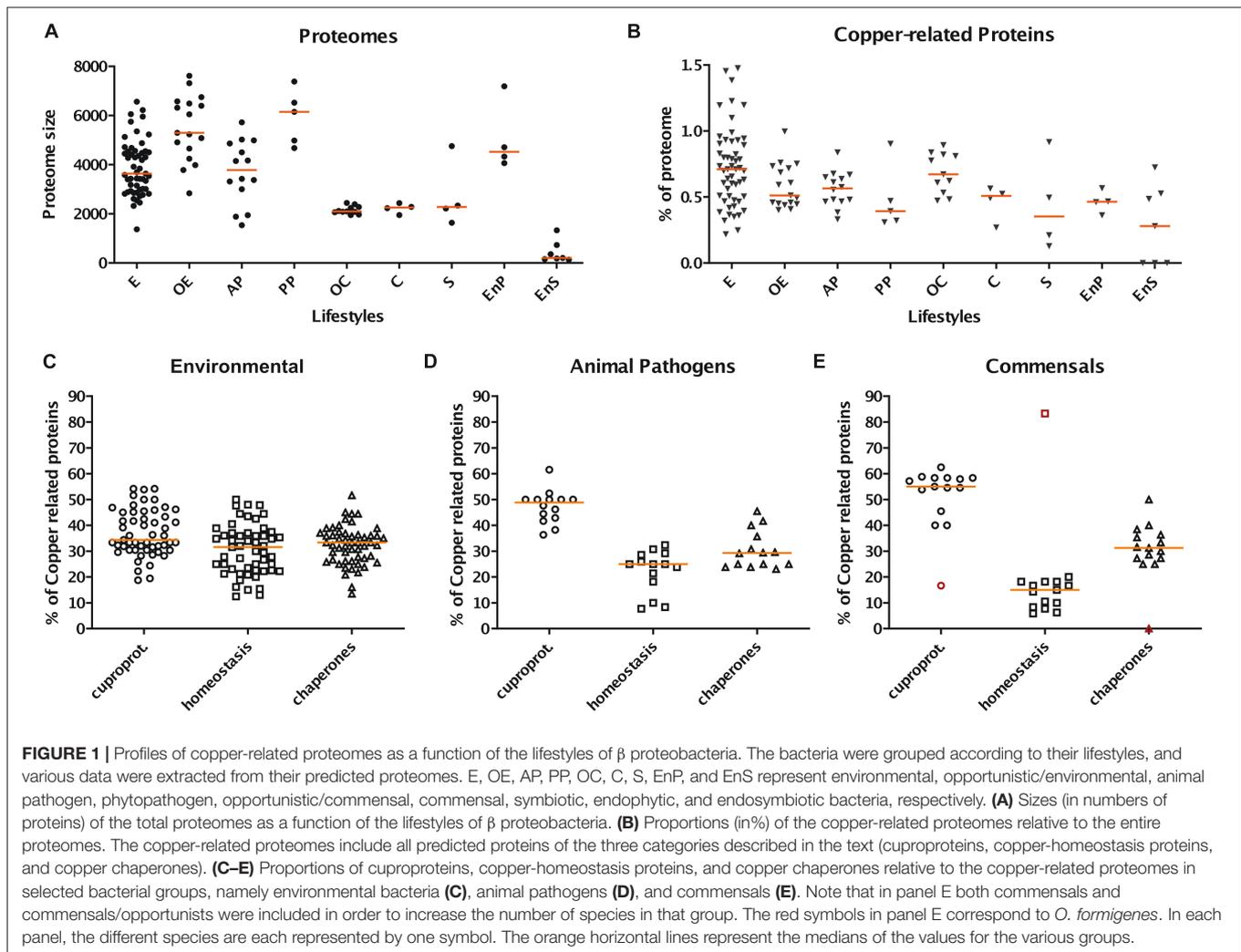
of defense is to detoxify Cu(I) by oxidation to Cu(II) using multi-copper oxidases (MCOs) (Singh et al., 2004; Kaur et al., 2019). Note that in addition to mediating Cu homeostasis, MCOs are *bona fide* cuproproteins.

Regarding the other facet of copper homeostasis, i.e., import of copper as a micronutrient, few systems have been described. Reports that specific  $P_{1B}$ -type copper ATPases might import rather than expel copper have thus far not been convincingly substantiated (Solioz, 2018). Specific major facilitator superfamily (MFS) importers take up copper across the cytoplasmic membrane, notably for cytochrome C oxidase assembly (Ekici et al., 2012; Khalfaoui-Hassani et al., 2018). TonB-dependent receptors (TBDR) that transport copper across the outer membrane have also been reported, notably in *Pseudomonas* (Yoneyama and Nakae, 1996; Wunsch et al., 2003). However, as the MFS and TBDR families include many paralogs but no clear signatures specify copper transporters, we chose to not include those two classes of transporters in this analysis. Other proteins potentially involved in copper homeostasis include the periplasmic and inner membrane proteins CopC and CopD, respectively, reported to form a system that sequesters copper in the periplasm (Cooksey, 1994), and other proteins of ill-defined functions, the outer membrane protein CopB (Lawaree et al., 2016) and the periplasmic protein CopK (Monchy et al., 2006).

The third category includes copper-specific chaperones (Robinson and Winge, 2010; Capdevila et al., 2017), most of which play more than one role. Cu chaperones transfer copper for cuproprotein assembly or participate in copper extrusion by handing copper over to exporters. They also buffer copper, which may contribute to limiting its toxicity (Corbett et al., 2011; Osman et al., 2013; Vita et al., 2016; Solioz, 2018; Novoa-Aponte et al., 2019; Utz et al., 2019). We chose to place Csp3\_Ccsp (cytosolic copper storage proteins) both in the homeostasis and copper chaperone categories, based on its putative functions (Dennison et al., 2018).

A first observation is that the proportion of copper-related proteins in a given species is not necessarily related to its proteome size (**Figures 1A,B**). Among those, cuproproteins account for 40% of copper-related proteins, homeostasis proteins for 28% and copper chaperones for 32%, using medians. However, those proportions vary depending on the lifestyles. Thus, pathogens, commensals and symbionts have greater proportions of cuproproteins and chaperones and lower proportions of homeostasis systems than environmental bacteria (**Figures 1C–E**, **Supplementary Figure S1** and **Supplementary Table S2**). Endophytes and symbionts have few copper-related proteins, which are mostly cuproproteins, and hardly any homeostasis systems (**Supplementary Figure S1** and **Supplementary Table S2**). For phytopathogens, the dispersion of the values is too large and the size of the samples is too small to identify trends.

In environmental bacteria, by far our largest sample, the situation is rather contrasted, likely depending on their respective niches. Using medians, copper-related proteins make up 0.71% of their proteomes, of which 34, 33, and 33% are cuproproteins, copper-homeostasis



proteins, and copper chaperones, respectively (**Figures 1B,C**). Nitrosomonadales have particularly high proportions of proteins of all three categories relative to the sizes of their proteomes (**Supplementary Table S2**). Some Burkholderiales including *C. metallidurans* are well equipped to deal with excess copper. The champion is *Herminiimonas arsenicoxydans*, with 1.48% of its medium-size proteome made of copper-related proteins (**Figure 2**).

### Analysis by Types of Proteins

Use of copper in  $\beta$  proteobacteria is largely linked to aerobic respiration, as the most represented cuproproteins are cytochrome C oxidases aa3 and cbb3 (**Figure 2** and **Supplementary Table S2** and **Supplementary Figure S1**). Very few species in our set lack both types of cytochrome C oxidases, including one uncharacterized *Bordetella* species. Cytochromes bo ubiquinol oxidase complexes are present in half of our bacterial set. The only bacteria totally devoid of genes for aerobic respiration are *Oxalobacter formigenes*, a commensal of the human digestive tract, and two endosymbiont candidates with minute proteomes, *Tremblaya princeps* and *Vidania fulgoroideae*.

Neisseriales have few cytochrome C oxidases or ubiquinol oxidases, but they possess complexes for respiration on oxidized nitrogen species two of which, nitrite reductase (Mellies et al., 1997) and  $N_2OR$ , are cuproproteins. Genes for those proteins are also found in some environmental bacteria, including ammonium-oxidizing bacteria (Casciotti and Ward, 2001), some Rhodocyclales and some Burkholderiales (**Figure 2** and **Supplementary Figure S1**). NnrS is a cuproprotein linked to nitrosative stress (Patra et al., 2019). It is present in most  $\beta$  proteobacteria, at several copies in Rhodocyclales, Nitrosomonadales, Neisseriales, and some Burkholderiales.

Small copper-containing plastocyanin-like electron transfer proteins and cupredoxins are also broadly present in  $\beta$  Proteobacteria, with genes found at 1–3 copies in more than half of the genomes. Largest numbers are in environmental bacteria (**Supplementary Table S2**).

Periplasmic MCOs are both cuproproteins and proteins involved in copper homeostasis, using  $O_2$  to mediate oxidation of Cu(I) to Cu(II) as a means to reduce its toxicity. The numbers of MCO-coding genes vary from 0 in symbionts, some animal pathogens and anaerobes, to four or five in *C. metallidurans*,

**TABLE 1** | Copper-related proteins identified in  $\beta$  Proteobacteria.

	Name	Other names	Pfam name	Pfam IDs
Cuproproteins	Nitrite reductase		Cu-oxidase,Cu-oxidase_2,Cu-oxidase_3*	PF00394,PF07731,PF07732
	Nitrous oxide Reductase		nos_propeller	PF18764
	Nhrs		Nhrs	PF05940
	Copper-bind	Plastocyanin/azurin	Copper-bind	PF00127
	Cu_amine_oxid		Cu_amine_oxid	PF01179
	Cu-oxidase_4	laccase	Cu-oxidase_4	PF02578
	Cupredoxin_1		Cupredoxin_1	PF13473
	DUF386		DUF386	PF04074
	Monooxygenase_B		Monooxygenase_B	PF04744
	Sod_Cu	Cu Superoxide Dismutase	Sod_Cu	PF00080
	Tyrosinase		Tyrosinase	PF00264
	Cyto_bo		COX1,COX2*	PF00115,PF00116
	Cyto_C_aa3		COX1,COX2*	PF00115,PF00116
Cyto_C_cbb3		COX1,FixO*	PF00115,PF02433	
Homeostasis	MCOs		Cu-oxidase,Cu-oxidase_2,Cu-oxidase_3*	PF00394,PF07731,PF07732
	Cu ATPases		E1-E2_ATPases*	PF00122
	RNDs HME	Heavy Metal Efflux RND Exporters	ACR tran*	PF00873
	CopB		CopB	PF05275
	CopC		CopC	PF04234
	CopD		CopD	PF05425
	CopK		CopK	PF11525
	CutA1		CutA1	PF03091
	CutC		CutC	PF03932
Chaperones	Csp3_Ccsp	Cytoplasmic Copper Storage Protein	this work*	
	CusF_EC		CusF_EC	PF11604
	HMA	CopZ	HMA	PF00403
	PCuAC		PCuAC	PF04314
	SCO1-SenC		SCO1-SenC	PF02630
	Csp1/2_Ecsp	Extracellular Copper Storage Protein	this work*	
	CtaG_COX11		CtaG_COX11	PF04442
NosL		NosL	PF05573	

The proteins were sorted by functional categories: cuproproteins, copper-homeostasis proteins, and copper chaperones. The Pfam names and identity numbers of the domains that interact with copper in each protein are provided when available. Note that multicopper oxidases are both cuproproteins and copper homeostasis proteins, and Csp3\_Ccsp were placed in both homeostasis proteins and copper chaperones. Asterisks indicate proteins whose definition required additional *in silico* analyses (see section "Materials and Methods").

*H. arsenicoxidans*, *Ralstonia solanacearum*, and *Nitrosomonas europaea* (**Supplementary Table S2**).

Cu, Zn superoxide dismutases (SodC) protect the cell from superoxide stress, either exogenous or endogenous (Battistoni, 2003; Broxton and Culotta, 2016; Larosa and Remacle, 2018). *sodC* genes are found in half of the species, with two copies in a few environmental species. Most endosymbionts and a majority of Neisseriales are devoid of *sodC*, consistent with micro-aerophilic environments (**Figure 2** and **Supplementary Figure S1**).

A single gene copy for laccase (multicopper polyphenol oxidase) is found in most  $\beta$  proteobacteria. Finally, other

categories of cuproproteins are present in more limited numbers of species, most likely for specific metabolisms (**Figure 2** and **Supplementary Figure S1**).

## Cu Homeostasis in $\beta$ Proteobacteria

Resistance to copper is mediated by several mechanisms involving Cu-specific ATPases, RND transporters, MCOs, in some cases coupled with export across the outer membrane (Lawaree et al., 2016), and sequestration by copper-binding proteins, including copper chaperones, in the two compartments. As chaperones also participate in Cu traffic within cells, they are considered separately.



determine which of those might be involved in copper efflux. In contrast, other environmental bacteria, symbionts, and animal pathogens do not possess such genes at all, indicating that this defense feature is strongly correlated with lifestyle. For instance, Neisseriales and most animal pathogens have no HME genes but have at least one Cu-ATPase gene (Figure 2 and Supplementary Figure S1). As the two types of systems expel copper from different cellular compartments, its removal from the cytoplasm might be sufficient for bacteria that have no environmental phase in their life cycles.

Among other proteins reported to mediate Cu homeostasis, several copies of CopC and CopD are found in bacteria that live in metal-rich environments and in some *Burkholderiae*, whereas symbionts and most animal and phytopathogens are devoid of them (Figure 2). This suggests a role for defense against copper, in line with early reports (Silver and Ji, 1994). Other poorly characterized proteins, including CopB, CopK, CutA1, and CutC are absent from the genomes of most  $\beta$  Proteobacteria or present in low copy numbers, indicating that they likely represent specific adaptations of a limited number of genera.

### Cu Metallochaperones

The isolated HMA domain, called CopZ in model bacteria, has several roles: it sequesters Cu in the cytoplasm and also hands Cu(I) to Cu-ATPases, either as a means of defense or to supply copper for cytochrome C oxidase assembly (Corbett et al., 2011; Utz et al., 2019). Among the single-domain HMA proteins in our set, greatest numbers are found in environmental bacteria including *C. metallidurans*, *H. arsenicoxydans*, and *Polaromonas naphthalenivorans*. Very few  $\beta$  proteobacteria do not have any, supporting its role for copper homeostasis in that phylogenetic group.

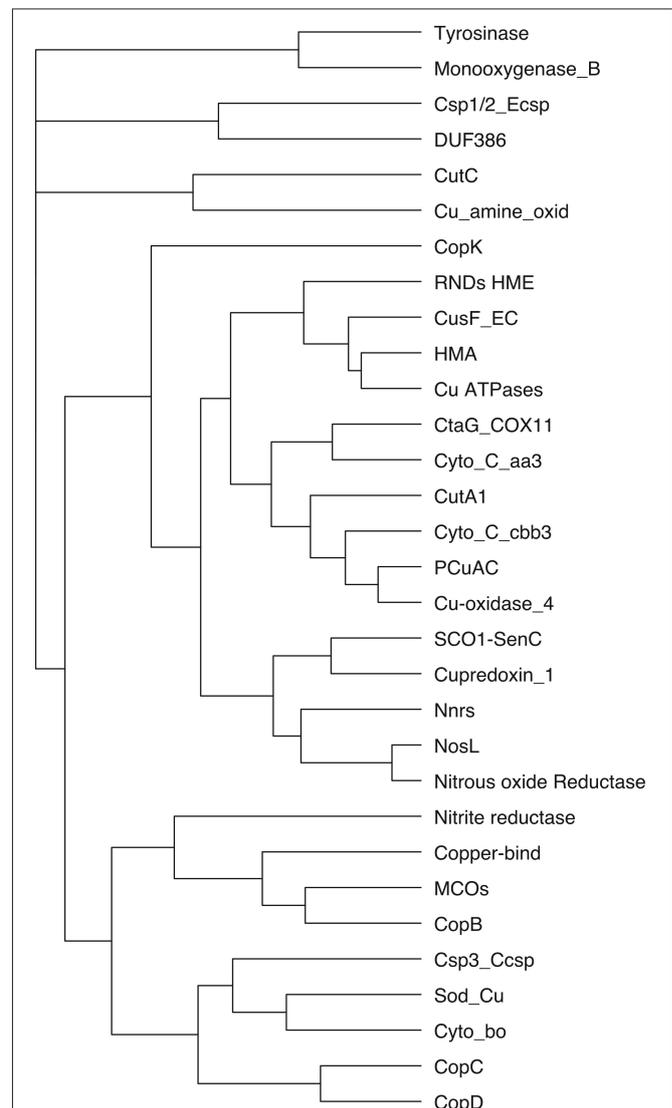
CusF is a periplasmic Cu-binding protein that transfers copper to the RND HME transporter CusABC for extrusion of Cu to the external milieu in model bacteria. Largest numbers of *cusF* genes are found in *B. multivorans*, *Alicyclophilus denitrificans*, *H. arsenicoxydans*, *Dechloromonas suillum*, *Polaromonas naphthalenivorans*, i.e., opportunists or environmental bacteria that possess multiple RND HME systems (Figure 3C). However, *cusF* is present in a number of species devoid of RND HMEs, in particular in animal pathogens including all pathogenic *Bordetellae* (Figure 2 and Supplementary Figure S1). It must thus fulfill another role in the absence of RND HME systems.

The PCu<sub>A</sub>C and ScoI-SenC chaperones are involved in the assembly of respiration or photosynthetic complexes or of nitrite reductase (Jen et al., 2015), and they have also been reported to participate in copper homeostasis (Trasnea et al., 2016). They are found in most  $\beta$  proteobacterial proteomes, except for *O. formigenes*, *Candidatus Symbiobacter mobilis*, endosymbionts and others that have few or no genes for aerobic respiration (Supplementary Figure S1). NosL is a Cu chaperone involved in the assembly of N<sub>2</sub>OR (Zumft, 2005), and accordingly it is mostly found in species with that enzyme. Finally, genes for copper storage proteins (Dennison et al., 2018) Csp3\_Ccsp (cytoplasmic Cu storage) are present in a number of environmental bacteria as well as in several *Bordetellae*. As for Csp1/2\_Ecsp (periplasmic Cu

storage) proteins, they are only found in a few species, including several Neisseriales (Supplementary Figure S1).

### Co-occurring Copper-Related Proteins in $\beta$ Proteobacteria

Hierarchical clustering was performed on 86 species with a single representative of each bacterial genus, including *Burkholderia cepacia*, *B. bronchiseptica*, and *N. gonorrhoeae*. Most of the co-occurrences of copper-related proteins in that bacterial set revealed by those analyses were expected based on the functions of the respective proteins (Figure 4). Thus, RND HME exporters and CusF, which form export systems across the outer membrane,



**FIGURE 4** | Clustering of copper-related proteins in  $\beta$  proteobacteria. Hierarchical clustering was performed for the 31 protein types and 86 species (including one species of each of the *Neisseria*, *Burkholderia*, and *Bordetella* genera) to identify co-occurrences of proteins in  $\beta$  proteobacteria. FigTree was used to visualize the results. The number of nodes between two proteins is negatively correlated with their co-occurrence.

are often found together. Similarly, isolated HMA domains have been described to transfer copper to Cu-ATPases for export from the cytoplasm, and accordingly, the two proteins cluster in our set. We also observed co-occurrence of RND HME and Cu-ATPases. This is in good agreement with the report that the two systems can synergize for the defense against copper (Padilla-Benavides et al., 2014). The chaperone NosL cluster with N<sub>2</sub>OR, as expected from its role for N<sub>2</sub>OR assembly. Other associations revealed by our analyses include MCO with the OMP CopB, cupredoxin with SenC, Csp3 with Cyto\_bo, PcuAC and Cu-oxidase\_4, and Csp1/2 with DUF386. Some of those may provide indications on the putative functions of little characterized copper-related proteins, e.g., for the assembly of specific complexes.

## Classification of $\beta$ Proteobacteria According to Their Copper-Related Profiles

We also performed clustering of the bacterial species based on their respective copper-related proteomes and compared this classification with a 16S-RNA-based phylogenetic tree (Figures 5A,B). This analysis was performed on 86 species as above to avoid overrepresentation of the *Burkholderia*, *Neisseria* and *Bordetella* genera. As our results have indicated that the copper homeostasis protein complements found in  $\beta$  proteobacteria appear to correlate with lifestyles better than cuproproteins or chaperones, we first used the homeostasis subset of copper-related proteins to perform hierarchical clustering. Interestingly, those analyses yielded a tree in which bacteria with a host-associated lifestyle form a separate cluster (top branch in Figure 5B) from environmental bacteria, which form several other large clusters, most likely related to their niches. Outliers include *O. formigenes*, a commensal with a very different set of copper-related proteins than other commensals, and two other bacteria. Hierarchical clustering gives rather different results than the 16S-RNA-based phylogenetic tree with the same 86 species (Figure 5A).

In an attempt to refine the sorting of bacteria with host-associated lifestyles, we performed a second round of hierarchical clustering with the subset of bacteria (21 species) found in the upper branch of the tree shown in Figure 5B, this time based on their entire complements of copper-related proteins. This analysis revealed distinct groups (Figure 5C). Those found in group 1 are totally dependent on a host cell. They are all endosymbionts, except for *Candidatus S. mobilis*, which forms a consortium by maintaining cell-to-cell contact with *Chlorobium chlorochromatii*, a non-motile photolithoautotrophic green sulfur bacterium (see Supplementary Table S1). Unlike *C. chlorochromatii*, *Candidatus S. mobilis* fully depends on this symbiosis. Bacteria found in group 2 are extracellular but host-dependent bacteria, i.e., symbionts, commensals, and pathogens. One exception is *Polynucleobacter necessarius*, an endosymbiont of a protist. Its large proteome and its free living *Polynucleobacter asymbioticus* relative suggest that this symbiosis evolved recently. Bacteria found in group 3 live in the environment, even if one of them, *B. bronchiseptica*, is also an animal pathogen. Altogether,

thus, the known copper-related proteomes of  $\beta$  proteobacteria correlate reasonably well with their lifestyles and niches.

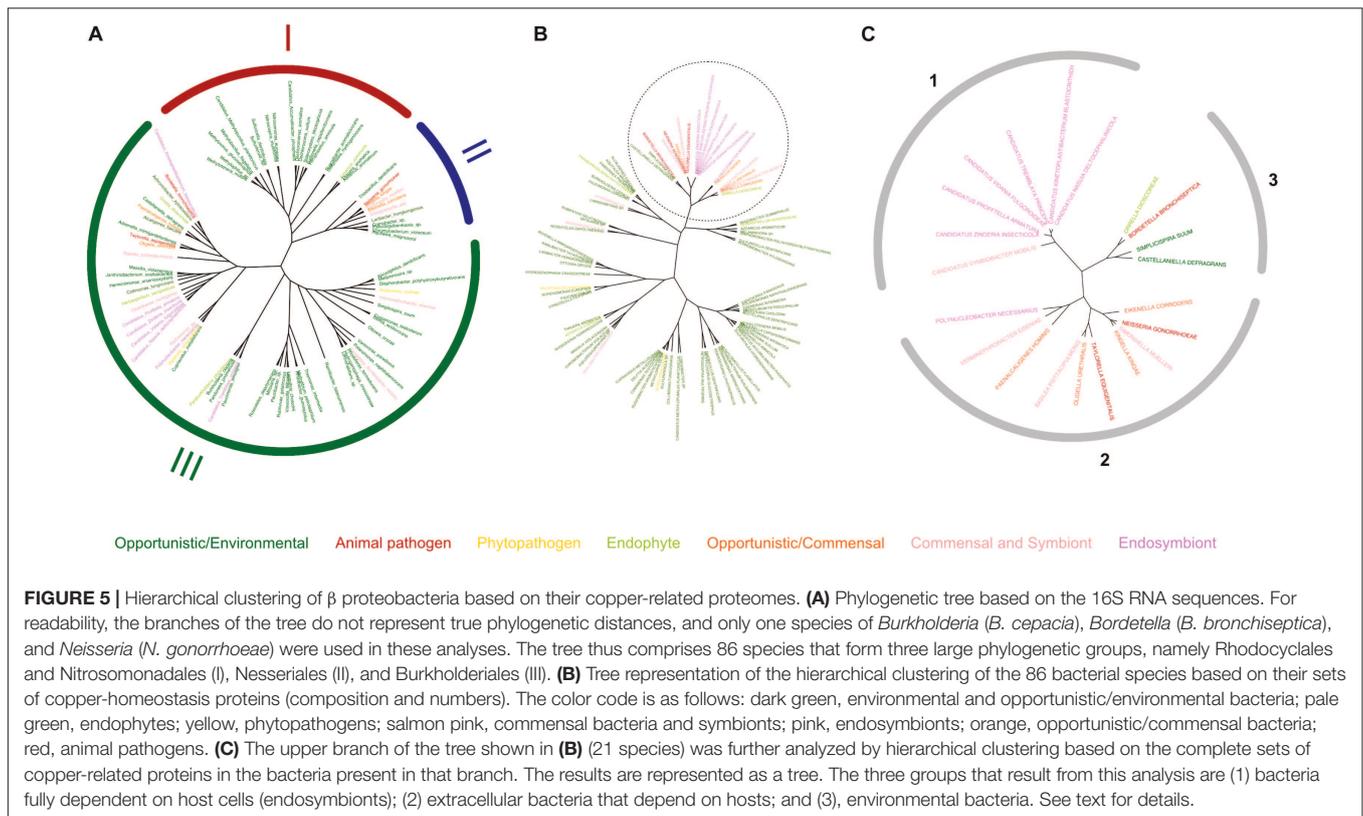
## Copper-Related Proteins in Specific $\beta$ Proteobacterial Genera

We took advantage of the availability of the full genomic sequences of large numbers of species of *Bordetella* (15), *Burkholderia* (11), and *Neisseria* (10) to perform more detailed analyses of the relationship between lifestyle and copper-related proteomes. All *Neisseriae* have small-size proteomes and are mostly commensals (Liu et al., 2015). However, *N. meningitidis*, a commensal of the human nasopharynx, is responsible for life-threatening meningitis or sepsis when it breaches the epithelial barrier, and *N. gonorrhoeae*, an obligate human-restricted pathogen, infects the genital tract. In contrast, the 11 species of *Burkholderia* all have large proteomes. They are environmental species, phytopathogens, or patho-opportunists that can cause serious infections (Mahenthalingam et al., 2005; Cui et al., 2016). With 15 representatives, the genus *Bordetella* displays more varied lifestyles, including obligate host-restricted pathogens, environmental species, wide-host-range pathogens, commensals, opportunists, and uncharacterized species (Linz et al., 2019) (Supplementary Table S1).

The proportions of copper-related proteins relative to the total proteomes vary more widely among *Burkholderiae* and *Bordetellae* than among *Neisseriae* (Figure 6). Environmental and opportunistic species of the three genera generally have more cuproenzymes, in particular involved in aerobic respiration in most *Bordetella* and *Burkholderia* species, than obligate pathogens or commensals. In contrast, *Neisseriae* have few Cu-containing subunits of aerobic respiratory chains, but they harbor other cuproenzymes, i.e., nitrite reductase and/or N<sub>2</sub>OR, that are absent from most *Bordetellae* and *Burkholderiae*. *Neisseriae* are devoid of MCOs, unlike the other two genera. Interestingly, plastocyanin-like proteins are found in all *Neisseriae* and a majority of *Bordetellae*, but they are absent from all but one *Burkholderia*.

Major differences between lifestyles are again reflected in the sets of copper homeostasis proteins. *Neisseriae* have shed most of their Cu homeostasis systems, which represent only between 7 and 18% of their copper-related proteomes, much lower than the  $\beta$ -proteobacterial median (27%). This contrasts starkly with *Burkholderiae*, that are replete with copper homeostasis proteins and chaperones. In that group, *Burkholderia multivorans* has the largest proportions of total copper-related proteins and of copper homeostasis systems, while phytopathogens, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia plantarii*, have fewer such proteins.

*Bordetellae* present more varied patterns of copper-related proteins than the other two genera. Obligate, host-restricted pathogens *Bordetella holmesii* and *Bordetella avium* have the smallest proteomes and very few defense systems, in contrast with environmental *Bordetella petrii*, which has the largest proportions of cuproproteins, copper homeostasis systems, and copper chaperones. Interestingly, differences are conspicuous among environmental species in their complements and copy numbers of copper-homeostasis proteins, suggesting specific adaptations to distinct niches by horizontal gene transfers or gene



duplications. For instance, *Bordetella flabilis* has one of the largest proteomes among environmental *Bordetellae* but fewer copper-homeostasis systems than *B. petrii* or *Bordetella bronchialis*, possibly indicating that it is in the process of adaptation to a more restricted niche. *Bordetella* sp. N has the largest proteome of *Bordetellae* so far, which predicts an environmental niche. However, it has hardly any homeostasis systems or chaperones, at odds with a *bona fide* environmental lifestyle. Another intriguing isolate is *Bordetella* sp. J329 isolated from a patient. It is devoid of Cyt C oxidases and SodC, which are rare features among *Bordetellae*.

## Copper-Related Proteomes in Other Proteobacteria

Finally, to determine whether our findings with  $\beta$  Proteobacteria could be generalized to other phylogenetic groups, we selected 30 species of  $\alpha$  and  $\gamma$  Proteobacteria of various lifestyles (pathogens, symbionts, and environmental species), with fully sequenced and assembled genomes, and we analyzed their copper-related proteomes as above (**Supplementary Table S3**). Similar to  $\beta$  Proteobacteria, environmental species have larger proportions of their copper-related proteomes dedicated to homeostasis than the other groups, and symbionts have hardly any copper homeostasis systems and chaperones (**Figure 7**). However, differences between pathogens and environmental species are less marked in this analysis, most likely because of the limited sample size and because several species defined as pathogens are also environmental, such as *Legionella pneumophila* and

*Vibrio cholerae*. Altogether, thus, the trends observed in this smaller set confirm the correlation between lifestyles and copper homeostasis.

## DISCUSSION

In the evolution of life on Earth, the use of copper has been linked to the appearance of molecular oxygen, as oxidation of insoluble Cu(I) to soluble Cu(II) made copper bio-available for enzymatic oxido-reductions, hydrolysis reactions, and electron transfer chains (Solioz, 2018). Most aerobic or facultative aerobic bacteria use copper, as several protein complexes involved in aerobic respiration, i.e., cytochrome bo ubiquinol oxidases, type cbb3 cytochrome C oxidases and type aa3 cytochrome C oxidases, include copper-containing subunits. In contrast, many anaerobes do not use copper at all and thus in general, aerobic bacteria have larger cuproproteomes than anaerobic ones (Ridge et al., 2008). The link between oxygen and copper utilization is a reason why the overwhelming majority of  $\beta$  proteobacteria have cuproproteins, with the exception of endosymbionts that have shed most of their metabolic capacities. Indeed, most  $\beta$  proteobacteria in our set are aerobes or facultative aerobes. Median numbers show that the proportions of cuproproteins relative to the sizes of the predicted proteomes are rather similar between pathogens, commensals, and environmental bacteria, but smaller in symbionts and endosymbionts. This is also broadly true for copper chaperones, many of which are involved in assembly of energy-generating complexes.



bacteria than in the other bacterial groups. The evolution from environmental bacteria to pathogens, commensals, and symbionts in  $\beta$  proteobacteria is globally characterized by the shedding of copper homeostasis systems. In other words, natural selection specifically favors the elimination of copper defense genes from bacteria in the course of their adaptation to eukaryotic hosts niches. This appears to be the case in other Proteobacteria as well.

However, absence of known copper homeostasis genes does not preclude the existence of other, yet unidentified homeostasis systems. Non-specific systems might also be involved, as exemplified by yersiniabactin in *E. coli*, a siderophore that also participates in copper homeostasis (Chaturvedi et al., 2012; Koh et al., 2017). Other small molecules such as glutathione, bacillithiol, and mycothiol may also play important roles in metal tolerance (Helbig et al., 2008).

Among  $\beta$  Proteobacteria, two groups of bacteria harbor greater than average numbers of copper-homeostasis genes: those that live in environments polluted by metals, and Nitrosomonadales. The first group is exemplified by extremely resistant organisms such as *C. metallidurans* or *H. arsenicoxidans*, which thrive in soils heavily contaminated with transition metals thanks to large numbers of export, storage, and detoxification systems. Overrepresentation of copper-related proteins involved in homeostasis relative to cuproproteins and copper chaperones in environmental bacteria corroborates the idea that the use of copper as a cofactor and the defense against copper are not correlated but evolved independently, as in other phylogenetic groups (Solioz, 2018). Note that *C. metallidurans* and *H. arsenicoxidans* also have larger proportions of cuproproteins than most  $\beta$  proteobacteria, in part because they have four or five MCOs, cuproproteins that also contribute to protection against copper.

Another factor that is likely to strongly contribute to the abundance of copper defense systems in environmental bacteria is the necessity to survive predation by protozoa in soils and water. The relationship between protozoa and bacteria is a long-standing one, and copper is part of the arsenal used by the former to poison and kill their bacterial preys (Hao et al., 2016). In consequence, there is a strong correlation between the presence of copper efflux systems in bacteria and their ability to survive in amoeba and other protozoa. Those systems in turn may contribute to the ability of environmental bacteria to cause opportunistic infections in specific settings such as in immunocompromised hosts. Indeed phagocytes, which use transition metals to kill invading microbes as part of the innate immune response (Fu et al., 2014; Djoko et al., 2015), share pathways of intracellular copper trafficking with protozoa (Hao et al., 2016). It is thus very likely that the abundance of copper homeostasis systems in many environmental  $\beta$  proteobacteria has been selected for by the need to resist killing by protozoa, and those defenses then enabled opportunists to resist killing by phagocytic cells in their occasional mammalian hosts.

Pathogenic bacteria of mammals represent a special case with respect to copper. Copper is sequestered away from the pathogens by host proteins in mucosa or body fluids, and therefore bacteria need to specifically acquire it for

assembly of their own cuproproteins. On the other hand, as outlined above, the innate immune system uses copper as a line of defense, with macrophages importing copper into the phagolysosome compartment as a means to destroy bacteria, together with oxidative and nitrosative stress and antimicrobial peptides. Animal pathogens must thus strike a fine balance to deal with copper starvation or excess depending on the specific environments encountered in their hosts. We have started to address this issue with the host-restricted, obligate pathogen *B. pertussis* and discovered that it has lost a number of genes coding for defense systems present in model bacterial pathogens. According to phylogenetic classifications, *Bordetellae* are close to an environmental/opportunist species, *Achromobacter xylosoxidans*, and to an endosymbiont, *Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii*. Comparisons between *A. xylosoxidans* (genome: 7.3 Mb), *K. blastocrithidii* (0.86 Mb), *B. pertussis* (4.086 Mb), and *B. bronchiseptica* (5.34 Mb), the latter of which can both infect mammals and survive in the environment, show that *A. xylosoxidans* has considerably more Cu-ATPases, HME transporters, MCO and other homeostasis systems than the two *Bordetella* species, but only slightly more cuproproteins and chaperones. *B. bronchiseptica* is in an intermediate situation regarding its defenses against copper (see below). Unlike *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* has two distinct but interconnected cycles, in mammalian hosts and in amoeba (Taylor-Mulneix et al., 2017). Protozoan predation may thus have positively selected for the copper homeostasis systems that remain in *B. bronchiseptica* but are no longer functional in *B. pertussis*. At the other end of this spectrum, the endosymbiont *K. blastocrithidii* has no homeostasis systems. Such a scenario fully supports the global trends observed on our large sample of  $\beta$  proteobacteria.

Interestingly, however, most differences between *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* with respect to copper-related systems are not found in their genomes but at the level of transcription (our unpublished observations). Thus, *B. pertussis* possesses genes coding for a Cu-ATPase and an MCO that are no longer expressed and regulated by copper, while in *B. bronchiseptica* both are strongly upregulated. *B. pertussis* has thought to have derived by genomic reduction from a common ancestor close to current-day *B. bronchiseptica* (Diatopoulou et al., 2005), and our observations support the idea that streamlining of the *B. pertussis* genome is an on-going process. Thus, a caveat of *in silico* genomic analyses is that they can only reveal which genes are present or absent, but not whether they are functional.

With very small total proteomes and few copper-related proteins, endosymbionts represent one extreme of our bacterial set. The proportions of cuproproteins relative to their total proteomes are hardly lower than in other  $\beta$  proteobacterial groups, and thus those genes appear to follow the general genomic reduction toward a symbiotic lifestyle. The proportions of their copper-homeostasis proteins relative to their total proteomes are markedly lower than in other bacterial groups, indicating that those genes are shed faster than others. Genes coding for chaperones tend to follow the same route. If chaperones were only providing copper for cuproenzyme assembly, one would expect them to decrease in similar

proportions as genes for cuproproteins. That they are lost in greater proportions suggests that some of them also served defense purposes, likely by sequestration, in the bacterial ancestors of those symbionts.

Copper is increasingly used as an antibacterial agent, notably in hospitals, in agriculture, and in animal breeding (Grass et al., 2011; Lemire et al., 2013; Schmidt et al., 2016). As shown here, environmental bacteria are well-equipped to deal with such aggressions. Alarmingly, such bacteria cause a growing number of opportunistic infections, including *C. metallidurans* and other  $\beta$  proteobacteria that we have classified as “environmental opportunists” based on our review of the literature (Langevin et al., 2011; Bayhan et al., 2013; Bilgin et al., 2015; Jardine et al., 2017). Finding ways to limit the emergence of new opportunists favored by widespread use of copper as an antibacterial agent will thus become increasingly important. Finally, our study includes a number of bacterial species with bioremediation potential. Deciphering the interplay between metallic stress and stress caused by toxic chemicals might help make the best use of such organisms.

## CONCLUSION

*In silico* analyses of the predicted copper-related proteomes of a large panel of  $\beta$  proteobacteria have indicated that lifestyle shapes the copper-related proteome, and this is particularly reflected in systems involved in copper homeostasis. Evolution from environmental niches toward commensalism, obligate pathogenesis or symbiosis parallels the loss of copper-homeostasis systems. Endosymbionts represent an extreme situation with respect to copper, having lost almost all copper-related genes with the exception of few cuproproteins involved in electron transfer. The correlation between lifestyle and copper homeostasis appears to hold true in other groups of Proteobacteria as well.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the manuscript/**Supplementary Files**.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RA and FJ-D conceived the study. RA, AR-M, and GR gathered the data and prepared the figures and tables. FJ-D wrote the manuscript. All authors analyzed the data and reviewed the manuscript.

## FUNDING

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the University of Lille.

## ACKNOWLEDGMENTS

AR-M and GR acknowledge the support of doctoral fellowships from the University of Lille-Région Nord-Pas-de Calais and from the University of Lille, respectively.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02217/full#supplementary-material>

**FIGURE S1** | Full complements of copper-related proteins (cuproproteins, copper-homeostasis proteins, and copper chaperones) in the entire set of  $\beta$  proteobacteria analyzed in this study. The sizes of the proteomes (numbers of proteins) and the lifestyles are given in the second vertical panel. E, OE, AP, PP, OC, C, S, EnP, and EnS represent environmental, opportunistic/environmental, animal pathogen, phytopathogen, opportunistic/commensal, commensal, symbiotic, endophytic, and endosymbiotic bacteria, respectively. In the third vertical panel are shown the proportions (in %) of the copper-related proteomes (CuRP) relative to the full proteomes for each species, and the proportions (in %) of the proteins in the three functional categories (cuproproteins, copper-homeostasis proteins, and copper chaperones) relative to the complete proteomes. In that panel, the white, green, and red background colors represent average values, above-average values and below-average values, respectively, relative to the 119 species, with the intensities of the colors relating to the distances to the average values. The abundances of each type of proteins in each bacterial species are represented in the last panel. Note that MCOs are both cuproproteins and copper-homeostasis proteins, and Csp3s (cytoplasmic copper storage proteins) are both copper-homeostasis proteins and copper chaperones. The intensities of the colors increase with the numbers of paralogs in each bacterial species, with white indicating the absence of the protein. The absolute numbers of proteins of each type in each bacterial species can be found in **Supplementary Table S2**.

**TABLE S1** |  $\beta$  proteobacterial species analyzed in this study. The species are sorted according to phylogenetic analyses, and the references used to determine their lifestyles are indicated along with the links to the corresponding publications. The different lifestyles are represented by colors: dark green for environmental species (E), green for opportunist/environmental species (OE), red for animal pathogens (AP), yellow for phytopathogens (PP), light beige for commensal species (C), orange for opportunist/commensal species (OC), beige for symbionts (S), light green for endophytes (EnP) and pink for endosymbionts (EnS). The sizes of the predicted proteomes are also provided.

**TABLE S2** | Copper-related proteomes of  $\beta$  proteobacteria. The list of the 119 species analyzed in this study is shown. The species are sorted according to phylogenetic analyses. The GenBank accession numbers of the replicons are given as well as their total sizes in megabases (Mb). The GC content (% GC) and the sizes of the proteomes (numbers of predicted proteins) are also reported. For each Pfam domain, the number of occurrences in each species is given as well as the locus\_tag name (ID xxxx) found in the corresponding GenBank file. For respiratory components no locus\_tag is given but only the number of occurrences of these multi-component systems.

**TABLE S3** | Copper-related proteomes of  $\alpha$  and  $\gamma$  proteobacteria. The list of the 30 species analyzed in this study is shown. The GenBank accession numbers of the replicons are given as well as their total sizes in megabases (Mb). The GC content (% GC) and the sizes of the proteomes (numbers of predicted proteins) are also reported. For each Pfam domain, the number of occurrences in each species is given as well as the locus\_tag name (ID xxxx) found in the corresponding GenBank file. For respiratory components no locus\_tag is given but only the number of occurrences of these multi-component systems.

**FILE S1** | HMM profile for the copper storage protein domain, CSP.hmm.

## REFERENCES

- Azzouzi, A., Steunou, A. S., Durand, A., Khalfaoui-Hassani, B., Bourbon, M. L., Astier, C., et al. (2013). Coproporphyrin III excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen III oxidase HemN as a copper target in the Cu(+)-ATPase mutant copA(-) of *Rubrivivax gelatinosus*. *Mol. Microbiol.* 88, 339–351. doi: 10.1111/mmi.12188
- Battistoni, A. (2003). Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1326–1329. doi: 10.1042/bst0311326
- Bayhan, G. I., Tanir, G., Karaman, I., and Ozkan, S. (2013). Comamonas testosteroni: an unusual bacteria associated with acute appendicitis. *Balkan Med. J.* 30, 447–448. doi: 10.5152/balkanmedj.2013.9135
- Bilgin, H., Sarmis, A., Tigen, E., Soyletir, G., and Mulazimoglu, L. (2015). *Delftia acidovorans*: a rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 26, 277–279. doi: 10.1155/2015/973284
- Broxton, C. N., and Culotta, V. C. (2016). SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection. *PLoS Pathog.* 12:e1005295. doi: 10.1371/journal.ppat.1005295
- Capdevila, D. A., Edmonds, K. A., and Giedroc, D. P. (2017). Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem.* 61, 177–200. doi: 10.1042/EBC20160076
- Casciotti, K. L., and Ward, B. B. (2001). Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2213–2221. doi: 10.1128/aem.67.5.2213-2221.2001
- Chandrangsu, P., Rensing, C., and Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 338–350. doi: 10.1038/nrmicro.2017.15
- Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E., and Henderson, J. P. (2012). The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* 8, 731–736. doi: 10.1038/nchembio.1020
- Cooksey, D. A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 381–386. doi: 10.1016/0168-6445(94)90056-6
- Corbett, D., Schuler, S., Glenn, S., Andrew, P. W., Cavet, J. S., and Roberts, I. S. (2011). The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopZ-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 81, 457–472. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07705.x
- Cui, Z., Zhu, B., Xie, G., Li, B., and Huang, S. (2016). Research status and prospect of burkholderia glumae, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Sci.* 23, 111–118. doi: 10.1016/j.rsci.2016.01.007
- Dennison, C., David, S., and Lee, J. (2018). Bacterial copper storage proteins. *J. Biol. Chem.* 293, 4616–4627. doi: 10.1074/jbc.TM117.000180
- Diavatopoulos, D. A., Cummings, C. A., Schouls, L. M., Brinig, M. M., Relman, D. A., and Mooi, F. R. (2005). Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.* 1:e45. doi: 10.1371/journal.ppat.0010045
- Djoko, K. Y., and McEwan, A. G. (2013). Antimicrobial action of copper is amplified via inhibition of heme biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* 8, 2217–2223. doi: 10.1021/cb4002443
- Djoko, K. Y., Ong, C. L., Walker, M. J., and McEwan, A. G. (2015). The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* 290, 18954–18961. doi: 10.1074/jbc.R115.647099
- Ekici, S., Yang, H., Koch, H. G., and Daldal, F. (2012). Novel transporter required for biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *MBio* 3:e00293-11. doi: 10.1128/mBio.00293-11
- Felstenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Fu, Y., Chang, F. M., and Giedroc, D. P. (2014). Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc. Chem. Res.* 47, 3605–3613. doi: 10.1021/ar500300n
- Gonzalez-Guerrero, M., Raimunda, D., Cheng, X., and Arguello, J. M. (2010). Distinct functional roles of homologous Cu+ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 78, 1246–1258. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07402.x
- Grass, G., Rensing, C., and Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1541–1547. doi: 10.1128/AEM.02766-10
- Grosse, C., Herzberg, M., Schuttat, M., Wiesemann, N., Hause, G., and Nies, D. H. (2016). Characterization of the delta7 mutant of *Cupriavidus metallidurans* with deletions of seven secondary metal uptake systems. *mSystems* 1:e00004-16.
- Hao, X., Luthje, F., Ronn, R., German, N. A., Li, X., Huang, F., et al. (2016). A role for copper in protozoan grazing - two billion years selecting for bacterial copper resistance. *Mol. Microbiol.* 102, 628–641. doi: 10.1111/mmi.13483
- Hassani, B. K., Astier, C., Nitschke, W., and Ouchane, S. (2010). CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J. Biol. Chem.* 285, 19330–19337. doi: 10.1074/jbc.M110.116020
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J., and Nies, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 5431–5438. doi: 10.1128/JB.00271-08
- Herzberg, M., Bauer, L., Kirsten, A., and Nies, D. H. (2016). Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* 8, 313–326. doi: 10.1039/c5mt00295h
- Ibanez, M. M., Checa, S. K., and Soncini, F. C. (2015). A single serine residue determines selectivity to monovalent metal ions in metalloregulators of the MerR family. *J. Bacteriol.* 197, 1606–1613. doi: 10.1128/JB.02565-14
- Jardine, J. L., Abia, A. L. K., Mavumengwana, V., and Ubomba-Jaswa, E. (2017). Phylogenetic analysis and antimicrobial profiles of cultured emerging opportunistic pathogens (Phyla Actinobacteria and Proteobacteria) identified in hot springs. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14:E1070. doi: 10.3390/ijerph14091070
- Jen, F. E., Djoko, K. Y., Bent, S. J., Day, C. J., McEwan, A. G., and Jennings, M. P. (2015). A genetic screen reveals a periplasmic copper chaperone required for nitrite reductase activity in pathogenic *Neisseria*. *FASEB J.* 29, 3828–3838. doi: 10.1096/fj.15-270751
- Kaur, K., Sharma, A., Capalash, N., and Sharma, P. (2019). Multicopper oxidases: biocatalysts in microbial pathogenesis and stress management. *Microbiol. Res.* 222, 1–13. doi: 10.1016/j.micres.2019.02.007
- Khalfaoui-Hassani, B., Wu, H., Blaby-Haas, C. E., Zhang, Y., Sandri, F., Verissimo, A. F., et al. (2018). Widespread distribution and functional specificity of the copper importer CcoA: distinct Cu uptake routes for bacterial cytochrome c oxidases. *MBio* 9:e00065-18. doi: 10.1128/mBio.00065-18
- Kim, E. H., Nies, D. H., McEvoy, M. M., and Rensing, C. (2011). Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J. Bacteriol.* 193, 2381–2387. doi: 10.1128/JB.01323-10
- Koh, E. I., Robinson, A. E., Bandara, N., Rogers, B. E., and Henderson, J. P. (2017). Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat. Chem. Biol.* 13, 1016–1021. doi: 10.1038/nchembio.2441
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Ladomersky, E., and Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* 7, 957–964. doi: 10.1039/c4mt00327f
- Langevin, S., Vincelette, J., Bekal, S., and Gaudreau, C. (2011). First case of invasive human infection caused by *Cupriavidus metallidurans*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 744–745. doi: 10.1128/JCM.01947-10
- Larosa, V., and Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci. Rep.* 38:BSR20171492. doi: 10.1042/BSR20171492
- Lawaree, E., Gillet, S., Louis, G., Tilquin, F., Le Blastier, S., Cambier, P., et al. (2016). Caulobacter crescentus intrinsic dimorphism provides a prompt bimodal response to copper stress. *Nat. Microbiol.* 1:16098. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.98
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., and Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384. doi: 10.1038/nrmicro3028
- Li, C., Li, Y., and Ding, C. (2019). The role of copper homeostasis at the host-pathogen axis: from bacteria to fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 20:E175. doi: 10.3390/ijms20010175
- Linz, B., Ma, L., Rivera, I., and Harvill, E. T. (2019). Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 32, 223–230. doi: 10.1097/QCO.0000000000000549
- Liu, G., Tang, C. M., and Exley, R. M. (2015). Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology* 161, 1297–1312. doi: 10.1099/mic.0.000086

- Lund, M. B., Kjeldsen, K. U., and Schramm, A. (2014). The earthworm-*Verminephrobacter* symbiosis: an emerging experimental system to study extracellular symbiosis. *Front. Microbiol.* 5:128. doi: 10.3389/fmicb.2014.00128
- Ma, Z., Jacobsen, F. E., and Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* 109, 4644–4681. doi: 10.1021/cr900077w
- Macomber, L., and Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8344–8349. doi: 10.1073/pnas.0812808106
- Mahenthalingam, E., Urban, T. A., and Goldberg, J. B. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 144–156. doi: 10.1038/nrmicro1085
- Mellies, J., Jose, J., and Meyer, T. F. (1997). The *Neisseria gonorrhoeae* gene aniA encodes an inducible nitrite reductase. *Mol. Gen. Genet.* 256, 525–532. doi: 10.1007/s004380050597
- Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F., and Cotter, P. A. (2014). Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 274–288. doi: 10.1038/nrmicro3235
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., and Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162, 328–334.
- Migocka, M. (2015). Copper-transporting ATPases: the evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. *IUBMB Life* 67, 737–745. doi: 10.1002/iub.1437
- Monchy, S., Benotmane, M. A., Wattiez, R., Van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., et al. (2006). Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology* 152, 1765–1776. doi: 10.1099/mic.0.28593-0
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339. doi: 10.1016/s0168-6445(03)00048-2
- Novoa-Aponte, L., Ramirez, D., and Arguello, J. M. (2019). The interplay of the metallosensor CueR with two distinct CopZ chaperones defines copper homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 294, 4934–4945. doi: 10.1074/jbc.RA118.006316
- Osman, D., Patterson, C. J., Bailey, K., Fisher, K., Robinson, N. J., Rigby, S. E., et al. (2013). The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1B)-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Mol. Microbiol.* 87, 466–477. doi: 10.1111/mmi.12107
- Padilla-Benavides, T., George Thompson, A. M., Mcevoy, M. M., and Arguello, J. M. (2014). Mechanism of ATPase-mediated Cu<sup>+</sup> export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J. Biol. Chem.* 289, 20492–20501. doi: 10.1074/jbc.M114.577668
- Patra, S. K., Samaddar, S., Sinha, N., and Ghosh, S. (2019). Reactive nitrogen species induced catalases promote a novel nitrosative stress tolerance mechanism in *Vibrio cholerae*. *Nitric Oxide* 88, 35–44. doi: 10.1016/j.niox.2019.04.002
- Pennella, M. A., Shokes, J. E., Cospser, N. J., Scott, R. A., and Giedroc, D. P. (2003). Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3713–3718. doi: 10.1073/pnas.0636943100
- Pinel, N., Davidson, S. K., and Stahl, D. A. (2008). *Verminephrobacter eiseniae* gen. nov., sp. nov., a nephridial symbiont of the earthworm *Eisenia fetida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2147–2157. doi: 10.1099/ijs.0.65174-0
- Putignano, V., Rosato, A., Banci, L., and Andreini, C. (2018). MetalPDB in 2018: a database of metal sites in biological macromolecular structures. *Nucleic Acids Res.* 46, D459–D464. doi: 10.1093/nar/gkx989
- Ridge, P. G., Zhang, Y., and Gladyshev, V. N. (2008). Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* 3:e1378. doi: 10.1371/journal.pone.0001378
- Robinson, N. J., and Winge, D. R. (2010). Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 537–562. doi: 10.1146/annurev-biochem-030409-143539
- Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P., and Franz, K. J. (2011). A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics* 3, 61–73. doi: 10.1039/c0mt00044b
- Schmidt, M. G., Von Dessauer, B., Benavente, C., Benadof, D., Cifuentes, P., Elgueta, A., et al. (2016). Copper surfaces are associated with significantly lower concentrations of bacteria on selected surfaces within a pediatric intensive care unit. *Am. J. Infect. Control* 44, 203–209. doi: 10.1016/j.ajic.2015.09.008
- Sharma, A., Sharma, D., and Verma, S. K. (2018). In silico study of Iron, Zinc and Copper binding proteins of *Pseudomonas syringae* pv. lapsa: emphasis on secreted metalloproteins. *Front. Microbiol.* 9:1938. doi: 10.3389/fmicb.2018.01838
- Silver, S., and Ji, G. (1994). Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl. 3), 107–113. doi: 10.1289/ehp.94102s3107
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., and Montfort, W. R. (2004). Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 7815–7817. doi: 10.1128/jb.186.22.7815-7817.2004
- Soliz, M. (2018). *Copper and Bacteria. Evolution, Homeostasis and Toxicity*. Cham: Springer Nature Switzerland AG.
- Stewart, L. J., Thaqi, D., Kobe, B., Mcewan, A. G., Waldron, K. J., and Djoko, K. Y. (2019). Handling of nutrient copper in the bacterial envelope. *Metallomics* 11, 50–63. doi: 10.1039/c8mt00218e
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Taylor-Mulneix, D. L., Bendor, L., Linz, B., Rivera, I., Ryman, V. E., Dewan, K. K., et al. (2017). Bordetella bronchiseptica exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLoS Biol.* 15:e2000420. doi: 10.1371/journal.pbio.2000420
- Trasnea, P. I., Utz, M., Khalfaoui-Hassani, B., Lagies, S., Daldal, F., and Koch, H. G. (2016). Cooperation between two periplasmic copper chaperones is required for full activity of the cbb3 -type cytochrome c oxidase and copper homeostasis in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* 100, 345–361. doi: 10.1111/mmi.13321
- Utz, M., Andrei, A., Milanov, M., Trasnea, P. I., Marckmann, D., Daldal, F., et al. (2019). The Cu chaperone CopZ is required for Cu homeostasis in *Rhodobacter capsulatus* and influences cytochrome cbb3 oxidase assembly. *Mol. Microbiol.* 111, 764–783. doi: 10.1111/mmi.14190
- Vita, N., Landolfi, G., Basle, A., Platsaki, S., Lee, J., Waldron, K. J., et al. (2016). Bacterial cytosolic proteins with a high capacity for Cu(I) that protect against copper toxicity. *Sci. Rep.* 6:39065. doi: 10.1038/srep39065
- Von Rozycki, T., and Nies, D. H. (2009). Cupriavidus metallidurans: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 115–139. doi: 10.1007/s10482-008-9284-5
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T. B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., et al. (2011). Copper resistance is essential for virulence of mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1621–1626. doi: 10.1073/pnas.1009261108
- Wunsch, P., Herb, M., Wieland, H., Schiek, U. M., and Zumft, W. G. (2003). Requirements for Cu(A) and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 185, 887–896. doi: 10.1128/jb.185.3.887-896.2003
- Yoneyama, H., and Nakae, T. (1996). Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology* 142(Pt 8), 2137–2144. doi: 10.1099/13500872-142-8-2137
- Zumft, W. G. (2005). Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 154–166. doi: 10.1159/000091562

**Conflict of Interest:** 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 © 2019 Antoine, Rivera-Millot, Roy and Jacob-Dubuisson. 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) and the copyright owner(s) 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.

### 1.3. Résumé

Dans cet article, une importante bibliographie et des analyses de bases de données telles que MetalPDB ont permis d'établir une liste de protéines ayant un lien direct avec le cuivre. Certaines protéines identifiées dans la littérature scientifique mais ne disposant pas de signature pFam définie ont fait l'objet de compilation et d'identification par un motif HMM (Hidden Markov Model). Cette technique permet d'identifier ces protéines en dehors des organismes où elles ont été décrites. Après avoir identifié toutes les protéines connues pour avoir un lien avec le cuivre, il a été possible d'appliquer une analyse à grande échelle de classification ascendante hiérarchique (Clustering hiérarchique, CAH) permettant d'identifier des protéines très probablement liées au cuivre de par leur extrême proximité (nombre de nœuds) à des protéines déjà décrites (figure 4). Toutes ces protéines ont été classées dans trois catégories : utilisateur de cuivre, homéostasie, et chaperonne (tableau 1).

Les différentes protéines choisies ont été identifiées dans 119 génomes de  $\beta$  protéobactéries. Un génome complet par genre a été utilisé, sauf dans le cas des genres *Burkholderia*, *Neisseria* et *Bordetella* pour lesquelles plusieurs génomes ont été sélectionnés. La littérature scientifique sur les espèces choisies a permis d'identifier leur style de vie le plus probable. Les génomes sont de tailles différentes en fonction du style de vie, mais en revanche la proportion de protéines en lien avec le cuivre reste relativement stable quel que soit le style de vie des bactéries. De plus, il semble que chaque style de vie présente un profil qui lui est propre (figure 1).

Les catégories 'utilisateurs de cuivre' et 'chaperonnes à cuivre' permettent d'identifier certains grands axes du métabolisme des bactéries. Les protéines d'homéostasie semblent plus utiles pour distinguer les bactéries environnementales des bactéries associées à un hôte (figure 3). Ces observations tendent à montrer que l'homéostasie permet d'identifier la niche écologique de manière assez large, tandis que les protéines utilisant le cuivre et les chaperonnes permettent d'identifier les spécificités de chaque bactérie au sein de cette niche écologique.

Pour vérifier ces hypothèses un clustering hiérarchique a été appliqué directement sur les bactéries en utilisant la nature et le nombre des protéines en lien avec le cuivre comme variables. Dans un premier temps, ce CAH a été fait en utilisant les protéines de l'homéostasie (figure 5A). L'arbre formé a permis d'isoler une branche de bactéries dont le style de vie est associé à un hôte. Un second CAH a été appliqué sur les bactéries de cette branche mais cette fois en utilisant la totalité du protéome en lien avec le cuivre. Cette analyse a permis de séparer les bactéries en trois branches. Ces branches semblent correspondre approximativement aux bactéries associées à un hôte mais qui peuvent vivre dans l'environnement, à celles strictement dépendantes d'un hôte mais vivant sur la surface des épithélia, et enfin aux bactéries intracellulaires.

## 1.4. Résultats complémentaires

En plus des analyses des données présentées précédemment, nous avons également tenté d'autres approches de manière à confirmer ou infirmer nos hypothèses.

Une des analyses non présentées dans l'article est celle réalisée sur les trois genres bactériens *Burkholderia*, *Bordetella*, et *Neisseria*. Les *Burkholderiae* sont majoritairement environnementales, mais ce genre comprend également des bactéries pathogènes d'animaux et de plantes ainsi que des stades d'évolution intermédiaires comme des 'environnementaux opportunistes'. Les *Bordetellae* possèdent des représentants environnementaux, mais la majorité sont des pathogènes d'animaux et pour certains des pathogènes stricts incapables de vivre en dehors d'un hôte. Enfin, les *Neisseriae* sont toutes dépendantes d'un hôte. Ce genre contient des pathogènes mais principalement des commensaux pouvant être aussi pathogènes, ainsi que des commensaux stricts (dépourvus de pouvoir pathogène).

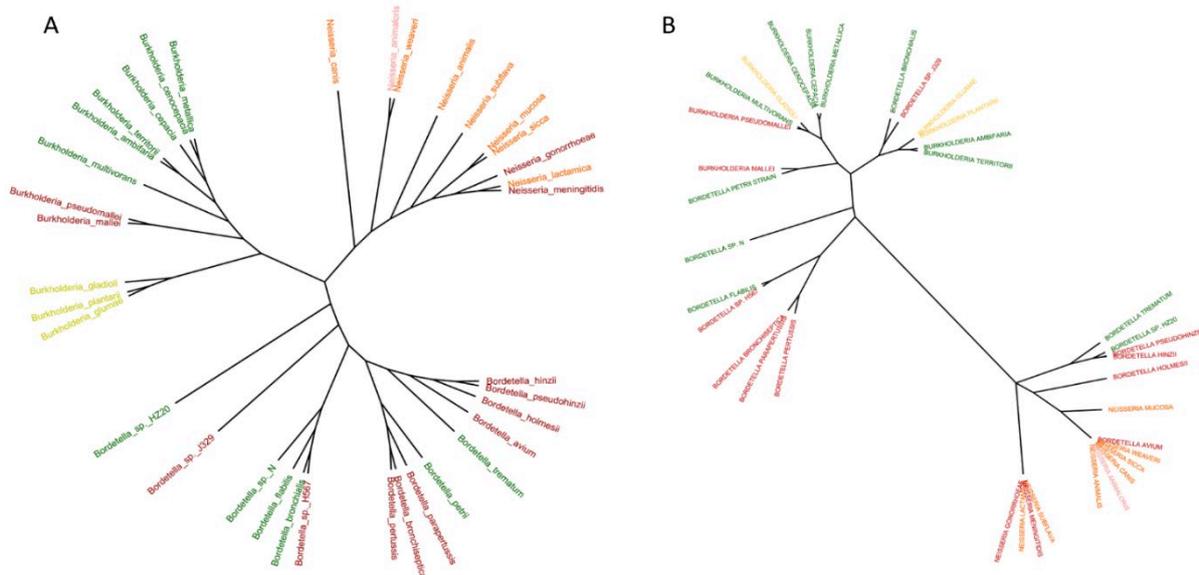


Figure 40 : A, Arbre phylogénétique basé sur l'ARN 16S des différentes bactéries. B, représentation en arbre d'un classement par clustering hiérarchique. Les couleurs représentent les styles de vie (même code de couleurs que dans l'article)

La figure 40 A représente un arbre phylogénétique classique avec les représentants sélectionnés des 3 genres servant de modèles. On voit une répartition des trois genres selon la phylogénie 'classique', puisque cette dernière est généralement établie sur la base des séquences d'ARN 16S. Il est également possible d'observer qu'au sein des *Burkholderiae* les styles de vie se superposent bien à la divergence phylogénétique. C'est aussi le cas chez les *Neisseriae*. En revanche, on peut également observer que la phylogénie ne représente que peu les différences de style de vie chez les *Bordetellae*. La figure 40b représente un arbre construit avec les résultats du clustering hiérarchique basé sur l'ensemble du protéome en lien avec le cuivre.

On observe deux branches bien distinctes. Sur la partie gauche de l'arbre on peut voir la majorité des bactéries environnementales ainsi que plusieurs bactéries pathogènes, qui toutes appartiennent aux genres *Bordetella* et *Burkholderia*. La particularité de ce cluster est que toutes ces espèces, quel que soit leur style de vie, ont la capacité de vivre dans l'environnement (en dehors d'un hôte). Seules deux bactéries font exception à ce critère, *B. pertussis* et *B. parapertussis*. Comme vu dans l'introduction, ces deux bactéries ont évolué par réduction génomique. Il est vraisemblable que les gènes des protéines liées au cuivre ont suivi le même type d'évolution. Il est donc probable certains d'entre eux soient encore présents dans le génome de ces bactéries mais qu'ils ne sont plus fonctionnels. C'est ce que nous avons observé dans les recherches qui seront décrites à la suite de cette section.

La seconde branche de l'arbre rassemble des bactéries pathogènes et des organismes commensaux (ou commensaux opportunistes), c'est-à-dire pour la majorité des espèces dépendantes de leurs hôtes. Cette branche rassemble toutes les *Neisseriae* et quelques *Bordetellae*. Néanmoins deux bactéries de cette branche intriguent : *Bordetella trematum* et *Bordetella sp. HZ20.*, toutes deux considérées comme environnementales. Le cycle de vie de *B. trematum* est peu connu et il semble qu'elle soit responsable d'infections occasionnelles. Le style de vie environnemental qui lui a été attribué vient du fait que cette bactérie a été isolée du sol et qu'elle est rarement responsable d'infections. Or, si l'on considère le protéome en lien avec le cuivre, cette bactérie s'apparente davantage aux pathogènes ou aux commensaux. Elle possède également un protéome relativement petit, d'une taille similaire à ceux de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*. Dans le cas de *Bordetella sp. HZ20.*, les problèmes sont les mêmes : cette bactérie isolée du sol n'a pas été étudiée. Il est donc difficile de déterminer s'il s'agit d'une possible erreur d'attribution des styles de vie de ces deux bactéries ou juste de deux exceptions dans l'utilisation du cuivre.

Dans les analyses précédentes, nous avons réalisé du clustering hiérarchique (classification ascendante hiérarchique). Cette technique permet de former des groupes dans la population sélectionnée (ici, les espèces bactériennes) en fonction de plusieurs variables (nature et abondance des protéines en lien avec le cuivre). En effet, le principe de cette analyse est la répartition des « individus » dans un espace théorique à  $n$  dimensions, les différentes variables d'intérêt étant les dimensions. Par la suite, l'algorithme va rassembler les individus les plus proches deux par deux pour former une première série de groupes (ce sont les premiers nœuds de l'arbre). Ensuite, ces groupes seront à leur tour rassemblés deux par deux en fonction de leur proximité, et ainsi de suite. Il est important de noter que si un individu est trop isolé, il ne sera pas inclus dans un groupe avant que les groupes ne se soient suffisamment étoffés pour se rapprocher de lui. Ce type d'analyse présente l'avantage de prendre en compte la totalité des données pour faire son classement. En revanche, la technique présente deux inconvénients majeurs. Le premier est que seules les variables quantitatives peuvent être utilisées pour ce genre d'analyses. Le second est que l'algorithme va former de nombreux groupes de proximité et ce sera donc à l'observateur de déterminer quel regroupement est le plus pertinent dans son étude. Dans notre cas, nous avons attribué

une couleur aux différents styles de vie, permettant d'inclure une variable qualitative dans les observations afin de réaliser nos analyses puis d'émettre nos hypothèses.

En parallèle, nous avons eu recours à une autre technique d'étude de données. Il s'agit de l'analyse en composante principale (ACP). Cette méthode d'analyse de données consiste à factoriser la totalité des variables en deux (ou plus selon les cas) composantes principales pouvant être représentées sur un graphique intelligible. L'ACP permet de souligner la ressemblance entre les variables et entre les individus. On va donc obtenir un premier graphique nous informant des relations entre les différentes variables dans notre population. Les variables sont représentées par des segments sur le cercle des corrélations. Un angle aigu montre une corrélation entre deux variables (ou une covariance en fonction des paramètres du test), un angle droit implique l'indépendance des variables et enfin un angle obtus désigne une anti-corrélation. La longueur du segment représente le poids de ces variables dans la population testée.

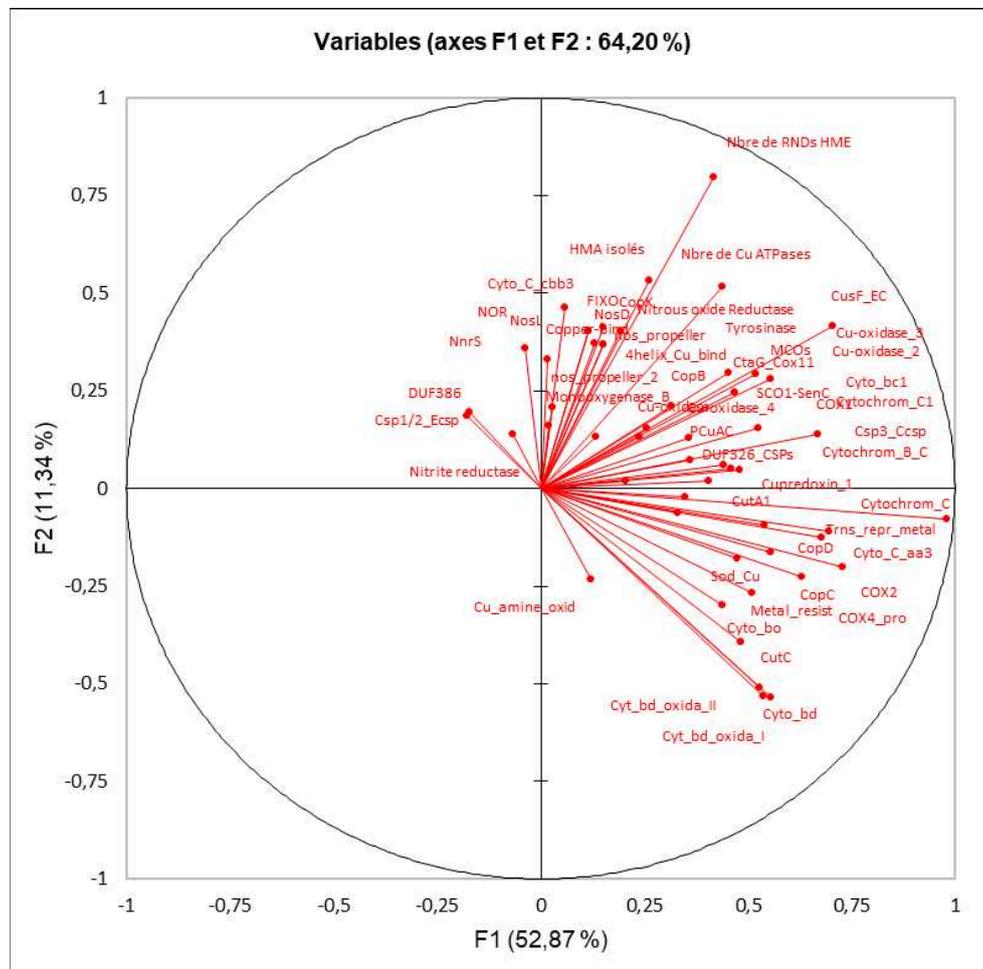
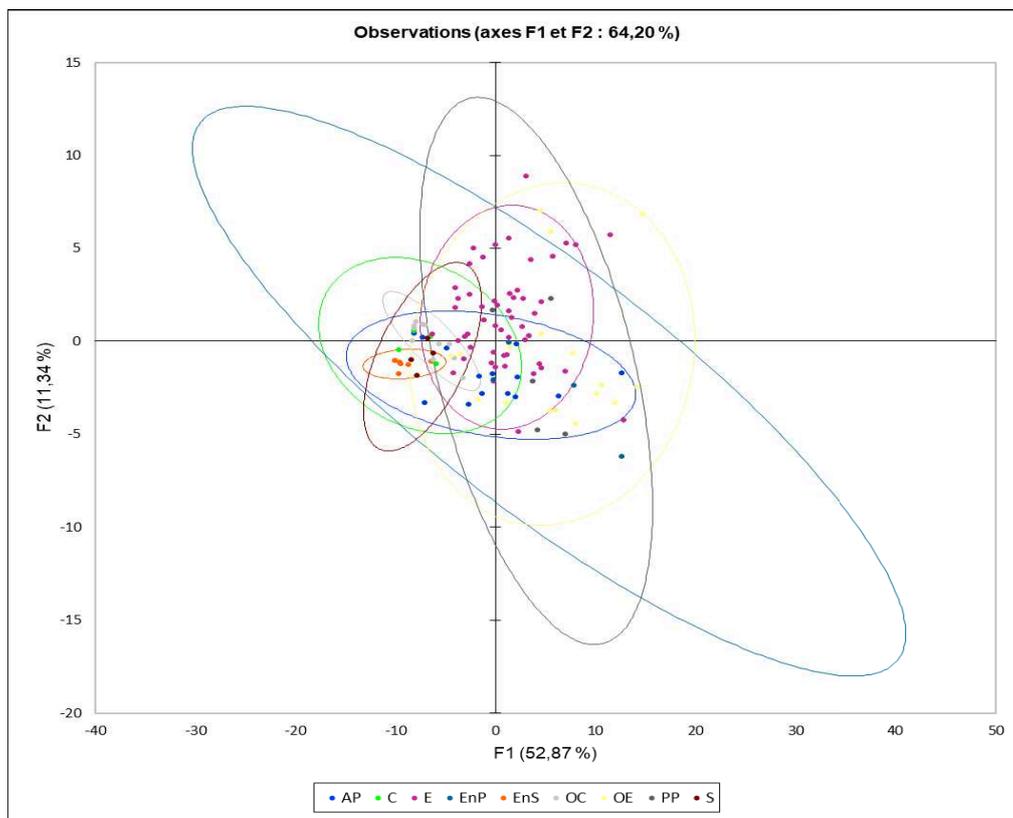


Figure 41 : Cercle des corrélations d'une analyses d'ACP sur la totalité du protéome en lien avec le cuivre et des 119 bactéries.

Par exemple, dans la figure 41 on peut voir que les deux protéines Csp1/2 et DUF386 ont peu de représentants dans notre population mais que la présence de ces protéines est parfaitement corrélée.

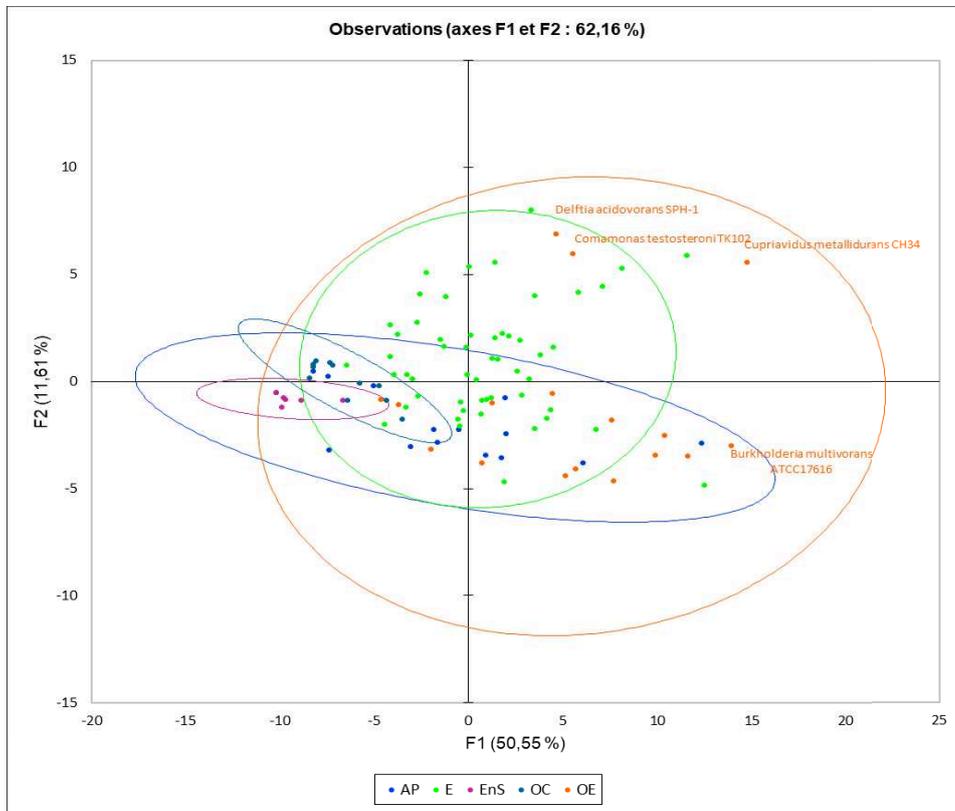
L'ACP présente l'avantage d'intégrer des variables non quantitatives. Nous avons donc ajouté à ces analyses les styles de vie présumés des différentes bactéries.



*Figure 42 : Représentation de la répartition des bactéries sur les deux dimensions en composantes principales calculées à partir de la totalité du protéome en lien avec le cuivre. Les points représentent les bactéries. Les couleurs représentent les différents styles de vie. Les ellipses représentent le périmètre de chaque style de vie avec une certitude de 95%, basé sur notre population modèle. AP : pathogène animal; C : commensal; EnP : endophyte; EnS : endosymbionte; OC : opportuniste commensal (pathogène); OE : opportuniste environnemental; PP : pathogène de plantes; S : symbionte.*

La figure 42 nous présente la répartition des différentes bactéries en fonction du protéome complet en lien avec le cuivre. Cette répartition permet d'établir statistiquement un périmètre pour chaque style de vie. En théorie ces ellipses permettent d'attribuer un style de vie à une bactérie pour laquelle il est inconnu. Néanmoins comme il est possible de le voir, certaines ellipses sont très grandes, en particulier pour les styles de vie symbionte, pathogènes de plantes, commensaux, et endophytes. Les pathogènes de plantes et les endophytes présentent une variabilité génétique très importante en fonction des plantes auxquelles ils sont associés, ainsi qu'à leur relation avec ces plantes. De plus, ces groupes comme les autres cités comportent moins de 5 représentants dans notre modèle. Or l'ACP se base sur la similarité des individus pour mettre les bornes à un groupe.

Par conséquent, la combinaison d'une variabilité élevée et de faibles échantillons ne permet pas d'obtenir des informations pertinentes sur ces groupes. Il apparaît donc nécessaire de retirer ces groupes des analyses.

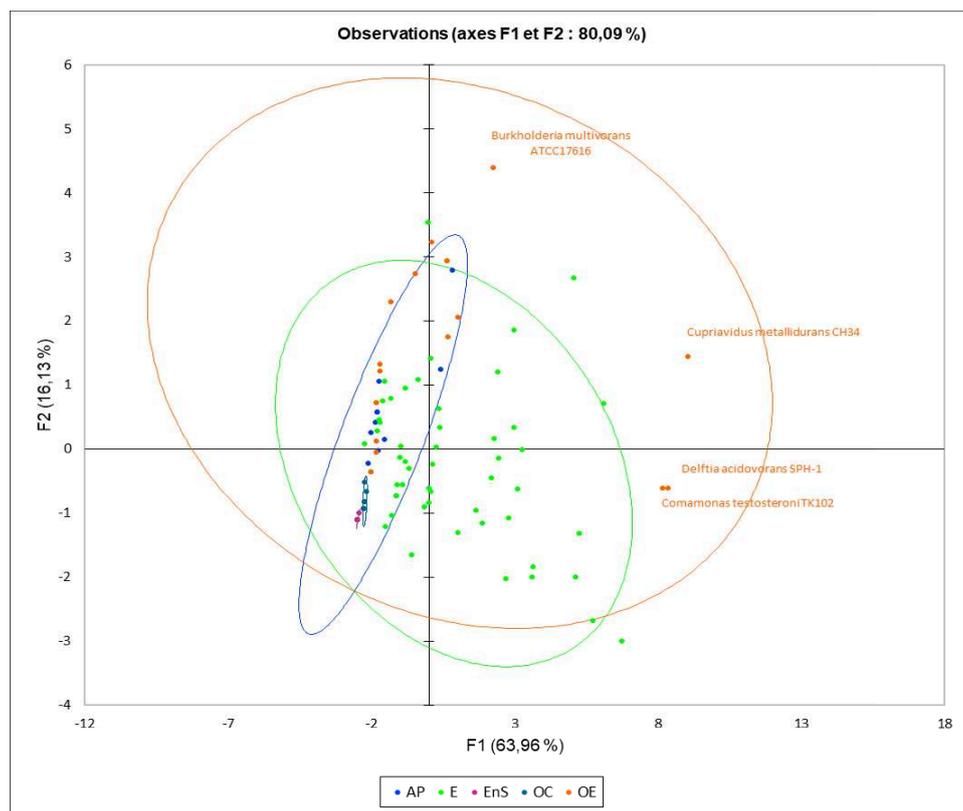


*Figure 43 :* Représentation de la répartition des bactéries sur les deux dimensions en composantes principales calculées à partir de la totalité du protéome en lien avec le cuivre. Les points représentent les bactéries. Les couleurs représentent les différents styles de vie. Les ellipses représentent le périmètre de chaque style de vie avec une certitude de 95%, basé sur notre population modèle. AP : pathogène animal ; EnS : endosymbionte ; OC : opportuniste commensal ; OE : opportuniste environnemental.

Si l'on s'intéresse seulement aux styles de vie comportant plus de 5 représentants, on peut voir que les périmètres sont bien plus définis (figure 43). Les pathogènes animaux font partie d'un sous-groupe de bactéries environnementales et de même les commensaux/opportunistes et les endosymbiontes sont des groupes au sein du périmètre des pathogènes d'animaux. Ces observations confirment les théories de Siguier et al.(2014) mettant en avant la réduction génomique en fonction de la dépendance à l'hôte. De plus le fait que les bactéries les plus avancées dans la coévolution avec l'hôte soient groupées dans une même zone du graphique, où se trouvent également des bactéries environnementales, montre que le sous-génome en lien avec le cuivre n'est pas aléatoire, mais que cette diminution est en fait une spécialisation conservant spécifiquement les systèmes utiles à leurs niches.

Les bactéries environnementales opportunistes présentent une répartition intéressante. En effet, dans les graphiques précédents, il est possible de voir que l'écrasante majorité de ces bactéries sont comprises dans le cercle de pathogènes animaux. Seules trois espèces de ce groupe sont éloignées des autres, *Cupriavidus metallidurans*, *Comamonas testosteroni*, et *Delftia acidovorax*. Au cours de notre étude, nous avons classé ces trois bactéries dans la catégorie des environnementales opportunistes en raison des cas d'infection d'individus immunodéficients rapportés dans la littérature scientifique. Mais ce dernier graphique semble tendre à dire que ces bactéries auraient dû être placées dans la catégorie des bactéries environnementales, car leur profil diverge de celui des autres bactéries opportunistes. Il est probable qu'en changeant ces trois bactéries de catégorie, l'ellipse des bactéries environnementales opportunistes se réduise et soit proche de celle des bactéries pathogènes.

Au sein de l'article nous avons vu que pour définir les styles de vie, les paramètres les plus discriminants sont ceux de l'homéostasie. Nous avons refait l'analyse en composantes principales en utilisant uniquement les mécanismes de l'homéostasie (figure 44).



**Figure 44 :** Représentation de la répartition des bactéries sur les deux dimensions en composantes principales calculée uniquement à partir des protéines de l'homéostasie du cuivre. Les points représentent les bactéries. Les couleurs représentent les différents styles de vie. Les ellipses représentent le périmètre de chaque style de vie avec une certitude de 95%, basé sur notre population modèle. AP : pathogène animal ; EnS : endosymbionte ; OC : opportuniste commensal (pathogène) ; OE : opportuniste environnemental.

Il est possible de voir dans la figure 44 que ces paramètres d'analyse sont beaucoup plus discriminants, à tel point que les ellipses contenant les commensaux et les endosymbiontes sont à peine visibles car très resserrées. Le périmètre des espèces environnementales n'a pas beaucoup changé et on observe le même problème que précédemment concernant les bactéries opportunistes environnementales. Les trois bactéries précédemment citées sont, là encore, bien loin des autres bactéries de leur groupe, confirmant les précédentes observations : ces bactéries ont certes été retrouvées dans quelques rares cas d'infections mais il semble que leurs profils de protéomes en lien avec le cuivre soient plus similaires à celui de bactéries environnementales, même en ne considérant que les protéines de l'homéostasie. Ici, le cas de *Burkholderia multivorans* semble également intrigant car il est également à l'écart des autres bactéries opportunistes environnementales. Néanmoins, il n'y a pas de doute quant au mode de vie de cette bactérie qui vit dans l'environnement mais provoque de façon très récurrente des infections chez les individus immunodéficients. Il est donc probable qu'en l'absence des trois précédentes bactéries, *B. multivorans* constitue la limite haute large de l'ellipse des opportunistes environnementales, qui, pour la borne basse, suivrait le tracé des pathogènes animaux. Cette hypothèse est confirmée par le fait que si l'on prend en compte également l'utilisation du cuivre (cuproprotéines et chaperonnes) et non pas juste l'homéostasie, *B. multivorans* est incluse dans le cercle des pathogènes animaux.

Comme il est possible de le constater ici, l'analyse en composantes principales présente plusieurs limites. En premier, le fait de réduire la totalité des informations à deux variables constituant les dimensions de l'ACP entraîne une perte d'information. Sur les figures précédentes, les pourcentages représentent la quantité d'information initiale conservée par la factorisation. Par conséquent, ce type d'analyse entraîne de la perte d'information potentiellement utile. De plus, pour utiliser cette technique comme un outil permettant de déterminer le style de vie d'une bactérie, il est nécessaire d'avoir un nombre très important d'occurrences permettant de définir des périmètres solides. Or, ici, nous avons une population modèle relativement faible et notre classification des styles de vie est plus ou moins arbitraire, car basée uniquement sur la littérature scientifique. Cette littérature s'intéresse particulièrement aux bactéries pathogènes. Par conséquent, la plupart des bactéries présentées ici sont très peu ou pas du tout étudiées quant à leur mode de vie, en-dehors de leur hôte humain occasionnel. En revanche, dès qu'une bactérie est isolée d'un patient, on parle de pathogène. Nous avons donc une vision biaisée en faveur d'un style de vie, celui de pathogène. Ce type d'analyse pourrait être un outil intéressant s'il était appliqué à un nombre beaucoup plus important de bactéries, car le nombre d'occurrences permettrait de niveler la variabilité potentielle notamment liée à une mauvaise attribution des styles de vie.

Le protéome en lien avec le cuivre constitue un bon paramètre d'étude, car il couvre les spécificités de nombreux styles de vie. Pour les bactéries environnementales, il est possible de déduire des informations sur leurs niches grâce à leurs cuproprotéines. Ces protéines nous informent sur le métabolisme aérobie ou anaérobie de ces bactéries, ou encore sur leur utilisation de composés azotés, de méthane, etc. Les protéines qui assurent l'homéostasie du cuivre peuvent nous informer sur le degré d'exposition à des excès de cuivre. Les bactéries environnementales étant exposées à de nombreux stress cuivriques différents, allant du sol contaminé à l'utilisation du cuivre par les protistes, elles possèdent une grande diversité de mécanismes de défenses. En revanche, les pathogènes stricts qui ne sont soumis qu'à un seul type de stress, appliqué par les cellules phagocytaires, possèdent des systèmes de défense abondants mais moins diversifiés. Enfin, les commensaux et les symbiontes ne déclenchent que peu voire pas de réponse immunitaire et n'ont donc pas besoin de systèmes de défense contre le cuivre.

## 2. Caractérisation de l'homéostasie du cuivre chez *Bordetella pertussis* et comparaison avec *Bordetella bronchiseptica*

### 2.1. Contexte

*Bordetella pertussis* est une bactérie ayant une niche écologique très restreinte. C'est un pathogène vivant uniquement à la surface d'un épithélium. Cette bactérie ne vit pas dans l'environnement avec de nombreux stress métalliques potentiels mais n'est pas non plus intracellulaire comme *L. pneumophila*, qui doivent résister aux métaux (le Cu et le Zn) utilisés par les cellules phagocytaires. Cette bactérie est donc un modèle intéressant pour investiguer le rôle du cuivre à l'interface entre le pathogène et son hôte. Le rôle du cuivre dans l'interaction hôte-pathogène de *B. pertussis* est une thématique nouvelle au sein de notre laboratoire. Au cours de ces recherches, nous avons pu mettre au point plusieurs techniques. De plus, *B. pertussis* nous a réservé de nombreuses surprises avec une homéostasie très originale, doublée d'une régulation faite sur mesure pour correspondre à son mode de vie restreint. Ces données sont susceptibles de constituer un nouvel indice sur la trajectoire évolutive du genre *Bordetella*.

### 2.2. Article: **Streamlining of defenses against copper makes host-restricted pathogen reliant on custom-made operon**

Article en révision favorable

1

2

3 **Streamlining of defenses against copper makes host-restricted**  
4 **pathogen reliant on custom-made operon**

5

6 Alex Rivera-Millot<sup>1</sup>, Stéphanie Slupek<sup>1</sup>, Jonathan Chatagnon<sup>1</sup>, Gauthier Roy<sup>1</sup>, Jean-Michel  
7 Saliou<sup>1</sup>, Gabriel Billon<sup>2</sup>, Véronique Alaimo<sup>2</sup>, David Hot<sup>1</sup>, Sophie Salomé-Desnoulez<sup>1,3</sup>,  
8 Camille Locht<sup>1</sup>, Rudy Antoine<sup>1\*</sup>, Françoise Jacob-Dubuisson<sup>1\*</sup>

9

10 <sup>1</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019- UMR 9017-  
11 CIIL-Center of Infection and Immunity of Lille, Lille, France

12 <sup>2</sup>Univ. Lille, CNRS, UMR 8516 – LASIRE – Laboratoire de Spectroscopie pour les  
13 Interactions, la Réactivité et l'Environnement, F-59000 Lille, France

14 <sup>3</sup> Bio Imaging Center Lille platform (BICeL)

15

16

17 **Keywords:** Bordetella pertussis, Copper homeostasis, Phagocytosis, oxidative stress,  
18 Evolution, Metallochaperone, host-restricted pathogen

19 For correspondence: [rudy.antoine@inserm.fr](mailto:rudy.antoine@inserm.fr); [francoise.jacob@ibl.cnrs.fr](mailto:francoise.jacob@ibl.cnrs.fr)

20 **Abstract**

21 Copper is both essential and toxic to living beings, which therefore tightly control its  
22 intracellular concentration. At the host-pathogen interface, copper is used by phagocytic cells  
23 to kill invading microorganisms. We investigated copper homeostasis in the whooping cough  
24 agent *Bordetella pertussis*, which lives in the human respiratory mucosa and has no  
25 environmental reservoir. *B. pertussis* has considerably streamlined copper homeostasis  
26 mechanisms relative to other Gram-negative bacteria. Its single remaining defense line against  
27 copper intoxication consists in a metallochaperone diverted for copper passivation and two  
28 enzymes involved in peroxide detoxification, which together fight two stresses encountered in  
29 phagolysosomes. The three proteins are encoded by an original, composite operon assembled  
30 in an environmental ancestor and which is under sensitive control by copper. Interestingly, this  
31 system appears to play a role in persistent infection in the nasal cavity of *B. pertussis*-infected  
32 mice. Combining responses to co-occurring stresses in a tailored operon reveals a new strategy  
33 adopted by a host-restricted pathogen to optimize survival at minimal energy expenditure.

34

## 35 **Introduction**

36 Copper is an essential trace element bioavailable in its soluble  $\text{Cu}^{2+}$  form in oxygen-rich  
37 environments <sup>1</sup>. As the redox potential of the  $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$  pair is exquisitely tuned for enzymatic  
38 reactions, most living organisms use copper for oxidation reactions and in electron transfer  
39 chains. However, copper excess is highly toxic. In the reducing environment of the cytoplasm,  
40  $\text{Cu}^{1+}$  displaces iron and other transition metals from their sites in metalloenzymes, causing loss  
41 of function and deregulating metal import systems <sup>2,3</sup>.  $\text{Cu}^{1+}$  also indirectly generates  
42 intracellular oxidative stress <sup>4,5</sup>. Because of its toxicity, living organisms have evolved a variety  
43 of systems to fend off excess of this metal. As such, ubiquitous copper-specific  $\text{P}_{\text{IB}}$ -type  
44 ATPases remove copper from the cytoplasm, in partnership with cytoplasmic copper  
45 chaperones in both eukaryotes and prokaryotes <sup>1,6,7</sup>.

46 Eukaryotic organisms take advantage of copper toxicity to kill invading microorganisms <sup>5,8,9</sup>.  
47 Predatory protists, such as amoebae, and phagocytic cells of higher eukaryotes import copper  
48 for bactericidal purposes <sup>10,11</sup>. In turn, bacteria have developed various resistance mechanisms  
49 against copper excess <sup>12,13</sup>. Copper extrusion systems include CopA-type ATPases, as well as  
50 CusABC-type Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) transporters in Gram-negative  
51 bacteria, and other less well characterized proteins <sup>1,14</sup>. Oxidation of  $\text{Cu}^{1+}$  in the periplasm is  
52 catalyzed by PcoA-type multi-copper oxidases (MCO) <sup>15</sup>. Specific metallochaperones also  
53 contribute to copper homeostasis as part of export systems or by copper sequestration <sup>16,17</sup>.

54 Environmental bacteria are likely to occasionally encounter copper excess or predation by  
55 protists. Therefore, they have developed large resistance arsenals against copper intoxication.  
56 Conversely, bacteria with restricted ecological niches, such as pathogens or commensals,  
57 appear to have fewer copper homeostasis genes <sup>18</sup>. Here, we investigated copper homeostasis  
58 in the whooping cough agent *Bordetella pertussis*, a predominantly extracellular pathogen

59 whose sole natural niche is the human upper respiratory tract <sup>19</sup>. Unlike its relative *Bordetella*  
60 *bronchiseptica*, whose lifestyles alternate between the environment and a mammalian host, *B.*  
61 *pertussis* is host-restricted and was thus used here as a model to study how genomic reduction  
62 by niche specialization affects copper homeostasis at the host-pathogen interface. We  
63 discovered that *B. pertussis* has eliminated most resistance systems typically found in Gram-  
64 negative bacteria. Its only line of defense consists of an original operon to withstand copper  
65 excess and peroxides, both encountered within phagocytic cells.

66

## 67 **Results**

68 **Loss of copper homeostasis systems in *B. pertussis*.** Comparative genomic analyses revealed  
69 that the exclusively human pathogen and its close relative *B. bronchiseptica* share common sets  
70 of copper-homeostasis genes, including genes coding for a CopA ATPase, a PcoA-PcoB-type  
71 MCO system, and CopZ, CopI and CusF copper chaperones, but both lack *cusABC* genes <sup>18</sup>. A  
72 copper storage protein gene is present in the *B. bronchiseptica* but not in the *B. pertussis*  
73 genome <sup>18</sup>. Both species also have genes coding for CueR-type regulators and CopRS-type two-  
74 component systems that control copper homeostasis genes in other bacteria <sup>20,21</sup>.

75 Nevertheless, growth of the two species in the presence of copper revealed distinct  
76 phenotypes (Supplementary Fig. S1). After a prolonged lag, Cu-treated *B. pertussis* started  
77 growing at the same rate as the untreated culture, whereas growth of Cu-treated *B.*  
78 *bronchiseptica* started at the same time as the control but at a slower pace. As ascorbate, a  
79 component of the medium, can reduce Cu<sup>2+</sup> to more toxic Cu<sup>1+</sup>, the lag for *B. pertussis* likely  
80 corresponds to the time period necessary to re-oxidize enough Cu<sup>1+</sup> in the oxygenated cultures  
81 for growth to resume, whereas *B. bronchiseptica* appears to quickly adapt to copper excess.

82 RNA sequencing (RNA-seq) analyses of *B. pertussis* grown continuously in the presence of  
83 2 mM CuSO<sub>4</sub> showed altered expression of a number of stress response and metabolic genes  
84 and of a few Cu-specific genes (Fig. 1a and b and Supplementary Table S1). Those include  
85 *bp2860* and *bp2722* that code for P<sub>IB</sub>-type ATPases, the latter being Zn-specific<sup>22</sup>, and *bp1727*,  
86 *bp1728* and *bp1729* that form an operon (Supplementary Fig. S2) and code for a CopZ-like  
87 copper chaperone, a putative glutaredoxin and a putative oxidoreductase, respectively. Copper-  
88 repressed *bp2921* and *bp2922* were not further investigated here. A 30-min Cu shock of *B.*  
89 *pertussis* confirmed up-regulation of *bp2860* and *bp1727-bp1728-bp1729* (Fig. 1c and  
90 Supplementary Table S2). In contrast, *bp3314-bp3315-bp3316* coding for CopI, PcoA, and  
91 PcoB homologues were hardly expressed and not regulated by copper in *B. pertussis*, in contrast  
92 to their orthologues in *B. bronchiseptica* (Figs. 1b and d and Supplementary Table S3).  
93 Proteomic analyses of the two organisms in the presence of copper showed increased  
94 production of the proteins coded by the upregulated genes, except for CopA in *B. pertussis* (Fig.  
95 1b, Supplementary Tables S4 and S5 and Supplementary Fig. S3).

96 To investigate the role of copper homeostasis genes, we inactivated *bp3314-bp3315-bp3316*  
97 (*pcoA* operon), *bp0157-bp0158* (*copRS*), *bp2860* (*copA*) and *bp1727-bp1728-bp1729* (*copZ*  
98 operon) in *B. pertussis*. Except for the latter, growth of those mutants was affected by the  
99 addition of copper to the medium to the same extent as that of the parental strain  
100 (Supplementary Fig. S4). In all available *B. pertussis* genomes, three IS481 sequences are  
101 present upstream of *bp3314* and one is located within the 5' end of *bp2860* (Supplementary  
102 Figs. S5 and S6), which most likely inactivated the *pcoA* and *copA* operons, as evidenced by  
103 the low expression levels both in the presence and in the absence of copper (Fig. 1b). Altogether,  
104 *B. pertussis* has considerably streamlined its response to copper excess and has maintained only  
105 one system.

106

107 **Function of the *copZ* operon.** A strong effect of copper excess on growth was observed with  
108 the *Δbp1727* (*copZ*) mutant, and therefore we focused on that operon. We generated two  
109 additional deletion mutants (*Δbp1727-bp1728-bp1729* and *Δbp1728-bp1729*) and measured  
110 their growth in the presence or absence of copper. Copper excess caused a major growth defect  
111 to two of the mutants, *Δbp1727* and *Δbp1727-bp1728-bp1729*, and the phenotype of the latter  
112 was complemented by ectopic expression of the operon (Fig. 2a). The growth defect was  
113 exacerbated in the absence of glutathione, which *B. pertussis* cannot synthesize, in the culture  
114 medium, suggesting that glutathione contributes to copper tolerance in *B. pertussis* (Fig. 2b).  
115 Thus, CopZ, encoded by the first gene of the operon, plays a major role in copper resistance,  
116 unlike the other two proteins.

117 In other bacteria, CopZ binds Cu<sup>1+</sup> and transfers it to its ATPase partner for export <sup>23</sup>.  
118 Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) analyses using iron as  
119 a control showed that *B. pertussis* CopZ binds copper with a stoichiometry of two ions per  
120 monomer, as reported for *Bacillus subtilis* CopZ <sup>24</sup> (Supplementary Fig. S7). In the absence of  
121 a functional CopA in *B. pertussis*, CopZ most likely sequesters cytosolic copper to counter its  
122 toxicity.

123 Homology searches indicated that *bp1728* and *bp1729* code for a chimeric peroxiredoxin-  
124 glutaredoxin protein <sup>25</sup> and a glutathione reductase, respectively. Orthologues of these enzymes  
125 were shown to reduce peroxides at the expense of glutathione and to regenerate glutathione  
126 using NAD(P)H, respectively <sup>26,27</sup>. Using purified recombinant BP1728 and BP1729 proteins  
127 in *in vitro* enzymatic assays as described <sup>26,27</sup>, we confirmed that these proteins are a  
128 glutathione-dependent peroxidase and a glutathione reductase, respectively. We thereafter  
129 called them PrxGrx (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) and GorB (Supplementary Fig. S7).

130 To test whether the PrxGrx-GorB system protects bacteria against peroxides, we determined  
131 mutant survival after oxidative stress <sup>28</sup>. A 30-min exposure killed each of the three mutant

132 strains to a greater extent than their parental strain, and the phenotype of the three-gene mutant  
133 was complemented by ectopic expression of the operon (Figure 2c). The phenotype of the  
134  $\Delta copZ$  mutant indicated that, in addition to PrxGrx-GorB, CopZ also protects *B. pertussis*  
135 against reactive oxygen species (ROS).

136 As a human-restricted pathogen, *B. pertussis* simultaneously encounters oxidative and  
137 copper stresses in phagolysosomes of phagocytic cells. We thus tested the role of the operon in  
138 intracellular survival within human macrophages and in a murine model of lung and nasal  
139 colonization. The deletion mutant was killed faster by macrophages than its parental strain (Fig.  
140 2d). In the animal model, bacterial colonization in the lungs over time was indistinguishable  
141 between the two strains, while the deletion mutant was cleared more quickly from  
142 nasopharynxes than the parental strain (Figs. 2e and f).

143

144 **Copper regulation of the *copZ-prxgrx-gorB* operon.** Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) on  
145 *prxgrx* showed a 30-fold up-regulation of the operon by copper, even at micromolar  
146 concentrations (Fig. 3a and Supplementary Fig. S8). qRT-PCR experiments on the very small  
147 *copZ* gene were unsuccessful, as no qRT-PCR primer pairs were found to work. Inactivation of  
148 *bp1726*, in antisense orientation of the *copZ-prxgrx-gorB* operon and coding for a putative  
149 CueR regulator<sup>20</sup>, resulted in a markedly decreased but not abolished transcriptional response  
150 to copper (Fig. 3a). This indicated that the operon is regulated by CueR and possibly also by a  
151 second system.

152 We determined the transcriptional start site of the operon by 5' rapid amplification of cDNA  
153 ends (5' RACE). The 5'UTR is 61 nucleotides long, and putative CueR binding sites were  
154 identified within the promoter, as described for *Escherichia coli*<sup>29</sup> (Supplementary Fig. S6).  
155 Attempts to produce a recombinant CueR protein in *E. coli* to be used for electrophoretic

156 migration shift assays (EMSA) were unsuccessful, suggesting that its over-production may be  
157 toxic to *E. coli*.

158 A transcriptional fusion between the promoter of the operon and an mRFP1 reporter gene  
159 was introduced in *B. pertussis* before infecting macrophages deprived of copper or  
160 supplemented with copper. Epifluorescence confocal microscopy one hour after infection  
161 showed that fluorescence of bacteria engulfed by copper-supplemented macrophages was  
162 significantly more intense than in copper-deprived macrophages (Figs. 3e and f), indicating  
163 copper-mediated upregulation of the operon in phagolysosomes.

164

165 **Regulation by peroxides.** As shown above, residual regulation of *prxgrx* by copper was  
166 observed in the *cueR* KO strain (Fig. 3a). Since copper excess generates oxidative stress<sup>4</sup>, we  
167 hypothesized that a ROS-sensing regulator might be involved in this residual regulation of  
168 *prxgrx*. We examined all known prokaryotic PrxGrx homologues and searched for putative  
169 regulatory genes in the corresponding loci. An *oxyR* gene was found directly adjacent and in  
170 antisense orientation in 19.4 % of cases (Supplementary Table S6). OxyR regulators have been  
171 shown to control bacterial responses to peroxides<sup>30,31</sup>.

172 Treatment of *B. pertussis* with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in a 4-fold upregulation of *prxgrx*, which was  
173 abolished by inactivation of the putative *oxyR* gene, *bp1613* (Fig. 3b). Using EMSA, we  
174 detected a protein-DNA complex between recombinant OxyR and the *copZ-prxgrx* intergenic  
175 region but not the *cueR-copZ* intergenic region (Fig. 3c). Putative OxyR binding boxes can be  
176 found in the *copZ-prxgrx* intergenic region (Supplementary Fig. S9). Thus, two transcriptional  
177 activators control the expression of this operon in response to distinct signals (Fig. 3d). The  
178 three genes are strongly up-regulated by copper through CueR, and in addition, the last two  
179 genes are more modestly up-regulated by peroxides through OxyR.

180 Finally, we searched  $\beta$  proteobacterial genomes for similar composite operons to determine  
181 the phylogenetic context in which they arose. Out of 86 bacterial genera<sup>18</sup>, 16 harbor a *prxgrx*  
182 gene, of which 11 have *prxgrx-gorB* operons. Only *Bordetella* and *Achromobacter* have  
183 complete *copZ-prxgrx-gorB* operons. The latter two genera encompass pathogenic or  
184 opportunistic species. Occurrence of this operon thus appears to be linked to eukaryotic cell-  
185 associated lifestyles.

186

## 187 **Discussion**

188 Copper is both an essential and toxic metal for living organisms, including bacteria, yet copper  
189 homeostasis has been studied only in a few model organisms. We describe here that *B. pertussis*,  
190 a host-restricted, mostly extracellular bacterium that lives on human mucosal surfaces, has  
191 considerably streamlined its resistance against copper intoxication. *B. pertussis* mainly relies  
192 on a composite, three-protein system strongly upregulated by copper to counter both copper  
193 excess and peroxide stress. This system evolved from an environmental bacterial ancestor by  
194 diverting a ubiquitous cytoplasmic metallochaperone for copper sequestration and recruiting  
195 genes involved in protection against oxidative stress in an operon regulated by copper. This  
196 assembly enables the bacterium to mount a strong response against two stresses simultaneously  
197 encountered in the phagolysosomal compartment. Molecular traces of this evolution can be  
198 found in the OxyR-mediated regulation of the last two genes of the operon in response to  
199 peroxide stress. Persistence of this ancestral control may be useful to a strictly aerobic  
200 bacterium when it resides outside of the phagolysosomal environment<sup>32</sup>.

201 Genomic, transcriptomic and proteomic analyses demonstrated the loss in *B. pertussis* of  
202 most well-known resistance mechanisms against copper excess. This contrasts with other  
203 respiratory tract pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* and

204 *B. bronchiseptica*<sup>33,34</sup>. Unlike *B. pertussis*, *M. tuberculosis* is a professional intracellular  
205 bacterium that resides within macrophages and other cell types, *P. aeruginosa* can occupy  
206 various niches including environmental milieus and *B. bronchiseptica* alternates between  
207 pathogenic and environmental life cycles<sup>35</sup>. In humans, copper is not free but complexed with  
208 proteins such as ceruloplasmin or metallothionein. Therefore, *B. pertussis* is unlikely to  
209 experience copper excess, except when it is engulfed by phagocytic cells, a fate it actively tries  
210 to avoid<sup>36,37</sup>. *B. pertussis* can thus afford the loss of most defense mechanisms against copper  
211 intoxication, because of its specialization to a restricted niche.

212 *B. pertussis* is mainly an extracellular pathogen, with limited survival rates upon  
213 phagocytosis<sup>38</sup>. Therefore, it may be surprising that it has nonetheless conserved an active-  
214 defense system. Nevertheless, *B. pertussis* has been shown to occasionally reside within  
215 phagocytic cells<sup>38-40</sup>. We propose thus that *B. pertussis* adopts a two-pronged strategy with  
216 respect to phagocytic cells while limiting energy expenditure. The major arm of this strategy  
217 uses immunomodulatory virulence factors to target neutrophils and macrophages by disabling,  
218 delaying or dysregulating their responses to infection<sup>36,37,41-44</sup>. The second arm is to  
219 overproduce specific proteins, including those identified here, that enable bacteria to survive to  
220 some extent within macrophages while the latter face the virulence factors. Absence of the  
221 *copZ-prxgrx-gorB* operon did not affect *B. pertussis* colonization of the lungs, but significantly  
222 shortened the colonization of the nasal cavity of mice. In murine nasal tissues, a significant  
223 proportion of the bacteria indeed reside within immune cells upon intranasal infection with *B.*  
224 *pertussis* (V. Dubois, personal communication).

225 Copper and peroxide stresses are interlinked, as copper excess indirectly causes oxidative  
226 stress<sup>4</sup>. Placing the *copZ*, *prxgrx* and *gorB* genes under copper control is thus an efficient way  
227 of fighting co-occurring threats, especially considering that CopZ also protects the bacterium  
228 from peroxide stress. This activity most likely stems from CopZ's ability to form redox-

229 sensitive Cys-mediated dimers <sup>45</sup>. This property is reminiscent of the eukaryotic CopZ  
230 homologue, Atox1, both an anti-oxidant protein and the copper chaperone partner of the CopA  
231 homologues ATP7A/B <sup>46,47</sup>. In *B. pertussis*, CopZ sequesters copper but no longer participates  
232 in its export. In some bacteria, these two functions are performed by distinct CopZ paralogues  
233 <sup>17</sup>.

234 Pathogenic *Bordetella* species are thought to have derived from environmental ancestors <sup>48</sup>.  
235 The *copZ-prxgrx-gorB* operon was only found in two closely related genera, *Bordetella* and  
236 *Achromobacter*, arguing that it originated in a common environmental ancestor. Known  
237 *Achromobacter* species are environmental bacteria or opportunistic pathogens. The need to  
238 survive predation by protists, which employ killing mechanisms similar to those of  
239 macrophages, including the use of copper <sup>10</sup>, exerts a strong selective pressure on environmental  
240 bacteria. This selective pressure most likely accounts for the panoply of resistance systems  
241 found in *Achromobacter* <sup>18</sup>, which most likely were already present in the environmental  
242 ancestor of *Achromobacter* and *Bordetella*. Persistence in amoeba could constitute one of the  
243 evolutionary steps allowing *Bordetellae* to infect mammals. *B. bronchiseptica* exemplifies an  
244 intermediate in this evolution, as this respiratory pathogen of mammals which is able to  
245 multiply in amoebae and potentially uses them as transmission vectors has conserved ancestral  
246 genes for intracellular persistence <sup>35,49</sup>. As a host-restricted pathogen, *B. pertussis* has traded  
247 most of this ability for a lighter coding potential. *B. pertussis* has a number of cuproproteins <sup>18</sup>  
248 and therefore requires copper for growth. It might thus also use CopZ for nutritional passivation  
249 <sup>50</sup>, i.e. as a copper store for future needs.

250

## 251 **Materials and methods**

252 **Culture conditions.** Modified Stainer-Scholte (SS) liquid medium and Bordet-Gengou blood-  
253 agar (BGA) medium were used with the appropriate antibiotics to culture *B. pertussis* BPSM  
254 and its derivatives. As copper ions are Lewis acids and *B. pertussis* requires buffered medium  
255 close to pH 7, a stock solution (62 mM of CuSO<sub>4</sub>, 100 mM Tris, pH 5.5) in the fraction A of  
256 SS medium was used to supplement the medium with copper. The control cultures were  
257 prepared by adding the same volumes of 100 mM Tris-HCl (pH 5.5) to SS medium. Growth  
258 was monitored using an Elocheck device (Biotronix) by continuously measuring the optical  
259 density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). For growth yields, OD<sub>600</sub> were determined after 24 h of growth,  
260 using five biological replicates for each condition and strain. Glutathione was omitted from the  
261 culture medium where indicated. To monitor copper regulation by qRT-PCR, the bacteria were  
262 grown for 16 h in the presence of 2 mM CuSO<sub>4</sub>, and the cultures were stopped at OD<sub>600</sub> of 1.5-  
263 1.6. To subject *B. pertussis* to oxidative stress for qRT-PCR analysis, the bacteria were grown  
264 to OD<sub>600</sub> of 1-1.5, and 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the cultures for 30 minutes. To measure  
265 survival to oxidative shock, the bacteria were grown for 36 h on BGA from standardized stocks,  
266 resuspended in PBS (pH 7.2) containing 500 μM of hypoxanthine, and then diluted in the same  
267 solution to obtain ~ 50,000 bacteria in 300 μl in 15-ml tubes. 0.05 U.ml<sup>-1</sup> xanthine oxidase was  
268 added to produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>28</sup>, and the bacteria were incubated for 30 minutes at 37 °C with  
269 shaking. Serial dilutions were plated onto BGA to count CFUs, using control suspensions  
270 incubated as above. Three biological replicates and three technical replicates were made. CFU  
271 counts of the initial suspensions were also performed.

272 **Construction of strains and plasmids.** The plasmids, deletion mutants and complemented  
273 mutant were constructed as described <sup>51</sup>. The inactivation mutants were constructed as  
274 described <sup>52</sup>. For pProm1727-mRFP1, the *cueR-copZ* intergenic region including the first 7  
275 codons of *copZ*, and the *mRFP1* gene without its initiation codon were amplified by PCR and  
276 cloned as BamHI-XbaI and XbaI-HindIII restriction fragments respectively, to generate a

277 translational fusion in pBBR1-MCS5<sup>53</sup>. All plasmids and primers are listed in the  
278 Supplementary Table S7.

279 **RNA sequencing and qRT-PCR.** Generation of cDNA library and PCR were performed as  
280 described<sup>54</sup>. The RNA-seq data were analyzed using Rockhopper v2.0.3 with the default  
281 parameters to calculate the reads per kilobase per million base pairs (RPKM) values for each  
282 coding sequence using the *B. pertussis* Tohama I BX470248 genome annotation. All RNA-seq  
283 experiments were performed on biological duplicates. The results fully supported preliminary  
284 microarray analyses for *B. pertussis*. qRT-PCR were performed on 3 or 4 separate cultures with  
285 at least 3 technical replicates for each condition. To map the transcriptional initiation site by  
286 rapid amplification of cDNA 5' ends (RACE), total RNA obtained as described above was  
287 treated with the GeneRacer kit (Invitrogen) using appropriate RACE primers.

288 **Mass spectrometry proteomic analyses.** *B. bronchiseptica* and *B. pertussis* were grown in  
289 SS medium for 16 h supplemented or not with 2 mM CuSO<sub>4</sub>, and the cultures were stopped at  
290 OD<sub>600</sub> of 1.6-1.8. The bacteria were collected by centrifugation, resuspended in 50 mM Tris-  
291 HCl (pH 7.2), 100 mM NaCl, with Complete protease inhibitor (Roche) and lysed with a French  
292 Press. Clarified lysates were ultracentrifuged for 1 hour at 100,000 g at 4 ° C to separate soluble  
293 and insoluble fractions. Both fractions were heated at 100°C in 5% SDS, 5% β-  
294 mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM Tris (pH 8) for 3 min and loaded on a  
295 10% acrylamide SDS-PAGE gel. The migration was stopped soon after the samples entered the  
296 separating gel. The gel was briefly stained with Coomassie Blue, and five contiguous gel slices  
297 were taken for each sample. In-gel digestion and separation and detection of the protein digests  
298 were performed as described<sup>55,56</sup>. Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were  
299 processed and converted into \*.mgf peak list format with Proteome Discoverer 1.4 (Thermo  
300 Fisher Scientific). MS/MS data was interpreted using search engine Mascot (version 2.4.0,  
301 Matrix Science, London, UK) installed on a local server. Searches were performed with a

302 tolerance on mass measurement of 10 ppm for precursor and 0.02 Da for fragment ions, against  
303 two target decoy databases composed of all potential open reading frames of at least 30 residues  
304 between stop codons of *B. pertussis* or *B. bronchiseptica* (54890 and 74418 entries,  
305 respectively), plus sequences of recombinant trypsin and classical contaminants (118 entries).  
306 Cys carbamidomethylation or propionamidation, Met oxidation, and protein N-terminal  
307 acetylation were searched as variable modifications. Up to one trypsin missed cleavage was  
308 allowed. Peptides were filtered out with Proline 2.0 according to the cutoff set for proteins hits  
309 with 1 or more peptides larger than 9 residues, ion score > 10 and 2% protein false positive  
310 rates. Spectral counting analyses were performed with Proline 2.0.

311 **Protein production.** For the production of CopZ, PrxGrx and GorB, recombinant pQE30  
312 derivatives (Qiagen) were introduced into *E. coli* M15(pREp4). The cells were grown in LB  
313 medium at 37°C under orbital shaking, and expression was induced at OD<sub>600</sub> of 0.8 with 1 mM  
314 IPTG for 3 hours. Production of recombinant OxyR was done in *E. coli* SG13009(pREp4) in  
315 M9 medium with 2% casaminoacids and 250 μM ascorbate. At OD<sub>600</sub> of 0.4, 100 μM of IPTG  
316 was added, and the culture was continued for 16 hours at 14 °C. The bacteria were collected,  
317 and the pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM  
318 imidazole, plus 1 mM TCEP for CopZ and OxyR. The bacteria were lysed with a French press,  
319 and the lysates were clarified by centrifugation. The proteins were purified by chromatography  
320 on Ni<sup>++</sup> columns. Concentrations were measured using the BCA assay kit (ThermoFisher  
321 Scientific) for PrxGrx and GorB, and with the Qbit protein assay kit for CopZ and OxyR  
322 (ThermoFisher Scientific).

323 **Metal binding to CopZ.** Purified CopZ (30 μM) was incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5),  
324 100 mM NaCl, 1 mM TCEP and 100 mM EDTA for 30 minutes with stirring at room  
325 temperature to remove bound metal ions and then dialyzed against the same buffer without

326 EDTA, using 3.5-kD cutoff membranes. The apo form of the protein precipitated in the absence  
327 of TCEP. Iron sulfate or copper chloride solutions were prepared in the same buffer containing  
328 1 mM TCEP and 25 mM ascorbate. CopZ was mixed with 125  $\mu\text{M}$  of either metal for 5 minutes  
329 at room temperature, the samples were then dialyzed against the same buffer and finally  
330 acidified with 6% nitric acid. Elemental Cu and Fe analyses were performed by ICP-AES  
331 (Agilent, model 5110) in axial mode. The wavelengths selected for Cu and Fe analyses were  
332 327.395 nm and 238.204 nm, respectively.  $^{63}\text{Cu}$  and  $^{65}\text{Cu}$  concentrations were both analysed to  
333 evidence potential interferences. To remove polyatomic interferences, a  $100\text{ mL min}^{-1}$  He flow  
334 was added at the collision reaction interface. Impurity of  $^{129}\text{Xe}$  in the Ar gas used for generating  
335 the plasma was chosen as internal standard to detect any instrumental drift. External calibrations  
336 were performed from standard solution at  $1\text{ g L}^{-1}$  (Astasol), adequately diluted and acidified to  
337 be in the range of the unknown concentrations.

338 **Enzymatic assays.** Buffer exchange was performed to obtain the purified recombinant proteins  
339 in 0.1 M sodium/potassium phosphate (pH 7.6). Enzymatic activity of GorB was followed at  
340 25 °C in the same buffer containing 0.3 mM NADPH, 8 mM GSH, and various concentrations  
341 of  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>26</sup>. The protein was added last at a concentration of 0.5 nM. The decrease of NADPH  
342 concentration was followed by measuring the absorbance of the solution at 340 nm. Activity of  
343 PrxGrx was detected in a coupled assay performed at 25°C in the same buffer with 0.3 mM  
344 NADPH, 6 mM GSH, 0.25 nM GorB and 1  $\mu\text{M}$  PrxGrx<sup>27</sup>. 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added last to start  
345 the reaction, which was monitored as above.

346 **EMSA.** Amplicons of 127 bp and 139 bp, corresponding to the *cueR-copZ* (IGR1) and *copZ-*  
347 *prxgrx* (IGR2) intergenic regions, respectively, were mixed at 1  $\mu\text{M}$  with 0, 2 or 20  $\mu\text{M}$   
348 recombinant OxyR, in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM TCEP.  
349 After 30 min at 37°C, the samples were loaded onto a 6% acrylamide gel containing 25 mM

350 Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM glycine, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Electrophoresis was performed on ice for  
351 1h30 at 25 mA in the same buffer. DNA was detected by ethidium bromide staining.

352 **Phagocytosis assays.** THP1 cells were cultured in RPMI medium with 10% fetal bovine serum  
353 (RPMI/FBS). They were then treated with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma)  
354 for 24 h to induce differentiation into macrophages and washed in PBS. The bacteria were  
355 grown at 37°C on BGA for 48 hours, resuspended in PBS and incubated with the macrophages  
356 at a multiplicity of infection of 100 for 30 min at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The macrophages were  
357 then washed with PBS containing 100 µg/ml polymyxin B to eliminate extracellular bacteria.  
358 For the following incubation the concentration of polymyxin was lowered to 5 µg/ml in  
359 RPMI/FBS, and one and four hours later macrophages were washed with PBS and lysed with  
360 0.1% saponine. Serial dilutions were plated onto BGA for CFU counting. The experiments were  
361 performed in triplicates. For fluorescence microscopy, RPMI/FBS was supplemented with 50  
362 µM bathocuproine disulfonate (BCS) or 20 µM CuCl<sub>2</sub> during THP1 differentiation and for the  
363 following 12 hours, and after washing the cells in RPMI, fresh RPMI/FBS was added 1 hour  
364 before contact. Bacteria harboring the reporter plasmid pProm1727-mRFP1 were grown for 12-  
365 13 hours in SS medium containing 50 µM BCS. They were collected by centrifugation,  
366 resuspended in PBS to an OD<sub>600</sub> of 1 and incubated with macrophages as above. After one hour  
367 of contact, extracellular bacteria were eliminated, RPMI/FBS supplemented with copper or  
368 BCS was added, and the incubation was continued for one hour at 37°C. Finally, the cells were  
369 fixed with Formalin (Sigma) for 15 minutes at room temperature and washed three times with  
370 PBS. The cell nuclei and the plasma membranes were labeled with DAPI at 30 µg/ml (Sigma)  
371 and Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Invitrogen) at 5 µg/ml for 10  
372 minutes at room temperature. Cells were then washed twice with PBS. Images were captured  
373 by confocal microscopy with a Zeiss LSM 880 microscope, and wide fields used for the  
374 calculations were captured with a spinning disk microscope Nikon/Gataca system csu-w1. The

375 images were analyzed with the Fiji software<sup>57</sup>. All parameters were set to the same values on  
376 all images. The bacteria were identified and counted with the 3D Object Counter module, and  
377 the fluorescence intensity was calculated by evaluating the average gray levels of the red  
378 objects. Three images containing 200 to 266 detectable bacteria were analyzed for each  
379 condition.

380 **Animal experiments.** The bacteria were grown on BGA for 48 h and resuspended in sterile  
381 PBS to 10<sup>6</sup> bacteria per 20 µL. Female, 6-weeks-old JAX™ BALB/ cByJ mice (Charles River)  
382 were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine, atropine and valium and  
383 infected by intranasal inoculation with 10<sup>6</sup> bacteria. Groups of 3-5 animals per bacterial strain  
384 were sacrificed 3 h, and 4, 7, 14, or 21 days post-inoculation. Their lungs and naso-pharynxes  
385 were removed in a sterile manner and homogenized using an Ultra Thurax apparatus as  
386 described<sup>58</sup>. The suspension was serially diluted in PBS and plated onto BGA for CFU  
387 counting. All the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French  
388 Ministry of Research regarding animal experiments, and the protocols were approved by the  
389 Ethical Committees of the Region Nord Pas de Calais and the Ministry of Research (agreement  
390 number APAFIS#9107±201603311654342 V3).

391 **Bioinformatic analyses.** The regions upstream of CueR-regulated genes in *E. coli* and  
392 *Rubrivivax gelatinosus* (*copA* and *cueO*) were aligned, and Glam2 from the MEME 5.1.0 suite<sup>59</sup>  
393 was used to define a pattern. This motif was sought on the genome of *B. pertussis* using  
394 Glam2scan. To identify homologues of PrxGrx, the NCBI nr database was searched with the  
395 HMMER software<sup>60</sup> for proteins carrying both a Redoxin (Pfam: PF08534) and a Glutaredoxin  
396 (Pfam: PF00462) domain signature. The corresponding genes and the 5 upstream and  
397 downstream genes were retrieved from databases of prokaryotic DNA sequences found in the  
398 NCBI site (GenBank, RefSeq and WGS).

399 **Statistical analyses.** All statistical tests were performed on the GraphPad Prism software using  
400 non-parametric two-tailed Mann-Whitney (confidence level 95%), except for the fluorescence  
401 quantification experience, where the sample size allowed to use a parametric two-tailed Student  
402 T-test (confidence level 95%; 1421 degrees of freedom).

### 403 **Acknowledgments**

404 We thank Violaine Dubois for sharing unpublished data and Blanche Daunou for preliminary  
405 work with recombinant proteins. A. R.-M. and G. R. acknowledge the support of doctoral  
406 fellowships from the University of Lille- Region Hauts-de-France and from the University of  
407 Lille, respectively. A. R.-M. also thanks the Fondation de la Recherche Médicale (FRM) for  
408 their support. This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche  
409 Médicale (INSERM) and the University of Lille. ICP-AES measurements were performed on  
410 the Chevreul Institute Platform (U-Lille / CNRS). The Region Hauts de France and the French  
411 government are acknowledged for co-funding this equipment.

412

### 413 **References**

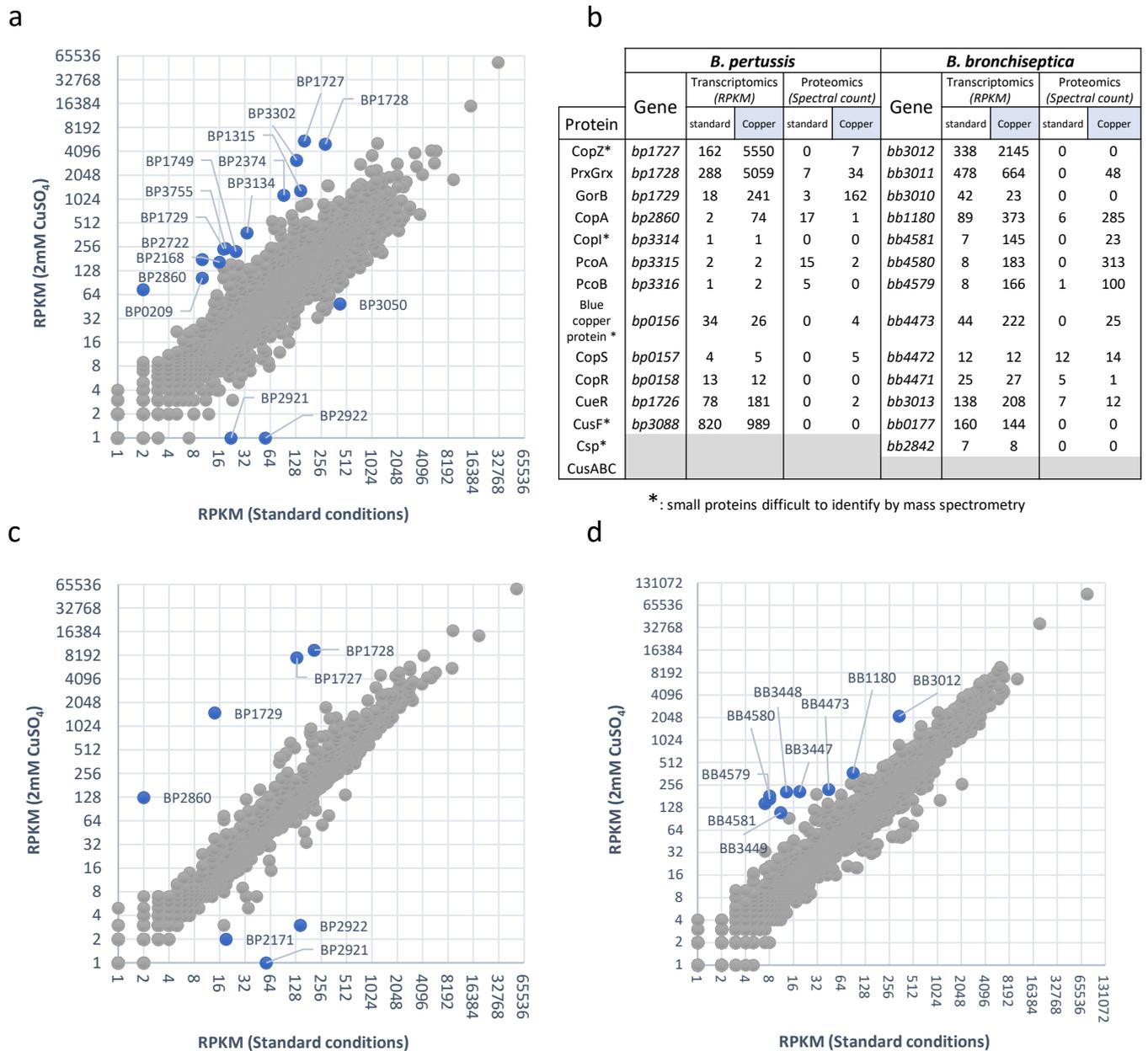
- 414 1. Solioz, M. *Copper and Bacteria. Evolution, homeostasis and toxicity*, (Springer Nature  
415 Switzerland AG, Cham, Switzerland, 2018).
- 416 2. Chillappagari, S. *et al.* Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur  
417 cluster formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**, 2512-24 (2010).
- 418 3. Macomber, L. & Imlay, J.A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary  
419 intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8344-9 (2009).
- 420 4. Dalecki, A.G., Crawford, C.L. & Wolschendorf, F. Copper and Antibiotics: Discovery,  
421 Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. *Adv Microb Physiol* **70**,  
422 193-260 (2017).
- 423 5. Hodgkinson, V. & Petris, M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol*  
424 *Chem* **287**, 13549-55 (2012).
- 425 6. Migocka, M. Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries  
426 for balancing copper in living systems. *IUBMB Life* **67**, 737-45 (2015).
- 427 7. O'Halloran, T.V. & Culotta, V.C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for  
428 metal ions. *J Biol Chem* **275**, 25057-60 (2000).

- 429 8. White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K. & Petris, M.J. A role for the ATP7A copper-  
430 transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* **284**, 33949-56  
431 (2009).
- 432 9. Stafford, S.L. *et al.* Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for  
433 zinc and copper. *Biosci Rep* **33**(2013).
- 434 10. Hao, X. *et al.* A role for copper in protozoan grazing - two billion years selecting for  
435 bacterial copper resistance. *Mol Microbiol* **102**, 628-641 (2016).
- 436 11. Sheldon, J.R. & Skaar, E.P. Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Curr Opin*  
437 *Immunol* **60**, 1-9 (2019).
- 438 12. Chandrangsu, P., Rensing, C. & Helmann, J.D. Metal homeostasis and resistance in  
439 bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**, 338-350 (2017).
- 440 13. Ladomersky, E. & Petris, M.J. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* **7**,  
441 957-64 (2015).
- 442 14. Arguello, J.M., Raimunda, D. & Padilla-Benavides, T. Mechanisms of copper  
443 homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 73 (2013).
- 444 15. Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C. & Montfort, W.R. Cuprous oxidase activity of CueO  
445 from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 7815-7 (2004).
- 446 16. Durand, A. *et al.* c-Type Cytochrome Assembly Is a Key Target of Copper Toxicity  
447 within the Bacterial Periplasm. *mBio* **6**, e01007-15 (2015).
- 448 17. Novoa-Aponte, L., Ramirez, D. & Arguello, J.M. The interplay of the metallosensor  
449 CueR with two distinct CopZ chaperones defines copper homeostasis in *Pseudomonas*  
450 *aeruginosa*. *J Biol Chem* **294**, 4934-4945 (2019).
- 451 18. Antoine, R., Rivera-Millot, A., Roy, G. & Jacob-Dubuisson, F. Relationships Between  
452 Copper-Related Proteomes and Lifestyles in beta Proteobacteria. *Front Microbiol* **10**,  
453 2217 (2019).
- 454 19. Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F. & Cotter, P.A. *Bordetella pertussis*  
455 pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* **12**, 274-88 (2014).
- 456 20. Capdevila, D.A., Edmonds, K.A. & Giedroc, D.P. Metallochaperones and  
457 metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem* **61**, 177-200 (2017).
- 458 21. Rademacher, C. & Masepohl, B. Copper-responsive gene regulation in bacteria.  
459 *Microbiology* **158**, 2451-2464 (2012).
- 460 22. Kidd, S.P. & Brown, N.L. ZccR--a MerR-like regulator from *Bordetella pertussis* which  
461 responds to zinc, cadmium, and cobalt. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 697-702  
462 (2003).
- 463 23. Radford, D.S. *et al.* CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting  
464 CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiol Lett* **220**, 105-12 (2003).
- 465 24. Hearnshaw, S. *et al.* A tetranuclear Cu(I) cluster in the metallochaperone protein CopZ.  
466 *Biochemistry* **48**, 9324-6 (2009).
- 467 25. Rouhier, N. & Jacquot, J.P. Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin-  
468 glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. *FEBS Lett* **554**, 149-53 (2003).
- 469 26. Vergauwen, B. *et al.* Characterization of glutathione amide reductase from *Chromatium*  
470 *gracile*. Identification of a novel thiol peroxidase (Prx/Grx) fueled by glutathione amide  
471 redox cycling. *J Biol Chem* **276**, 20890-7 (2001).
- 472 27. Pauwels, F., Vergauwen, B., Vanrobaeys, F., Devreese, B. & Van Beeumen, J.J.  
473 Purification and characterization of a chimeric enzyme from *Haemophilus influenzae* Rd  
474 that exhibits glutathione-dependent peroxidase activity. *J Biol Chem* **278**, 16658-66  
475 (2003).
- 476 28. Omsland, A., Miranda, K.M., Friedman, R.L. & Boitano, S. *Bordetella bronchiseptica*  
477 responses to physiological reactive nitrogen and oxygen stresses. *FEMS Microbiol Lett*  
478 **284**, 92-101 (2008).

- 479 29. Yamamoto, K. & Ishihama, A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external  
480 copper. *Mol Microbiol* **56**, 215-27 (2005).
- 481 30. Green, J. & Paget, M.S. Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**, 954-66 (2004).
- 482 31. Hillion, M. & Antelmann, H. Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol Chem* **396**,  
483 415-44 (2015).
- 484 32. Imlay, J.A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ*  
485 *Microbiol* **21**, 521-530 (2019).
- 486 33. Samanovic, M.I., Ding, C., Thiele, D.J. & Darwin, K.H. Copper in microbial  
487 pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe* **11**, 106-15 (2012).
- 488 34. Quintana, J., Novoa-Aponte, L. & Arguello, J.M. Copper homeostasis networks in the  
489 bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **292**, 15691-15704 (2017).
- 490 35. Taylor-Mulneix, D.L. *et al.* *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of  
491 *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLoS Biol* **15**, e2000420  
492 (2017).
- 493 36. Andreasen, C. & Carbonetti, N.H. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to  
494 delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection  
495 in mice. *Infect Immun* **76**, 5139-48 (2008).
- 496 37. Ahmad, J.N. *et al.* *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Inhibits Monocyte-to-  
497 Macrophage Transition and Dedifferentiates Human Alveolar Macrophages into  
498 Monocyte-like Cells. *mBio* **10**(2019).
- 499 38. Lamberti, Y.A., Hayes, J.A., Perez Vidakovics, M.L., Harvill, E.T. & Rodriguez, M.E.  
500 Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* **78**,  
501 907-13 (2010).
- 502 39. Cafiero, J.H., Lamberti, Y.A., Surmann, K., Vecerek, B. & Rodriguez, M.E. A *Bordetella*  
503 *pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLoS One* **13**,  
504 e0203204 (2018).
- 505 40. Lamberti, Y., Perez Vidakovics, M.L., van der Pol, L.W. & Rodriguez, M.E. Cholesterol-  
506 rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival  
507 in neutrophils. *Microb Pathog* **44**, 501-11 (2008).
- 508 41. Boyd, A.P. *et al.* *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and  
509 adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in  
510 immunomodulation and cell death. *J Immunol* **175**, 730-8 (2005).
- 511 42. Carbonetti, N.H. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection  
512 and disease. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 272-8 (2007).
- 513 43. Fedele, G., Bianco, M. & Ausiello, C.M. The virulence factors of *Bordetella pertussis*:  
514 talented modulators of host immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**, 445-  
515 57 (2013).
- 516 44. de Gouw, D., Diavatopoulos, D.A., Bootsma, H.J., Hermans, P.W. & Mooi, F.R.  
517 Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 441-74 (2011).
- 518 45. Utz, M. *et al.* The Cu chaperone CopZ is required for Cu homeostasis in *Rhodobacter*  
519 *capsulatus* and influences cytochrome cbb3 oxidase assembly. *Mol Microbiol* **111**, 764-  
520 783 (2019).
- 521 46. Hatori, Y. & Lutsenko, S. An expanding range of functions for the copper  
522 chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxid Redox Signal* **19**, 945-57 (2013).
- 523 47. Brose, J., La Fontaine, S., Wedd, A.G. & Xiao, Z. Redox sulfur chemistry of the copper  
524 chaperone Atox1 is regulated by the enzyme glutaredoxin 1, the reduction potential of the  
525 glutathione couple GSSG/2GSH and the availability of Cu(I). *Metallomics* **6**, 793-808  
526 (2014).
- 527 48. Hamidou Soumana, I., Linz, B. & Harvill, E.T. Environmental Origin of the Genus  
528 *Bordetella*. *Front Microbiol* **8**, 28 (2017).

- 529 49. Rivera, I. *et al.* Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence  
530 Among Animal Pathogenic *Bordetellae*. *Front Microbiol* **10**, 2839 (2019).
- 531 50. Koh, E.I., Robinson, A.E., Bandara, N., Rogers, B.E. & Henderson, J.P. Copper import in  
532 *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat Chem Biol* **13**, 1016-  
533 1021 (2017).
- 534 51. Rivera-Millot, A. *et al.* Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase  
535 in *Bordetella pertussis*. *PLoS One* **12**, e0176396 (2017).
- 536 52. Antoine, R. *et al.* New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by  
537 systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella*  
538 *pertussis*. *J Bacteriol* **182**, 5902-5905 (2000).
- 539 53. Kovach, M.E. *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector  
540 pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-6 (1995).
- 541 54. Lesne, E. *et al.* Distinct virulence ranges for infection of mice by *Bordetella pertussis*  
542 revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS. *PLoS One* **13**, e0204861 (2018).
- 543 55. Miguet, L. *et al.* Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals  
544 CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J*  
545 *Proteome Res* **8**, 3346-54 (2009).
- 546 56. Veyron-Churlet, R. *et al.* Rv0613c/MSMEG\_1285 Interacts with HBHA and Mediates Its  
547 Proper Cell-Surface Exposure in *Mycobacteria*. *Int J Mol Sci* **19**(2018).
- 548 57. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat*  
549 *Methods* **9**, 676-82 (2012).
- 550 58. Solans, L. *et al.* IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella*  
551 *pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal Immunol* **11**, 1753-1762  
552 (2018).
- 553 59. Frith, M.C., Saunders, N.F.W., Kobe, B. & Bailey, T.L. Discovering sequence motifs  
554 with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Comput Biol*, 5 (2008).
- 555 60. Johnson, L.S., Eddy, S.R. & Portugaly, E. Hidden Markov model speed heuristic and  
556 iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics* **11**, 431 (2010).

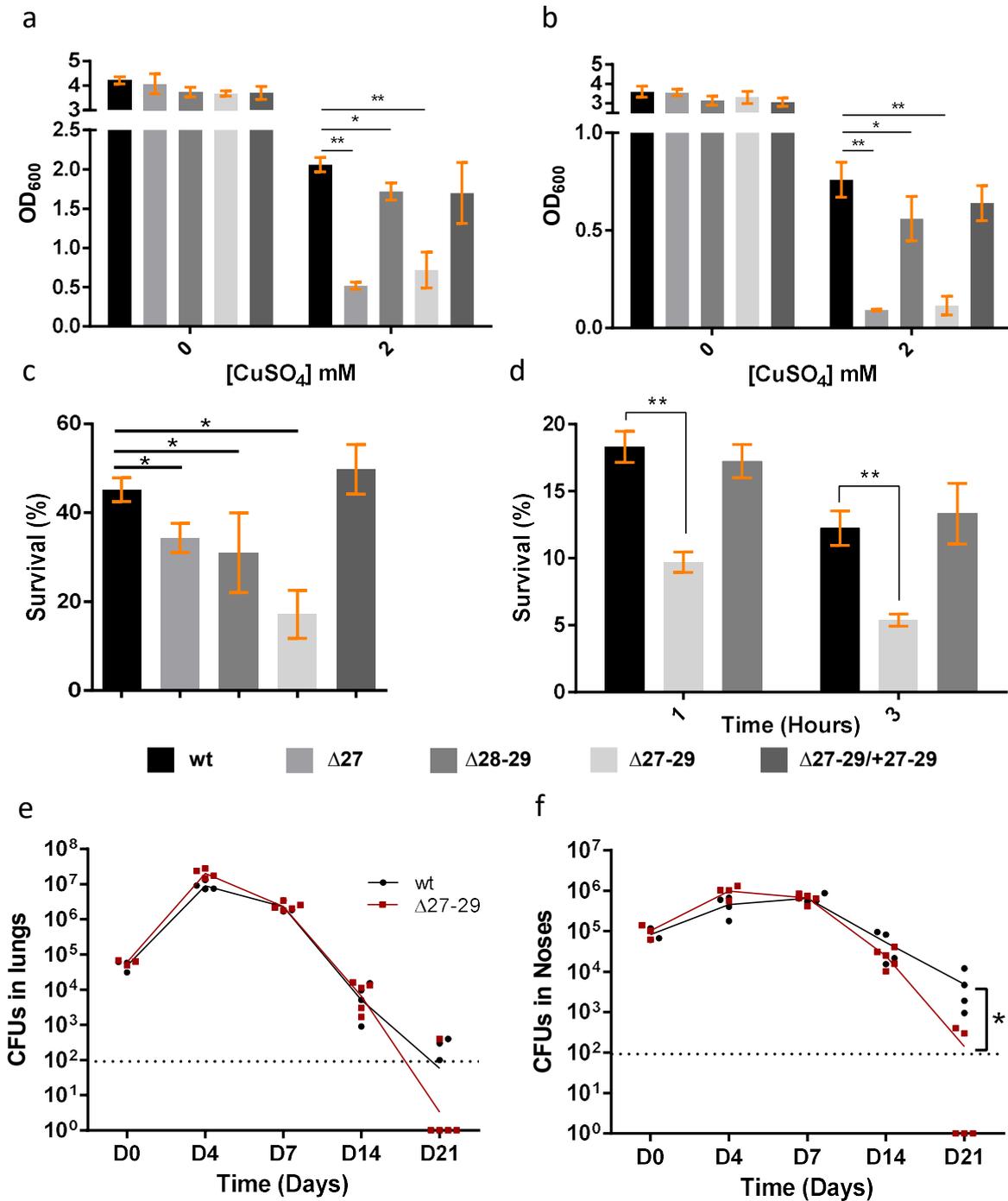
557



\*: small proteins difficult to identify by mass spectrometry

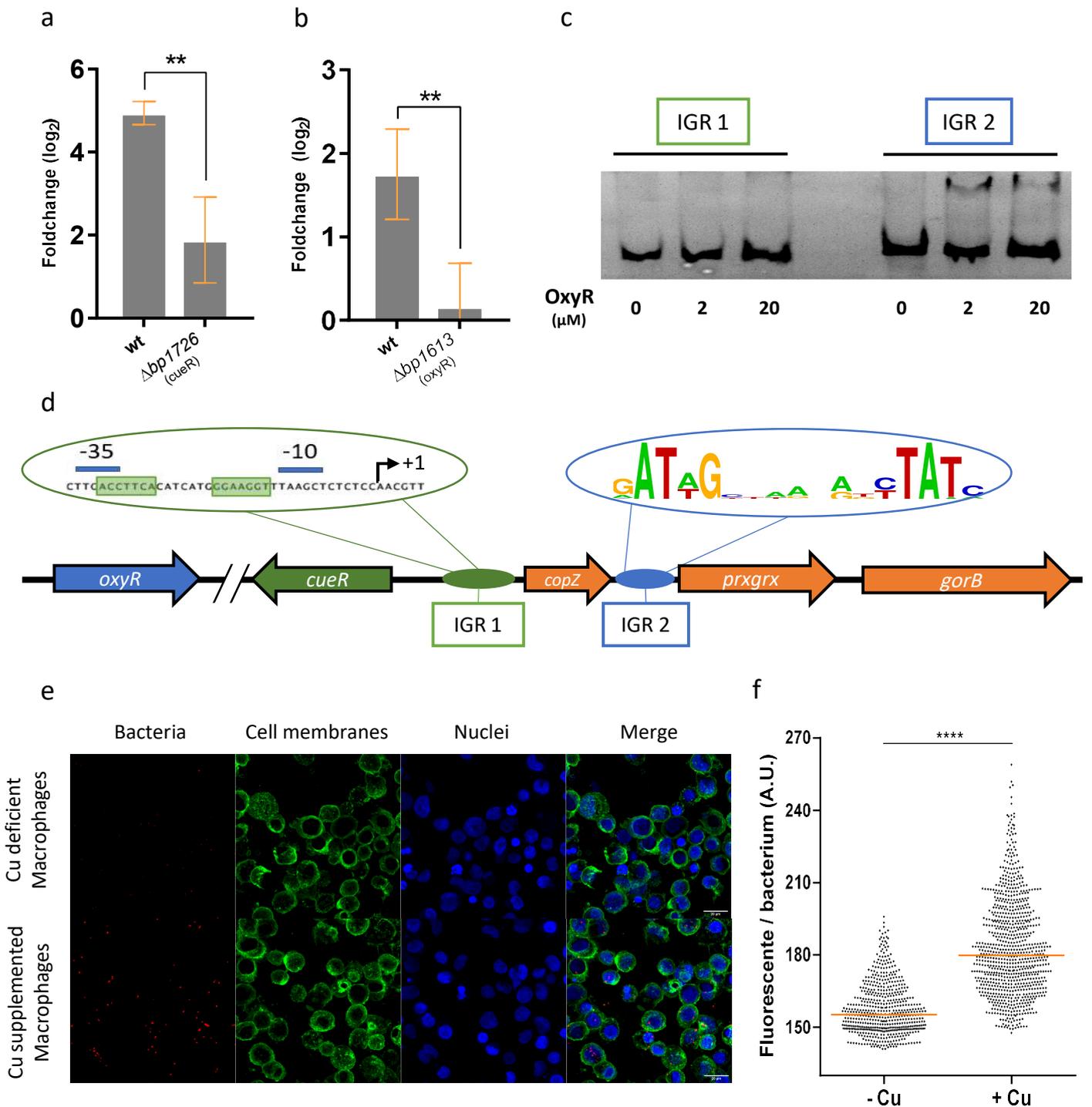
**Figure 1. Copper regulation of homeostasis systems in *B. pertussis* and *B. bronchiseptica*.**

(a, c and d) RNAseq analyses of *B. pertussis* grown in the continuous presence of 2 mM CuSO<sub>4</sub> in SS medium compared with the same strain in standard conditions (a), *B. pertussis* grown in SS medium and treated for 30 minutes with 2 mM of CuSO<sub>4</sub> (c), and *B. bronchiseptica* grown in the continuous presence of 2 mM CuSO<sub>4</sub> (d). Each gene is represented by a dot. The x and y axes show absolute levels of gene expression in reads per kilobase per million base pairs (RPKM) in standard and copper conditions, respectively. The genes indicated in blue have the strongest regulation. The detailed sets of data are shown in Supplementary Tables S1, S2 and S3. (b) Summary of the transcriptomic and proteomic analyses performed after growing bacteria in medium supplemented with 2 mM CuSO<sub>4</sub>. Standard culture conditions were used for comparisons.



**Figure 2. Role of the operon in *B. pertussis* and in host-pathogen interactions.**

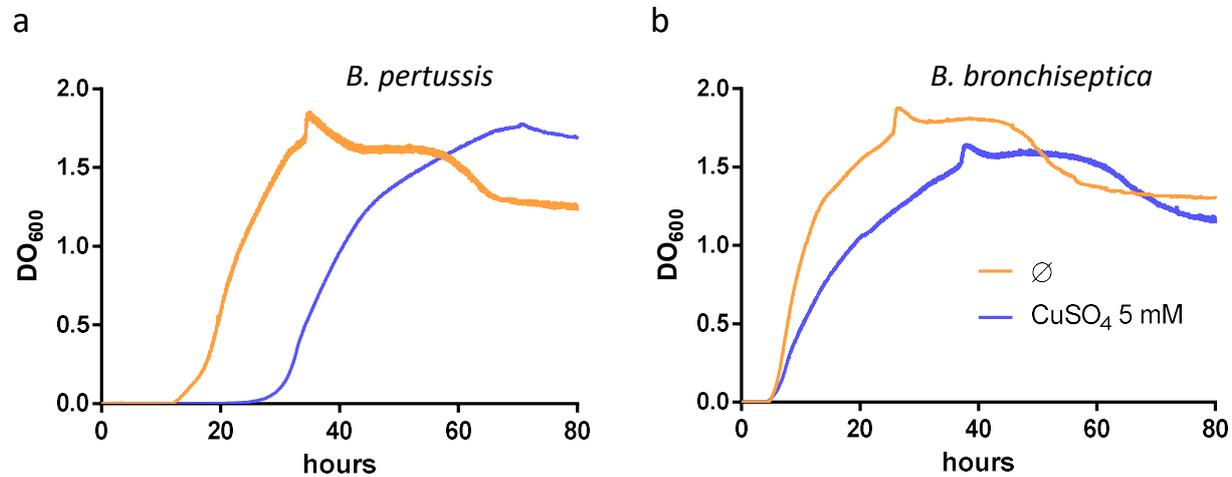
(a and b) Growth yields of *B. pertussis* after 24 h in SS medium (a) or SS medium devoid of glutathione (b), supplemented or not with 2 mM CuSO<sub>4</sub>. Note the different y axis scales between (a) and (b). wt, wild type (parental) strain; Δ27, Δ28-29 and Δ27-29, KO mutants for *bp1727* (*copZ*), *bp1728-bp1729* (*prxgrx-gorB*) and the three genes, respectively. Δ27-29/+27-29 represents the latter mutant complemented by expression of the operon at another chromosomal locus. (c) Survival of the same strains to an oxidative shock of 30 minutes. Six and five biological replicates were performed for the growth and the survival assays, respectively. The means and standard deviations are shown. (d) Intracellular survival of *B. pertussis* in THP1 macrophages. Five replicates were made for each strain. The means and standard deviations are shown. (e and f) Colonization of mice lungs (e) and nasopharynxes (f) after nasal infections with the parental strain and the KO mutant. The numbers of bacteria are indicated for each mouse and organ (black circles: parental bacteria, red squares: mutant). The lines connect the geometric means of the counts at each time point, and the dotted lines indicate the threshold of detection. For all the assays, statistical analyses were performed using two-tailed Mann-Whitney tests (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ).



**Figure 3. Regulation of the operon.** (a and b) qRT-PCR analyses of the parental and the *cueR* KO strains treated for 30 min with 2 mM CuSO<sub>4</sub> (a) or 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b), showing the expression levels of *prxgrx* relative to untreated controls. Data were normalized with the housekeeping gene *bp3416*. Three biological replicates and three technical replicates were performed, and means and standard deviations are shown. Statistical analyses were performed using two-tailed Mann-Whitney tests (\*,  $p < 0.05$ ). (c) EMSA with recombinant OxyR and DNA fragments of the *cueR-copZ* and *copZ-prxgrx* intergenic regions, IGR1 and IGR2, respectively. (d) Schematic representation of the locus, with sequences of the putative CueR and OxyR boxes. The site of transcription initiation was determined by 5' RACE (Supplementary Fig. S6). The putative OxyR binding sites were identified by their similarity with the *E. coli* consensus sequences, and alignments of the *Bordetella* and *Achromobacter* sequences were used to build the consensus motif (Supplementary Fig. S9). (e) Representative images of macrophages having engulfed *B. pertussis* harboring the *mRPF1* gene under the control of the operon promoter. Macrophages were either starved of copper using a chelator or treated with copper chloride prior to contact with bacteria. The bacteria are red, cell membranes are green, and nuclei are blue. (f) Levels of fluorescence (arbitrary units) of intracellular bacteria in the two conditions. Statistical analyses were performed using a two-tailed Student T-test (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ )

**Supplementary Figure S1. Effect of copper on *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* growth.**

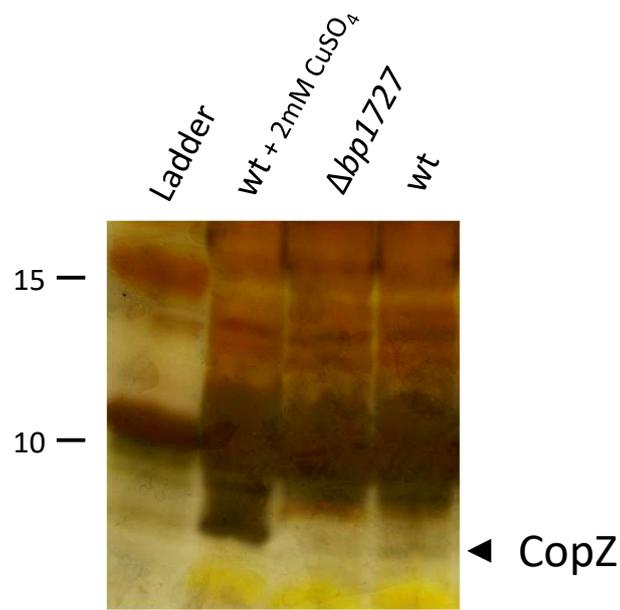
Growth curves of *B. pertussis* BPSM and *B. bronchiseptica* RB50 in SS medium supplemented (blue curves) or not (orange curves) with 5 mM CuSO<sub>4</sub>. The optical densities at 600 nm (OD<sub>600</sub>) were measured continuously using an Elocheck device.



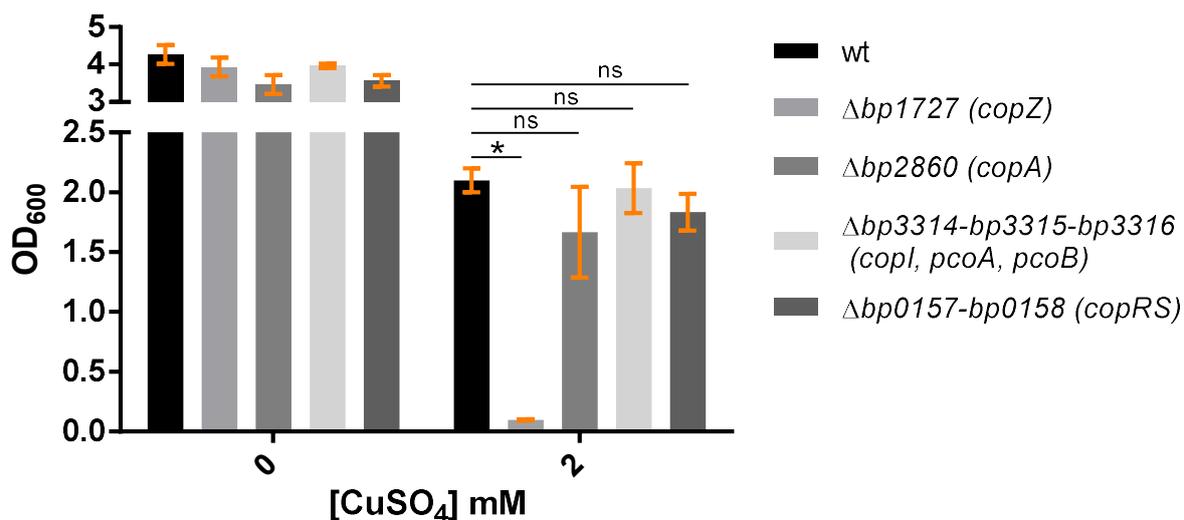
**Supplementary Figure S2. RNAseq analyses of the *bp1727-bp1728-bp1729* locus.** A screenshot of the mapping of RNAseq data shows that the three genes are co-transcribed and co-regulated by copper and thus most likely form an operon. The data correspond to a *B. pertussis* culture subjected to 2 mM CuSO<sub>4</sub> for 30 min. Each horizontal green line corresponds to one read in the sense of transcription of the three genes.



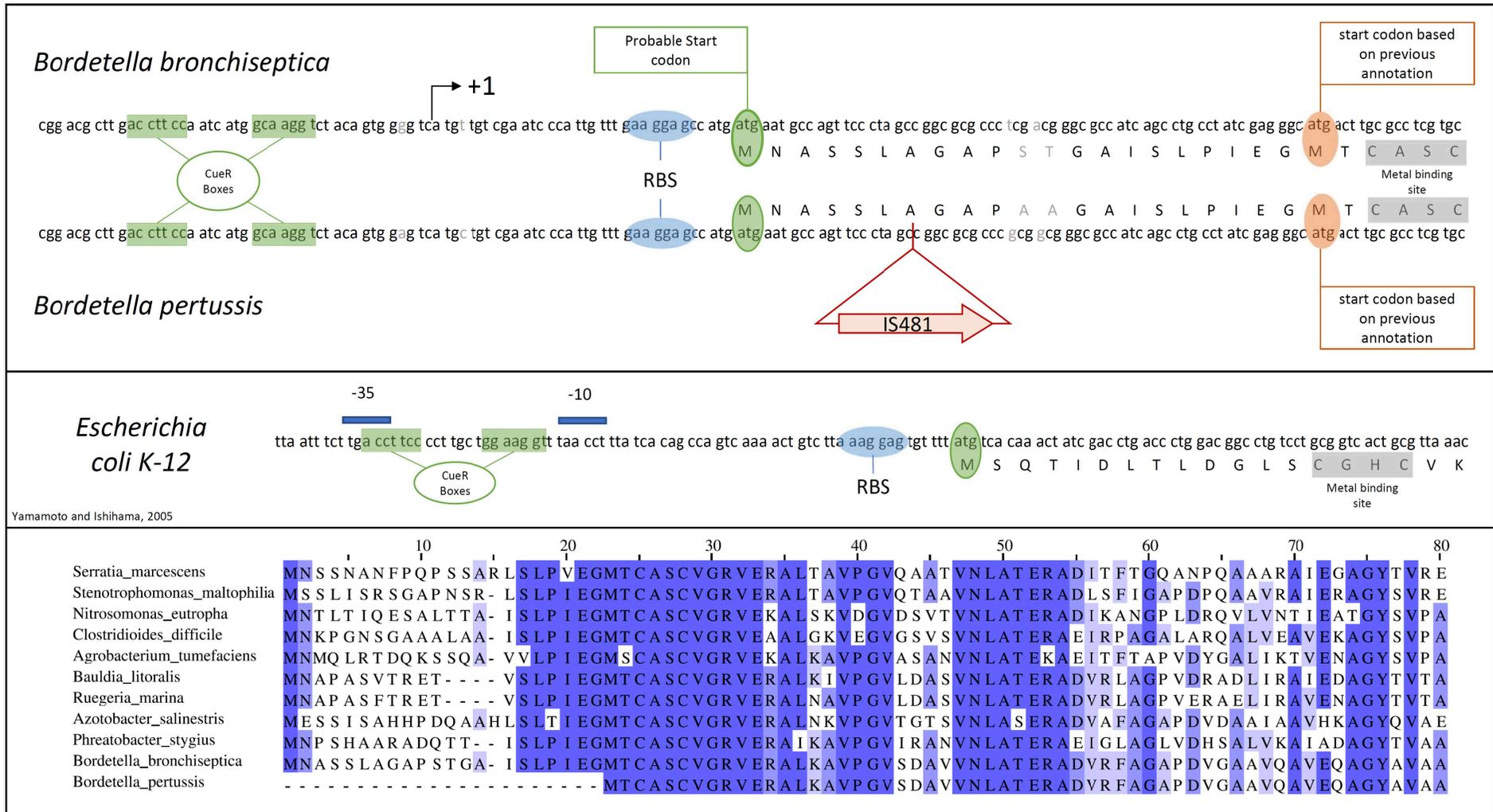
**Supplementary Figure S3. Production of CopZ by *B. pertussis*.** Electrophoresis of lysates in Tris-tricine gels for the detection of CopZ in *B. pertussis* grown in SS medium supplemented or not with 2 mM CuSO<sub>4</sub>. CopZ is absent from the deletion mutant ( $\Delta bp1727$ ), detected in low amounts in the parental strain (wt) grown in standard medium and in high amounts in the bacteria treated with copper. The gel was stained with silver nitrate. This experiment complements the proteomic analyses, because the small size of CopZ (7.2 kDa) limited its detection by mass fingerprinting (see Fig. 1b and Supplementary Table S4).



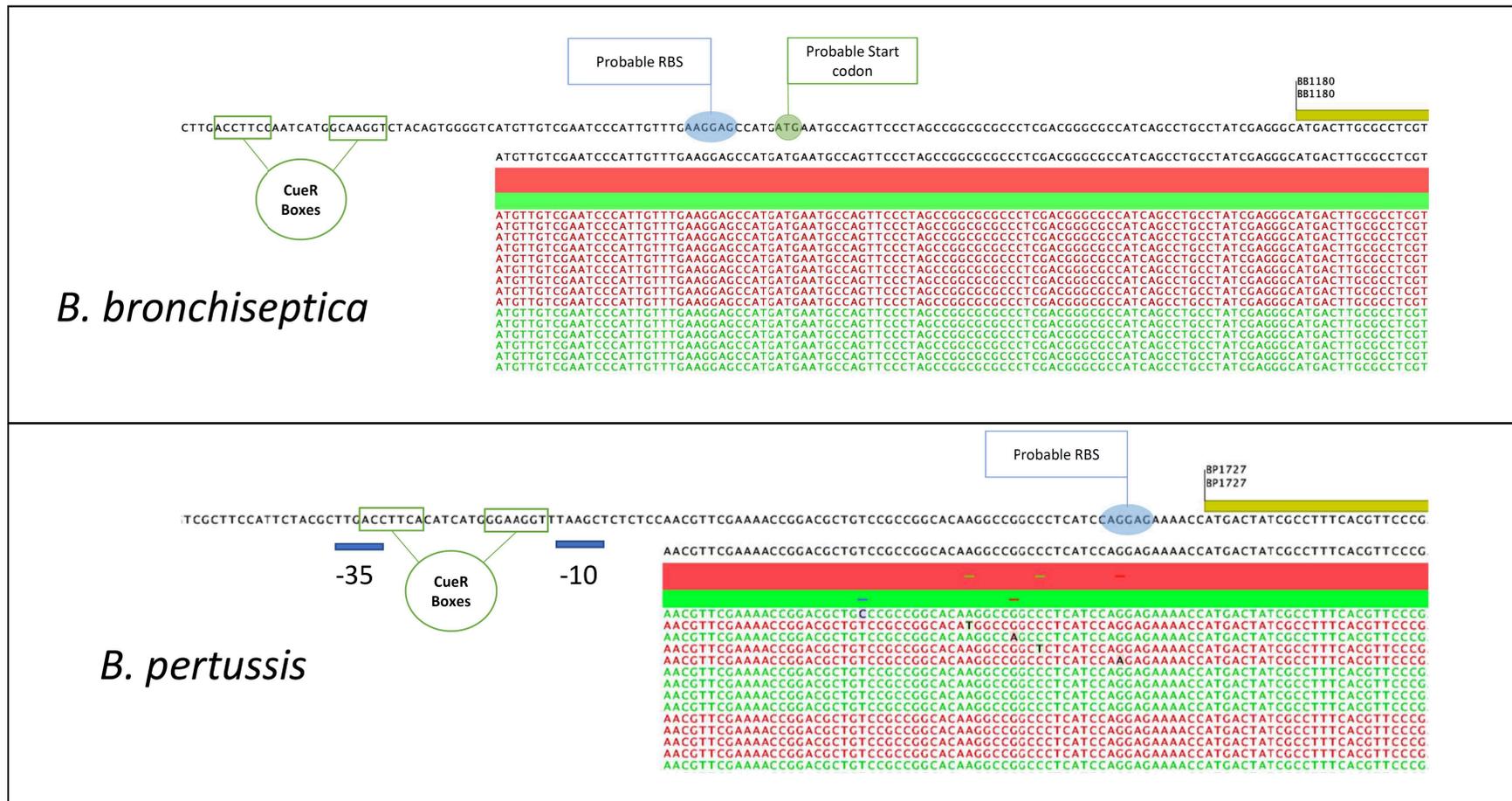
**Supplementary Figure S4. Growth of *B. pertussis* mutants knocked-out for putative defense systems against copper toxicity.** Growth yields of the parental strain, the  $\Delta bp1727$  mutant (*copZ*), the  $\Delta bp2860$  mutant (*copA*), the  $\Delta bp3314$ - $bp3315$ - $bp3316$  mutant (*copI-pcoA-pcoB* operon), and  $\Delta bp0157$ - $bp0158$  mutant (*copRS*) grown for 24 h in standard SS medium or in medium supplemented with 2 mM  $\text{CuSO}_4$ . Four biological replicates were performed for each strain. Means and standard deviations are shown. Statistical analyses were performed using two-tailed Mann-Whitney tests (\*,  $p < 0.05$ ).



**Supplementary Figure S5. *copA* is inactive in *B. pertussis*.** The nucleotide sequences of relevant region of the *copA* locus in *B. pertussis* (*bp2860*), *B. bronchiseptica* (*bb1180*) and *E. coli*, the position of the *IS481* insertion in *B. pertussis*, and the amino acid sequences of the first portions of CopA are shown. The nucleotides and amino acid residues that differ between *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* are in gray letters. In *E. coli* (middle panel), the CueR binding boxes are within the promoter region (Yamamoto 2005, *Mol Microbiol* **56**, 215). Homologous motifs are present in the *copA* loci of *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* (upper panels). In the latter, we mapped the transcription start site by 5' RACE (Supplementary Fig. S6), which is denoted +1 in the figure. The -10 and -35 promoter boxes of the *Bordetella* locus are thus likely to overlap the CueR binding site as in *E. coli*. Regarding translation, the initiation Met was probably mis-annotated in the *B. pertussis* genome, because sequence alignments of the N-terminal moieties of CopA from various species show that the CXXC copper-binding motif is usually located 12-25 residues after the initiation Met (lower panel). In the published *B. pertussis* annotation, a Met residue immediately preceding the CXXC motif was chosen for initiation, suggesting an intact *copA* gene. However, the lack of a phenotype upon inactivation of *copA* strongly argues that this gene no longer provides resistance to copper intoxication. Because the transposase gene in *IS481* is transcribed in the same direction and probably reads through *copA*, transcriptional activation of the latter was observed in the presence of copper (Fig. 1b and Supplementary Table S1). The CopA protein of *B. pertussis*, which was detected at low level in our proteomic analyses, is thus probably truncated at its N-terminus (Fig. 1 and Supplementary Table S4). Although the truncated CopA protein appears not to protect *B. pertussis* against copper excess, it is conceivable that it contributes to cuproprotein metallation as described in other bacteria (e.g., Raimunda 2011, *Biometals* **24**, 467).

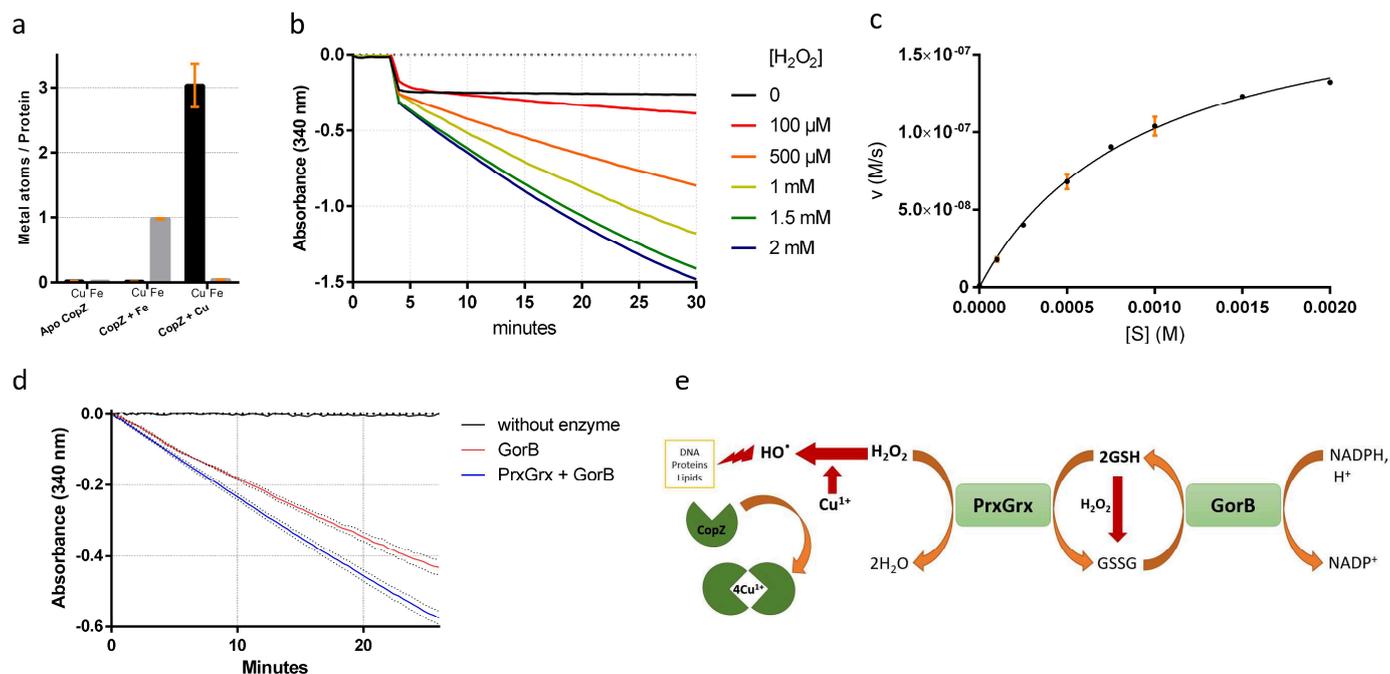


**Supplementary Figure S6. Identification of the transcription start sites of *bb1180* and *bp1727*.** Mapping of the transcriptional initiation sites was performed by rapid amplification of RNA 5' ends (5' RACE) using primers that anneal within *bb1180* (*copA*) in *B. bronchiseptica* and *bp1727* (*copZ*) in *B. pertussis*. The putative CueR boxes (in green) and promoter -10 and -35 boxes (in blue) are indicated. Those boxes were identified based on the sequences of the CueR boxes upstream of the *copA* gene in *E. coli* (Supplementary Fig. S5). The -10 and -35 regions of the *bp1727* promoter are identical to those of the *copA* promoter in *E. coli* (Supplementary Fig. S5). The transcriptional initiation sites of *bb1180* and *bp1727* are at the same distances from the CueR boxes in the two loci. The N-terminal region of the protein is shown in yellow. Note that in the case of the *B. bronchiseptica* CopA the annotated N terminus is most likely incorrect. The most probable initiation codon is indicated in green (see Fig. S5).

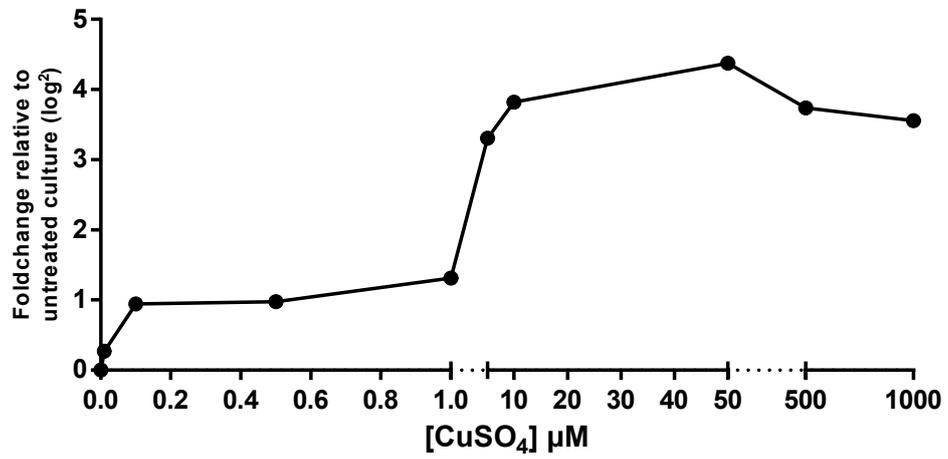


### Supplementary Figure S7. Activities of the proteins encoded by the *bp1727-bp1728-bp1729* operon.

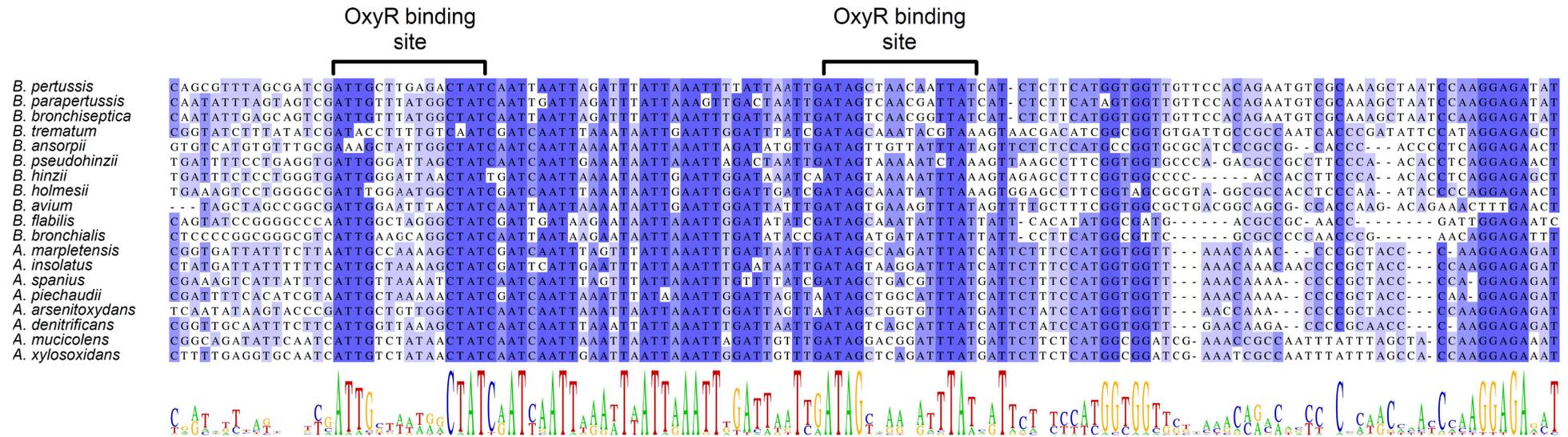
(a) The metal/protein ratios of recombinant CopZ were determined by ICP-AES. The recombinant protein was treated with EDTA to obtain the apo form and then incubated with iron (gray) or copper (black). The values shown are means of three replicas and the error bars are standard deviations. Recombinant CopZ was found to contain one iron atom or three copper atoms per monomer. As one Fe or Cu ion is most likely bound to the 6-His tag used for purification, the other two Cu ion are specifically chelated by CopZ. (b) Oxidation of NADPH by the recombinant BP1729 protein (GorB) over time, using various concentrations of oxidized glutathione as the substrate. Reduced glutathione and NADPH were present in excess in the reaction mixture, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added at the indicated concentrations to generate the same concentrations of oxidized glutathione before adding the enzyme as described (Vergaen 2001, J. Biol. Chem. 276, 80890). The reaction was followed by the decrease of absorbency at 340 nm. (c) a  $k_{\text{cat}}/K_m$  value of  $323,000 \pm 46,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for glutathione disulfide was estimated based on Michaelis and Menten kinetics. (d) Effect of the recombinant BP1728 protein (PrxGrx) on the rate of reduction of NADPH by GorB (Pauwels 2003, 278, 16658). The red curve represents the rate of the reaction catalyzed by GorB alone, and the blue curve represents the rate of the reaction when both enzymes are present. The reactions were performed 6 times in the same conditions, and the average curves and their deviations are shown. The concentrations of reduced glutathione and NADPH were in excess in the reaction mixture, one or both enzymes were added, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added at a limited concentration (4 mM) as a substrate of the first reaction as shown in (e). However,  $\text{H}_2\text{O}_2$  also directly generates oxidized glutathione, which initiates the second reaction. Therefore, the activity of PrxGrx is detected by the increased rate at which NADPH is consumed when both enzymes are present in the reaction relative to the reaction rate with GorB only. No enzymatic constants were determined because of the coupled reaction set up. (e) Schematic representation of the functions of the three proteins. CopZ chelates  $\text{Cu}^{1+}$ , which prevents the ion from catalyzing a Fenton reaction in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The Fenton reaction generates the hydroxyl radical, which is extremely reactive towards nucleic acids, lipids and proteins.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is also reduced to  $\text{H}_2\text{O}$  through the activity of PrxGrx, at the expense of glutathione. The product of that reaction, glutathione disulfide, is reduced through the activity of GorB, at the expense of NADPH.



**Supplementary Figure S8. Sensitivity of the transcriptional response to copper.** qRT-PCR was performed on *bp1728* after growing *B. pertussis* for 16 hours in SS medium containing the indicated concentrations of copper.



**Supplementary Figure S9. Identification of putative OxyR boxes.** Alignment of the *copZ-prxgrx* intergenic region of *B. pertussis* with those of other *Bordetella* and *Achromobacter* species. Based on the *E. coli* OxyR binding site consensus sequences (ATAGnnnnnnnCTAT) (Seo 2015, Cell Rep 12, 1289), at least two putative OxyR binding motifs were identified in the *copZ-prxgrx* intergenic region, but none was found in the *cueR-copZ* intergenic region. The spacing of 7 nucleotides between the two halves of the motif are conserved at both sites, and those motifs are well conserved among *Bordetellae* and *Achromobacter*. However, they both diverge by one nucleotide from the *E. coli* consensus, which might explain the rather weak binding of OxyR to IGR2 as seen in Fig. 3.



### 2.3. Résumé

Les figures citées dans ce résumé sont les illustrations présentes dans l'article.

Cet article explore les liens entre l'homéostasie du cuivre chez les Bordetelles, et plus particulièrement chez *B. pertussis* dans le cadre de sa relation à l'hôte. Cette caractérisation fut débutée par une analyse *in silico* des protéines à cuivre putatives chez *B. pertussis*. Ensuite, seules les protéines actrices de la défense contre le cuivre ont été étudiées dans le détail. Ces analyses ont mis en évidence un arsenal de défense assez classique chez les  $\beta$ -protéobactéries. Parmi les gènes codants ces protéines, il est possible de trouver une P<sub>1</sub>B-ATPase à cuivre de type CopA (BP2860), une multicopper oxidase PcoA (BP3315), un système d'extrusion à travers la membrane externe PcoB (BP3316) et différentes métallochaperonnes cytoplasmiques comme CopZ (BP1727) et périplasmiques comme CopI (BP3314) et CusF (BP3088). *B. bronchiseptica* est une bactérie proche phylogénétiquement et qui, outre une phase de vie pathogène, possède la capacité de vivre en dehors d'un hôte mammifère, contrairement à *B. pertussis*. Cette bactérie possède les mêmes gènes que *B. pertussis* avec juste un de plus, codant une protéine de stockage du cuivre (Csp), qui est cytoplasmique. La figure supplémentaire 1 met pourtant en évidence une différence de phénotype en présence d'un large excès de cuivre dans le milieu de culture. Dans le but d'élucider cette différence, une étude transcriptomique a été réalisée sur les deux bactéries pour identifier une éventuelle différence de réponse adaptative entre les deux bactéries. Ces analyses ont mis en évidence l'absence d'induction de presque tous les systèmes de l'homéostasie chez *B. pertussis* contrairement à *B. bronchiseptica* (figure 1). Dans le cas de la bactérie *B. pertussis*, il est possible d'observer une forte induction de seulement 4 gènes par le cuivre : l'ATPase CopA (BP2860), la chaperonne CopZ (BP1727), une putative peroxydase (BP1728) et une putative glutathion réductase (BP1729).

En parallèle de ces expérimentations de transcriptomique des mutants de délétion ont été construits pour tous les systèmes cités précédemment afin de confirmer les conclusions des analyses de la régulation. Il est possible de constater que la délétion de ces systèmes impliqués dans l'homéostasie chez d'autres bactéries ne change pas le phénotype de *B. pertussis* en condition d'excès en cuivre (figure supplémentaire 4). Le cas de CopA semble donc intéressant de par le fait que ce système semble induit mais que sa délétion ne cause pas de phénotype. Cette observation paraît étonnante vu l'importance des ATPases dans l'homéostasie du cuivre chez les autres organismes. En étudiant plus en détail le locus du gène codant pour cette ATPase, nous avons identifié une séquence d'insertion, juste en amont du gène, qui est absente chez *B. bronchiseptica*. De plus, les alignements de séquences ainsi que les expériences de 5'RACE semblent mettre en évidence une erreur d'annotation du codon d'initiation de l'ATPase (figures supplémentaires 5 et 6). Il est donc probable que la séquence d'insertion soit intégrée dans le gène et l'ait inactivé. Le faible niveau d'expression en conditions standard et son augmentation lors d'un stress cuivrique sont probablement dus

aux transcrits débordants de l'IS. En effet, cette IS serait régulée positivement par le cuivre grâce au motif putatif de liaison d'un régulateur spécifique aux métaux juste en amont. Dans le cas des trois gènes codant les protéines CopI, PcoA et PcoB, la raison de la perte de la régulation par le cuivre chez *B. pertussis* est moins claire. Néanmoins, le locus de cet opéron contient trois séquences d'insertion en amont. Il est possible que ces IS aient interrompu le promoteur ou l'opérateur de l'opéron. Il est également possible que cette absence de régulation soit due à la faible expression du système à deux composants CopRS chez *B. pertussis*. Chez *P. aeruginosa*, un système homologue à CopRS régule l'expression des protéines PcoA et PcoB.

La suite de l'étude porte donc sur la caractérisation du rôle de l'opéron de trois gènes, *bp1727-bp1728-bp1729* (figure supplémentaire 1), fortement surexprimés en présence de cuivre (figure 1). Des tests de croissance en présence de cuivre ont montré le rôle majeur de CopZ dans la tolérance au cuivre ainsi qu'un rôle mineur des deux gènes suivants (figure 2 a, 2b). Ces deux gènes étant probablement liés à la détoxification de peroxydes qui causent un stress oxydant (voir plus bas), un test de survie à ce type de stress a été mis en place et réalisé sur les différents mutants. Il apparaît que le triple mutant est très sensible aux espèces oxygénées réactives, tout comme le mutant chez qui *bp1728-1729* sont inactivés. Mais plus étonnant de prime abord, le mutant de délétion pour CopZ (*bp1727*) présente également un défaut de survie (figure 2c). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un excès de cuivre cause un stress oxydant, notamment via la réaction de Fenton. La perte de CopZ entrainerait donc un accroissement du stress oxydant dans la bactérie soumise à un stress cuivrique.

Les tests *in vitro* ayant mis en évidence des rôles de cet opéron dans la tolérance au cuivre et la survie au stress oxydant, l'étape suivante a été de mesurer les capacités de survie de ces mutants à la phagocytose par les macrophages. En effet, ces cellules présentent la particularité d'utiliser ces deux stress à des fins bactéricides. Il s'est avéré que le différent mutant présente un défaut de survie important à la phagocytose (figure 2d). Toutes ces données et en particulier la susceptibilité à la phagocytose ont mené à une expérience de colonisation animale. Au cours de cette dernière, il a été possible d'observer un défaut de persistance des bactéries mutantes dans les cavités nasales des souris. La clairance des bactéries de cet organe est principalement médiée par les cellules phagocytaires. Ces résultats confirment les observations précédentes.

Après avoir caractérisé le rôle biologique de l'opéron, les trois protéines ont été produites et purifiées afin de caractériser leurs fonctions moléculaires. CopZ a été mise en contact avec des métaux afin de mettre en évidence ses capacités de complexation des métaux. Il semble que cette dernière fixe deux atomes de cuivre par monomère (figure supplémentaire 7a). Dans le cas de la protéine BP1729, l'analyse de sa signature pFam a mis en lumière un potentiel rôle de réductase de glutathion, permettant de régénérer le glutathion oxydé (donc ayant formé des dimères via un pont disulfure) en utilisant le NADH ou le NADPH. Des expériences de cinétique enzymatique ont confirmé cette fonction. BP1728 porte les

signatures de 2 domaines pFam différents, l'un de peroxirédoxine et l'autre de glutarédoxine, ce qui indique qu'il utiliserait le glutathion (sous forme réduite) pour réduire des peroxydes. Une réaction enzymatique couplée avec celle catalysée par BP1729 a permis de montrer de manière indirecte l'action de cette protéine en tant que peroxydase glutathion-dépendante (figures supplémentaires 7b, 7c, et 7d). Ces résultats ont permis d'attribuer des noms aux différentes protéines, CopZ pour BP1727, PrxGrx pour BP1728, et GorB pour BP1729. Les données moléculaires confirment le rôle que les phénotypes avaient attribué à ces protéines.

Enfin, la dernière étape de la caractérisation de ce système est son mécanisme de régulation. Le premier système de régulation identifié est une protéine de type MerR, d'une famille de régulateurs connus pour contrôler certains systèmes d'homéostasie des métaux. Le gène codant ce régulateur est directement en antisens de l'opéron. La délétion de ce gène entraîne une importante diminution de la surexpression de l'opéron due au cuivre (figure 3a). Cette observation confirmant son rôle, cette protéine a été baptisée CueR. Néanmoins, la régulation résiduelle a orienté les recherches sur la possible existence d'un second régulateur. L'étude de l'environnement génétique du gène *bp1728* chez tous les procaryotes dont les génomes sont séquencés a mis en évidence la présence récurrente d'un gène codant pour un régulateur de type OxyR, décrit pour médier la réponse au peroxyde d'hydrogène. *B. pertussis* possède un gène codant une protéine similaire, *bp1613*, et sa délétion entraîne une perte de la régulation du gène *bp1728* par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, dans la souche sauvage, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente l'expression de *bp1728* d'un facteur similaire à la surexpression visible dans le mutant CueR en présence de cuivre (figure 3b). Cet opéron possède donc deux régulations distinctes. La régulation induite par OxyR ne concerne que *bp1728-bp1729*. Cette observation provient d'expériences de retard sur gel ayant mis en évidence que le régulateur se lie uniquement à la zone intergénique entre *bp1727* et *bp1728* mais pas à celle entre *copZ* et *bp1728* (figure 3c). Cette double régulation correspond bien aux stimuli présents dans les phagosomes des macrophages. Des expériences de microscopie confocale avec un gène rapporteur mRFP1 précédé du promoteur de *bp1727* ont permis d'observer la surexpression de l'opéron au sein des macrophages (figure 3e et 3f). Enfin, l'étude des génomes des beta protéobactéries semble montrer que cette organisation opéronique est apparue chez l'ancêtre commun des genres *Achromobacter* et *Bordetella*. Néanmoins, chez *Achromobacter* et une partie des *Bordetelles*, cet opéron est en antisens des gènes de l'ATPase à cuivre et du régulateur CueR. L'organisation présente chez *B. pertussis*, avec déplacement du gène de l'ATPase à un autre locus, semble donc être apparue tardivement au cours de l'évolution. Le fait marquant est que cette organisation semble propre à ces deux genres qui sont majoritairement composés de pathogènes opportunistes ou de pathogènes stricts.

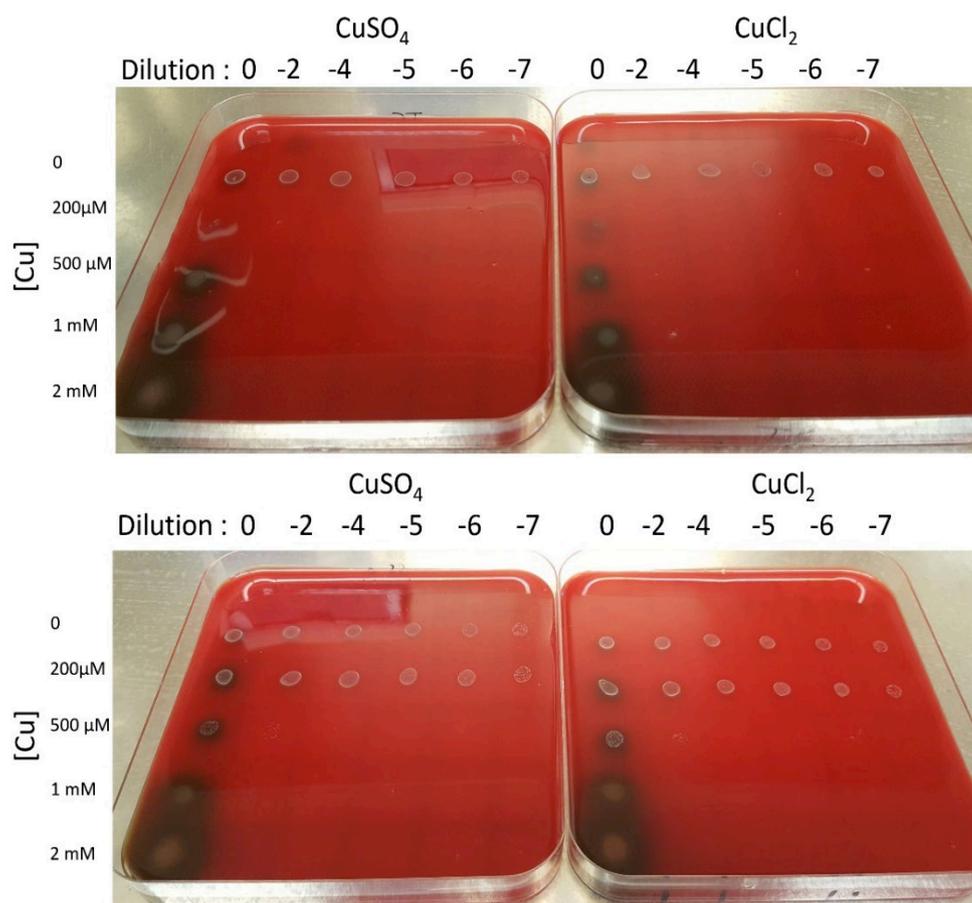
Cet opéron semble donc être une évolution destinée à la survie à la phagocytose à moindre coup énergétique. Chez les bactéries ayant un cycle de vie complexe comme *B. bronchiseptica*, cet opéron est une adaptation parmi d'autres, tandis que chez *B. pertussis*, il est probable que cet opéron possède le meilleur rapport dépense énergétique/défense et donc que seul cet opéron ait été conservé dans cette niche écologique.

## 2.4. Résultats complémentaires

### 2.4.1. Mise au point des conditions de culture en excès de cuivre

#### 2.4.1.1. Tests de survie ou suivi de croissance

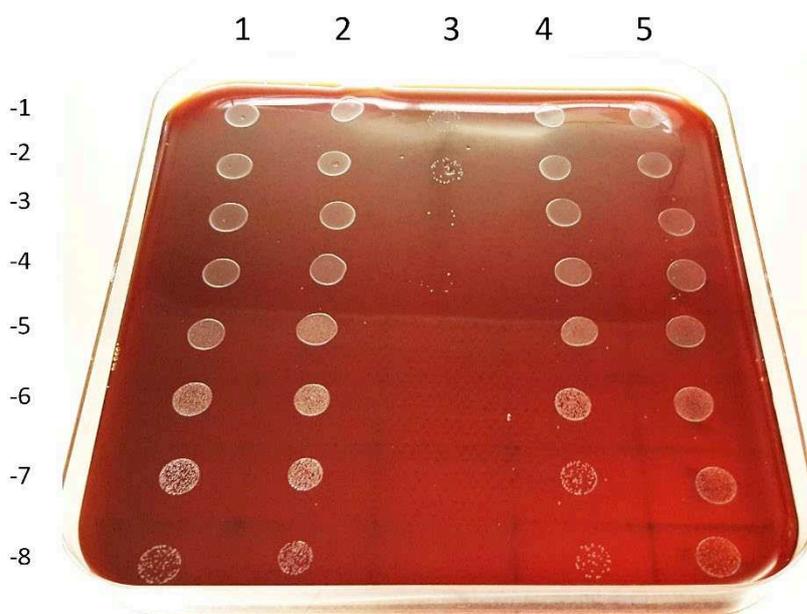
Etudier l'impact du cuivre chez *B. pertussis* n'est pas simple à cause de ses conditions de culture in vitro. En effet, cette bactérie se développe sur un milieu solide très riche, le Bordet-Gengou agar, qui se compose d'une infusion de pomme de terre supplémentée avec 10% de sang de mouton defibriné. Ce milieu ne permet pas d'ajouter du cuivre à la gélose. Même à faible concentration, le cuivre entraîne une hémolyse qui semble impacter la viabilité des bactéries. Il est possible que ce soit l'acidité induite par le cuivre qui influence cette viabilité et cause l'hémolyse. Nous avons à notre disposition deux milieux de culture liquides, les milieux Stainer-Scholte (Stainer and Scholte, 1970) et Thijs (Thalen et al., 1999).



*Figure 45 :* Photos des tests de survie au cuivre. Les deux photos supérieures représentent le test réalisé en milieu Thijs et les photos inférieures représentent le test en milieu SS. Les bactéries ont été cultivées dans leurs milieux respectifs jusqu'à  $DO_{600} = 2$  puis exposées aux différentes concentrations en cuivre.

Par conséquent, pour faire des tests de survie nous avons exposé les bactéries au cuivre dans des milieux de culture liquides durant 4 heures (temps de doublement de *B. pertussis* en milieu liquide). Après exposition, des dilutions sérielles ont été déposées sur gélose afin d'estimer l'impact du cuivre (figure 45).

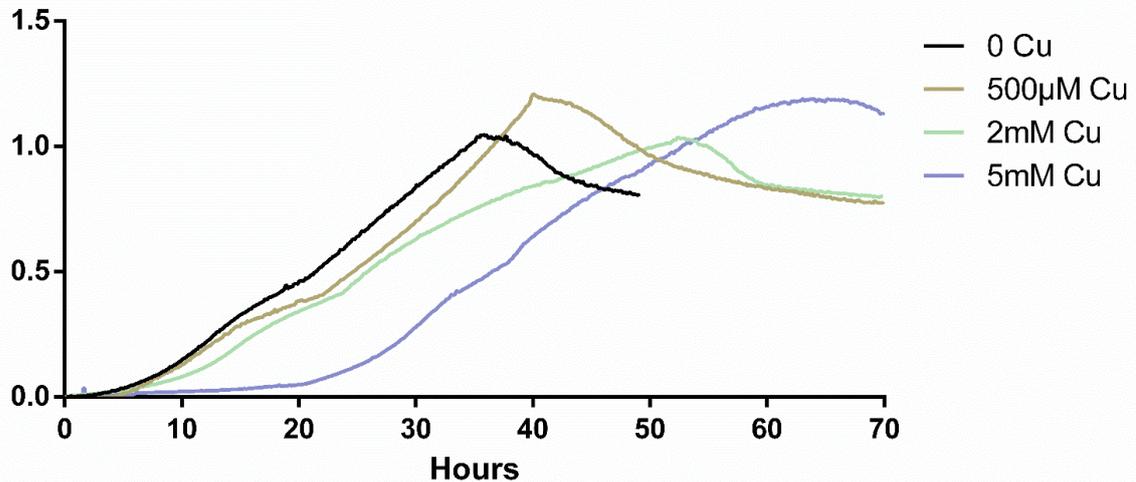
Au travers des images précédentes et de nombreuses autres non présentées ici, nous avons pu conclure que *B. pertussis* présente une sensibilité extrême au cuivre dans le milieu Thijs, qui est un milieu beaucoup moins riche que le SS. Les différents tests ont montré qu'en milieu SS, c'est davantage la baisse du pH liée à de fortes concentration en cuivre qui induit cette sensibilité plutôt que le cuivre lui-même. Le tampon assurant la stabilité du pH dans le milieu SS est le Tris-base. Ce tampon fort présente l'inconvénient de former des complexes avec le cuivre. Cette propriété fait qu'il est impossible de connaître la quantité de cuivre libre dans le milieu. Néanmoins il n'a pas été possible de substituer ce tampon par d'autres. Nous avons testé le MOPS, HEPES, phosphate, etc., malheureusement aucune de ces alternatives n'a été à la fois compatible avec le cuivre (précipitation) et la gamme des pH tolérés par *B. pertussis*. Nous avons choisi de poursuivre avec le Tris en cherchant des conditions de culture permettant d'observer des phénotypes (figure 46).



*Figure 46: Avant dépôt les bactéries ont été cultivées dans du milieu SS standard, puis à DO = 2 les bactéries ont été exposées 4 heures au cuivre supplémenté en Tris base. 1 : SS + 25 mM de tris. 2: SS + 20 mM de tris. 3: SS + 8 mM CuSO<sub>4</sub> + 25 mM tris. 4: SS + 5 mM CuSO<sub>4</sub> + 20 mM tris. 5: SS standard.*

Après de nombreuses tentatives nous avons trouvé des conditions permettant de maintenir le pH du milieu de culture tout en obtenant une bactéricidie sur *B. pertussis*. Néanmoins, nous avons constaté qu'au-delà de 20 mM le Tris-base altère la croissance de *B. pertussis*. De plus, la bactéricidie n'était pas facilement reproductible entre les manipulations. En revanche, lors des différents tests nous avons constaté qu'en culture liquide en présence de cuivre, on observe une bactériostase dépendante de la concentration en cuivre dès l'inoculum. Notre milieu contient de l'ascorbate qui est un agent réducteur (figure 47).

Il est probable que l'ascorbate réduise le cuivre sous sa forme  $\text{Cu}^{1+}$  la plus toxique et entraîne donc ce retard de développement. Les cultures se faisant sous agitation, l'oxygénation va permettre d'oxyder progressivement le cuivre et donc les bactéries pourront commencer à se multiplier, expliquant le retard de croissance au départ.



*Figure 47: Courbes de croissances réalisées en utilisant l'appareil Elocheck à différentes concentrations en cuivre dans du milieu SS dont le pH initial est maintenu à 7.2 par une augmentation de la concentration de Tris base.*

Ce phénotype étant beaucoup plus reproductible, nous avons choisi d'utiliser les suivis de croissance pour tester la sensibilité au cuivre des différents mutants réalisés au cours de ces travaux (figure 47).

Dans le but de standardiser le plus possible ces suivis de croissance (en particulier pour les études transcriptomiques) nous avons utilisé des solutions stocks de  $\text{CuSO}_4$  à 62 mM dans la fraction A du milieu SS (ne contenant pas d'agent réducteur) contenant 100 mM de Tris base. Cette solution stock a un pH de 5.5, de cette manière l'ajout de différentes concentrations de cuivre dans les milieux de culture finaux n'altère pas le pH de ces derniers. De plus, cette solution permet d'utiliser du cuivre jusqu'à 5 mM sans dépasser les 20 mM de Tris, afin de ne pas avoir les effets délétères de ce dernier. Enfin nous avons mis au point une solution stock « témoin » ne contenant pas de cuivre mais seulement 100 mM de Tris base, auquel de l'HCl est ajouté pour obtenir un pH de 5.5 comme celui de la solution stock de cuivre. Grâce à ces solutions, nous avons été en mesure d'obtenir des résultats très reproductibles ainsi que d'observer dans nos analyses transcriptomiques uniquement les effets du cuivre et pas ceux de l'acidité ou de l'excès de Tris.

#### 2.4.1.2. Impact des sources de soufre dans la croissance et la tolérance au cuivre

Le métabolisme du soufre est décrit dans la littérature comme important dans l'homéostasie du cuivre. Les composés soufrés sont des cibles de la toxicité du cuivre mais également des tampons conférant une certaine tolérance à ce métal. Le glutathion est décrit comme un acteur majeur dans la relation entre les bactéries et le cuivre. Il sert de tampon dans le cytoplasme permettant de diminuer la concentration de cuivre libre. Néanmoins la formation de ce complexe entre le glutathion et le cuivre  $\text{Cu}^{1+}$  entraîne la diminution du glutathion disponible dans cette même cellule. Il se trouve que notre milieu de culture SS contient du glutathion car *B. pertussis* possède seulement une des deux enzymes nécessaires à sa biosynthèse. La bactérie importe le glutathion du milieu extérieur pour maintenir ainsi son stock cytoplasmique et régénère son stock interne via des glutathion réductases. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact du glutathion sur la tolérance au cuivre.

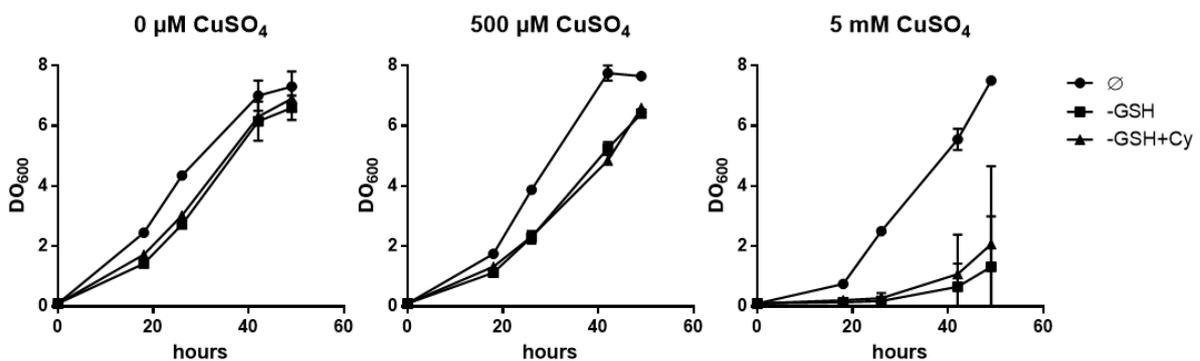


Figure 48: Suivi de croissance avec (Ø) ou sans glutathion (-GSH) ou sans glutathion avec ajout de cystéine (-GSH + Cy). Les DO sont mesurées avec un Ultraspec 10. Les barres verticales représentent des déviations standard.

Le glutathion a deux rôles : source de cystéines et maintien du potentiel réducteur dans le cytoplasme. Nous avons vu lors de nos analyses transcriptomiques que le métabolisme des acides aminés soufrés est up régulé en présence de cuivre. La littérature parle également d'augmentation de la synthèse de cystéine en réponse au cuivre. Nous avons donc cherché à savoir si le glutathion joue un rôle dans la tolérance au cuivre et si oui, par quel mécanisme.

Nous avons effectué 3 types de cultures, dans du SS normal contenant du glutathion, dans du SS sans glutathion et dans du SS sans glutathion où la source de soufre que représente le glutathion a été compensée par l'ajout de cystéine (Figure 48).

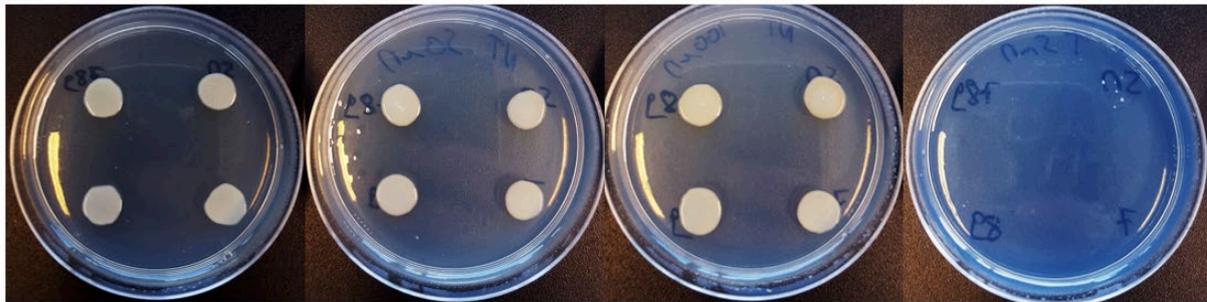
En absence de cuivre, il n'y a pas de différence significative entre les différentes cultures. Plus intéressant, à 500  $\mu\text{M}$  de cuivre les deux cultures sans glutathion accusent un léger retard de croissance alors qu'en présence de glutathion le cuivre semble accélérer la croissance bactérienne (vu en comparant les panels de gauche et du milieu). Enfin, en présence d'un large excès de cuivre, dans tous les cas on observe le retard de démarrage d'une vingtaine d'heures décrit précédemment. Néanmoins les deux cultures sans glutathion montrent une sensibilité extrême au cuivre.

D'après ces résultats il est possible de supposer que le cuivre favorise la croissance de la bactérie, mais seulement en présence de glutathion et à faible concentration en métal. La culture à forte concentration en cuivre confirme ces hypothèses. De plus, le glutathion semble essentiel à la tolérance au cuivre et la cystéine ne compense pas son activité. Il est donc probable que ce soit les capacités de chélation ou le potentiel réducteur du glutathion qui confèrent cette tolérance.

## 2.4.2. Mécanismes de défenses

### 2.4.2.1. Délétion des gènes codant des protéines liées au cuivre

Comme il est possible de le lire dans l'article présenté précédemment, l'expression des systèmes de tolérance/défense au cuivre sont inactivés chez *B. pertussis*. Nous avons malgré tout réalisé des mutants de délétion de ces systèmes et différents tests phénotypiques comme des courbes de croissance ou des tests de survie similaires à ceux présentés au début de ces résultats complémentaires. Aucun des différents mutants n'a montré de phénotype en dehors de ceux de l'opéron *bp1727-1728-1729*. Les tests de croissance en points finaux présents dans l'article précédent montrent bien la sensibilité au cuivre de ces mutants. Nous avons néanmoins développé un autre test sur boîte.



*Figure 49*: De gauche à droite, les photos représentent des boîtes de pétri contenant du milieu de culture SS solide avec différentes concentrations de cuivre, à savoir 0, 20  $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 2 mM. Un million de bactéries ont été déposés sur les boîtes, qui ont été incubées à 37°C durant 12 jours. En haut à droite : BPSM ; En haut à gauche le triple mutant *bp1727-28-29* ; En bas à droite le simple mutant *bp1727* ; En bas à gauche le double mutant *bp1728-29*.

Ce test n'apporte pas plus d'information que les cultures liquides. La seule observation différente est qu'à 2 mM seules quelques colonies de BPSM se développent sur la boîte tandis qu'en culture liquide la bactérie sauvage et le double mutant des systèmes de détoxification du stress oxydant *bp1728-28* présentent des phénotypes quasi similaires (figure 49). Il est probable que ce soit l'oxygénation du milieu qui diffère et modifie les phénotypes observés.

### 2.4.3. Impact du stress Oxydatif

#### 2.4.3.1. Mise au point du test Xanthine oxidase

Après avoir identifié le rôle de *bp1728-1729* et d'OxyR nous avons cherché à identifier l'impact de ces deux gènes en présence d'un stress oxydant non-métallique. Nous avons testé de nombreux stress oxydants tels que l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , les peroxydes organiques ou encore le paraquat. Aucun de ces stress n'a permis d'obtenir des résultats reproductibles. Le principal problème de ces stress est qu'ils sont très forts lorsqu'ils sont appliqués sur les bactéries, à tel point que de nombreuses bactéries lysent et libèrent leurs enzymes de détoxification comme les catalases, superoxydes dismutases, peroxydases, etc.. En effet, nous avons pu voir une très forte mortalité dans les temps précoces après l'application des stress, mais peu d'augmentation de cette mortalité après 5 minutes d'exposition. Or, dans notre cas, le niveau d'expression basal de *bp1728-1729* est faible. Il nécessite donc un certain temps d'exposition pour déclencher la surexpression.

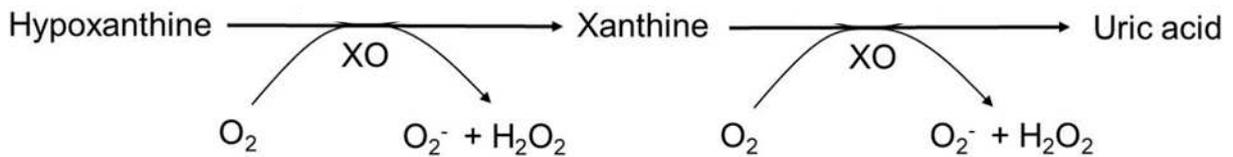


Figure 50 : Schéma de la réaction enzymatique de la Xanthine oxidase. Adapté de : Ozturk et al., 2019

Pour éviter ce choc soudain, nous avons opté pour une réaction enzymatique produisant de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de l'anion superoxyde en continu. Pour cela nous avons eu recours à la Xanthine oxidase qui transforme l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique tout en générant des ROS (figure 50) (Ozturk et al., 2019; Vorbach et al., 2003).

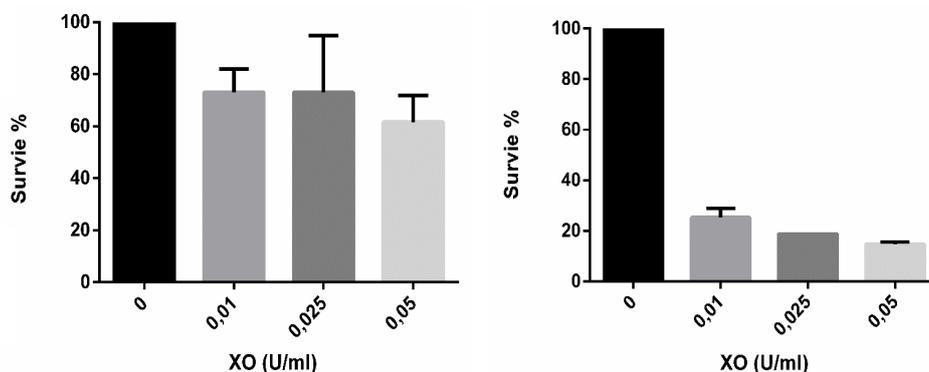


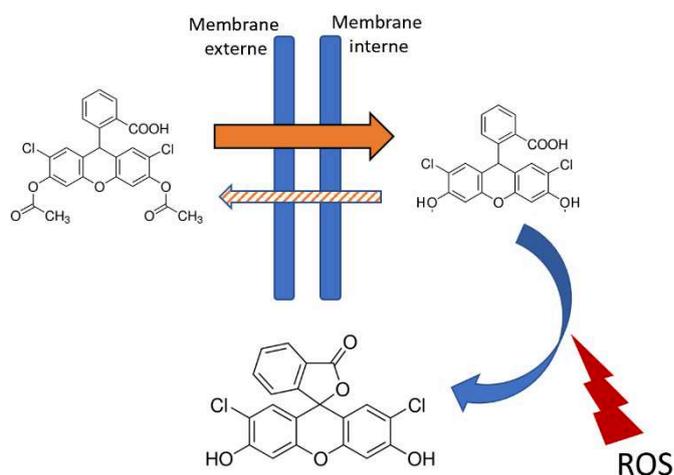
Figure 51 : Tests de survie aux ROS induits par la xanthine oxidase en 30 minutes dans différentes solutions. À gauche le test de survie a été réalisé dans la fraction A du milieu SS (sans les agents réducteurs), à droite le test de survie a été réalisé dans du PBS. Les deux solutions contenaient  $500 \mu\text{M}$  d'hypoxanthine. Les barres verticales sont des déviations standard.

L'intérêt de la réaction enzymatique est la production continue et progressive de stress oxydant. De plus, la xanthine oxidase ne génère pas un stress artificiel. En effet, c'est une enzyme utilisée par les cellules phagocytaires comme l'un des moyens de générer du stress oxydant bactéricide. Cette enzyme est également sécrétée par de nombreuses cellules épithéliales au niveau des surfaces muqueuses (Vorbach et al., 2003). Donc *B. pertussis* est probablement naturellement exposée à ce stress. Nous avons donc choisi de privilégier ce type de test de survie.

Durant les différents tests que nous avons effectués pour mettre au point un protocole reproductible, nous avons pu constater que le milieu SS est plutôt protecteur même en l'absence de la fraction B contenant les réducteurs (figure 51). Ce sont donc les expériences en PBS qui ont été choisies dans le test final.

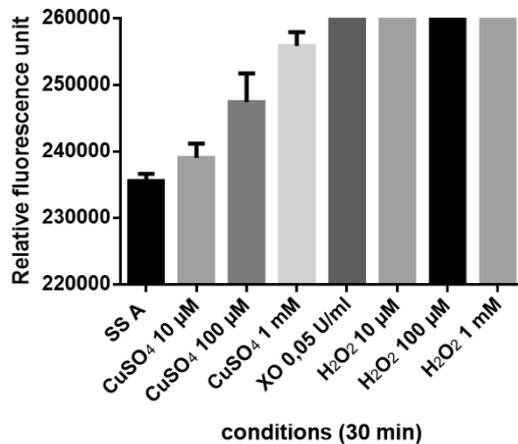
#### 2.4.3.2. Tests de quantification du stress oxydatif

En parallèle des tests de survie au stress oxydant, nous avons cherché à mettre en place un test de quantification du stress oxydant intracellulaire. Il existe déjà pour les cellules eucaryotes : le principe est d'exposer les cellules à de la 2-7-dichlorofluoresceine diacétate, qui traverse la membrane plasmique et se fait modifier par les estérases cellulaires. Le produit de cette réaction, la 2-7-dichlorofluoresceine est incapable de retraverser les membranes. Les ROS réagissent avec cette molécule, ce qui donnera de la dichlorofluoresceine fluorescente (figure 52).



*Figure 52 : Représentation schématique du fonctionnement du test de quantification du stress oxydant dans le cas d'un organisme procaryote.*

Nous avons donc appliqué un protocole proche dans le cas de *B. pertussis*. Les bactéries ont été cultivées en milieu SS puis à DO 1.5 (phase exponentielle) exposées à la dichlorofluorescine diacétate durant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans la fraction A du milieu SS additionné de molécules générant du stress oxydant. L'augmentation de la fluorescence est suivie par fluorimétrie.



*Figure 53: Quantification de la fluorescence intracellulaire provoquée par le stress oxydant induit par différents composés. Les barres verticales sont des déviations standard*

L'augmentation de fluorescence est tellement importante avec certains réactifs qu'elle provoque la saturation du fluorimètre (figure 53). Néanmoins, nous pouvons observer que le cuivre induit bien une augmentation de la fluorescence et donc de manière indirecte du stress oxydant intracellulaire.

Ce type de technique peut donc s'avérer utile pour la quantification du stress oxydant intracellulaire. Néanmoins au cours de ces travaux de thèse nous n'avons pas eu le temps de développer cette technique.

## 2.4.4. Rôle du cuivre et différents systèmes dans la relation hôte-pathogène

### 2.4.4.1. Impact du cuivre dans la bactéricidie des cellules phagocytaires

Lors de ces travaux de thèse, nous avons étudié l'interaction entre le cuivre et *B. pertussis*. Après avoir bien caractérisé cette interaction, nous avons cherché à comprendre le rôle de ce métal dans l'interaction hôte-pathogène. Pour cela nous avons commencé par mettre en place des modèles cellulaires permettant d'identifier le rôle du cuivre dans la bactéricidie des macrophages envers *B. pertussis*.

Nous avons commencé les recherches avec un modèle cellulaire de macrophages immortalisés de souris : les Raw 264.7. L'article de White et al., 2009, a montré l'importance du cuivre dans la bactéricidie des macrophage et en a décrit les mécanismes et la régulation. Nous avons donc cherché à reproduire ce modèle de manière à l'appliquer à *B. pertussis*.

Dans l'article précédemment cité, les transporteurs à cuivre de type ATP7A et Ctr1 sont surexprimés et ré-adressés en fonction de la concentration des cytokines pro-inflammatoires. Mais il est possible d'obtenir des effets similaires avec l'activation des macrophages par préexposition aux LPS. Nous avons donc cherché à voir les différences de survie de *B. pertussis* à la phagocytose par les Raw264.7 pré-activés ou non.

La source principale de cuivre pour les macrophages est la céruloplasmine présente dans le plasma sanguin. En culture cellulaire, la majorité du cuivre vient du sérum de veau foetal que l'on utilise comme additif au milieu de culture. Pour tester l'impact du cuivre, nous avons privé les cellules de ce sérum durant 24 heures avant l'infection ainsi que pendant l'infection, afin de standardiser nos résultats. En effet, selon le lot de sérum, on peut observer des variations dans les observations. Dans certains cas, les cellules ont uniquement été exposées aux milieux de culture sans additif et dans d'autres, les cellules ont reçu un supplément de cuivre inorganique ( $\text{CuCl}_2$  à 20  $\mu\text{M}$ ).

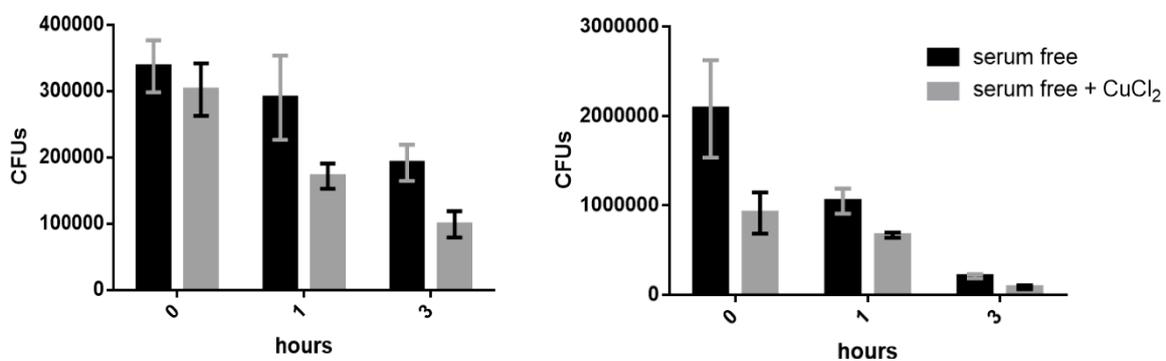


Figure 54 : Test de survie à la phagocytose de *B. pertussis*. À gauche les macrophages Raw264.7 n'ont pas été exposés aux LPS contrairement à la figure de droite. Les barres verticales sont des déviations standard.

Les bactéries sont mises en contact une heure avec les macrophages, puis les bactéries extracellulaires (non phagocytées) sont éliminées avec de la polymyxine B. C'est à ce moment que nous commençons à dénombrer la survie des bactéries intracellulaires. Ce point constitue le temps 0.

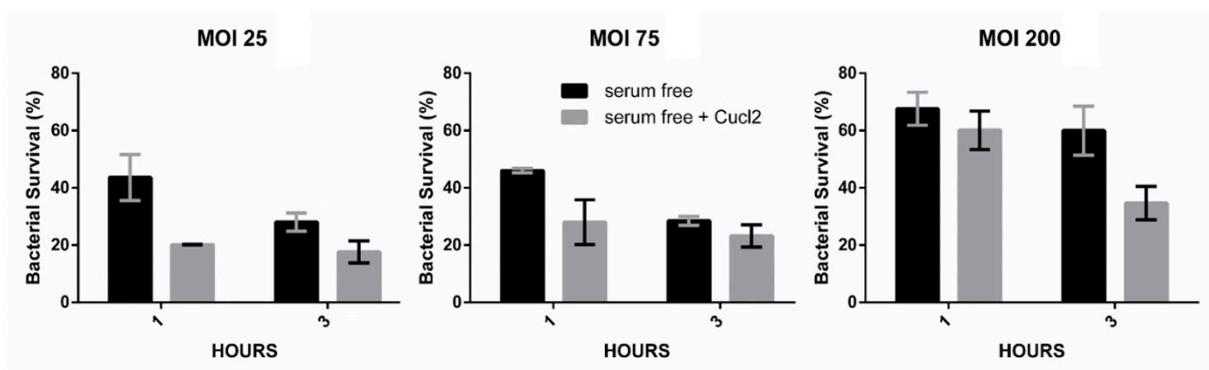
La figure 54 met en évidence plusieurs différences en fonction, à la fois de l'activation par les LPS et de la présence de cuivre dans le milieu. Les macrophages ont été mis en contact avec le même nombre de bactéries dans toutes les conditions. Pourtant, on voit que dans le cas des macrophages non soumis à une activation par les LPS, les bactéries viables sont bien plus nombreuses. La littérature scientifique met en évidence que les LPS augmentent la phagocytose et la bactéricidie. Il est donc probable que non seulement les macrophages activés phagocytent davantage les bactéries mais les tuent plus rapidement. En revanche, les macrophages non activés présenteraient à la fois une bactéricidie plus faible et une moindre capacité de phagocytose. De plus il est possible d'observer sur ce même graphique que le cuivre ne semble pas avoir d'impact majeur au temps 0, c'est-à-dire quand les macrophages sont lysés immédiatement après 1 heure (dans le cas de cette expérience) de contact avec les bactéries et élimination des bactéries non phagocytées. En revanche, les macrophages pré-activés par le LPS montrent une bactéricidie accrue par le cuivre dès le temps 0. On peut également constater que le contact avec les bactéries provoque une activation comparable à l'activation par les LPS mais décalée dans le temps. En effet, après 1 heure, les macrophages non pré-activés au LPS présentent une activité bactéricide liée au cuivre. On peut donc supposer que les macrophages pré-exposés avaient déjà mis en place les systèmes d'utilisation du cuivre à des fins bactéricides, tandis que ceux non-préexposés aux LPS n'ont commencés à ré-adresser et surexprimer les transporteurs qu'au contact des bactéries, expliquant le décalage dans le temps de l'impact du cuivre.

Ces données nous ont montré l'importance du cuivre dans les capacités des macrophages à tuer *B. pertussis*. Nous avons appliqué ce type de protocole à différents types cellulaires, incluant des MHS qui sont des macrophages alvéolaires de souris, mais aussi des THP1 qui sont des monocytes humains qu'il est possible de différencier chimiquement en macrophages. Les résultats les plus reproductibles ont été obtenus avec les THP1.

Ces cellules présentent de nombreux avantages. Par exemple, lors de leur différenciation par utilisation de Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), les THP1 cessent de se multiplier, ce qui permet de maintenir une population cellulaire constante et d'établir une multiplicité d'infection (MOI) reproductible entre les expérimentations. De plus, le PMA entraîne la surexpression et la relocalisation de l'ATPase à cuivre, ATP7A, entraînant une augmentation du cuivre intracellulaire (Afton et al., 2009). Cette donnée suggère l'accumulation de cuivre dans les phago(lyso)somes des cellules. Le PMA nous permet donc de nous affranchir d'activer les cellules phagocytaires par du LPS bactérien, qui ne produit pas le même niveau d'activation en fonction des lots. Enfin, après quelques tentatives nous

avons diminué le temps de contact entre bactéries et les macrophages. Ce changement a permis de niveler les différences de survie observées entre différentes conditions et différents mutants au temps 0. Ainsi, au temps 0 le nombre bactéries survivantes est très similaire dans toutes les conditions, et nous avons pu utiliser ce point comme référence pour calculer des pourcentages de survie au cours du temps. Cette représentation des données présente l'avantage de permettre la comparaison entre deux expériences réalisées indépendamment.

À partir de ces nouvelles cellules et de ce nouveau protocole, nous avons cherché à voir l'impact de la multiplicité d'infection (MOI) sur la sensibilité au cuivre des bactéries. Pour cela, nous avons réalisé une série d'infections allant d'une MOI de 1 à une MOI de 400.

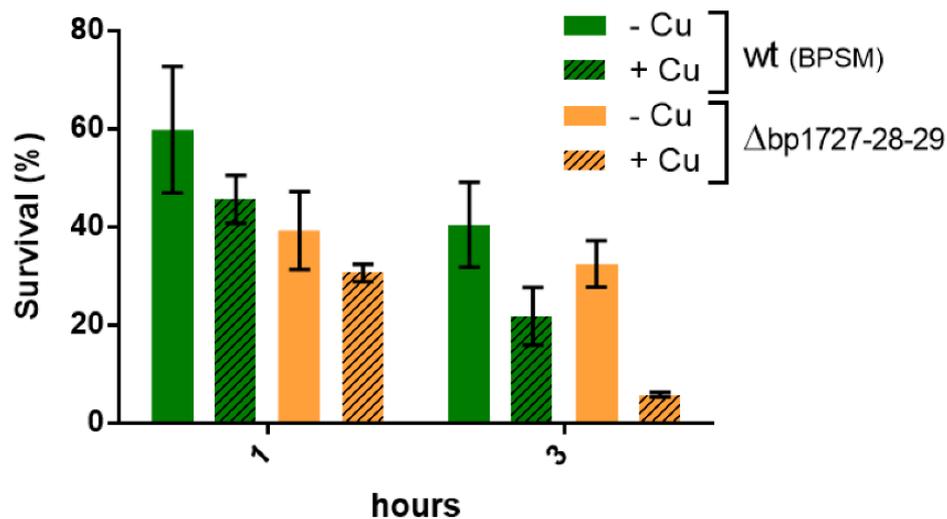


*Figure 55: Tests de survie à la phagocytose à différentes MOI et en fonction de la disponibilité du cuivre pour les macrophages THP1. Les écart-types sont des déviations standards.*

En observant les résultats représentés dans la figure 55, il est possible de constater que la bactéricidie médiée par le cuivre est influencée par la MOI. Dans les deux MOI les plus basses, l'impact du cuivre a lieu principalement au temps 1 heure, tandis qu'à une MOI de 200, cet impact se décale au temps 3 heures. Cette observation est étonnante car le PMA entraîne la mise en place de toute la chaîne de transport du cuivre à destination du phagosome et donc l'accumulation du cuivre dans ce compartiment avant le contact avec les bactéries. De plus, nous avons vu précédemment que *B. pertussis* ne possède pas de système d'extrusion actif mais seulement un système de tolérance au cuivre. On peut néanmoins supposer que si les bactéries internalisées sont plus nombreuses, la « charge de cuivre » supportée par chacune est moins importante. Mais il est plus probable que ces observations soient dues aux pouvoirs immuno-modulateurs de la bactérie. En effet, une charge bactérienne plus importante implique également des concentrations supérieures en toxines et effecteurs, qui retardent ou inhibent la fusion phagosome-lysosome. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer le taux de survie plus élevé en présence d'une MOI forte.

Les différentes expériences précédemment décrites nous ont permis d'établir des conditions optimales pour déterminer le rôle du cuivre dans la bactéricidie des macrophages sur *B. pertussis* et les mutants que nous avons testés.

Dans les travaux précédents, nous avons identifié comme acteur majeur de la tolérance au cuivre chez *B. pertussis* l'opéron *bp1727-1728-1729*. Dans l'article présenté ci-dessus, nous avons établi que la perte de cet opéron entraîne un défaut de survie à la phagocytose. Nous avons donc cherché à voir si cette mortalité accrue était due au cuivre uniquement ou au reste des stress présents dans le phagolysosome.



*Figure 56 : Tests de survie à la phagocytose des BPSM et du mutant de délétion pour l'opéron *bp1727-1728-1729*. Les macrophages ont soit été privés de sérum (-Cu), soit privés de sérum et supplémentés en cuivre inorganique (+Cu). Les barres verticales sont des déviations standard.*

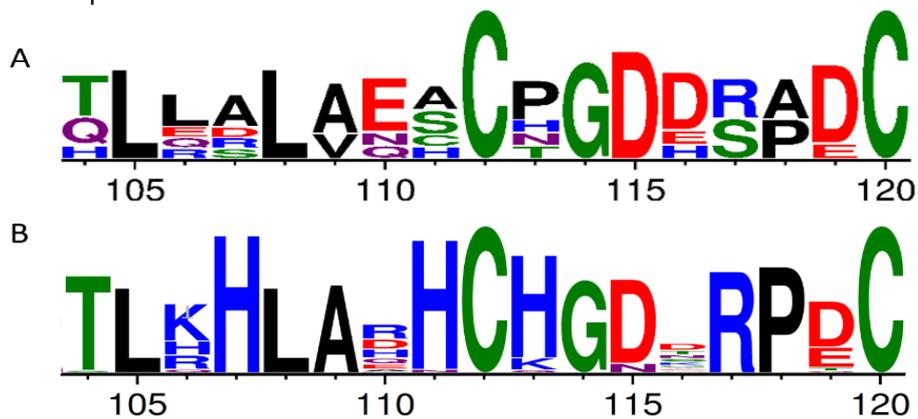
Dans la figure 56, on observe le défaut de survie du mutant de délétion pour l'opéron dans toutes les conditions testées comparé à la souche sauvage, montrant que le cuivre n'est pas le seul facteur impliqué dans la mortalité accrue du mutant. Il est probable que cette observation soit liée à l'exposition aux espèces oxygénées réactives générées par les macrophages. Néanmoins au temps 3 heures, on voit très clairement l'impact du cuivre sur le mutant de délétion.

Ces résultats semblent confirmer nos hypothèses de fonctionnement de l'opéron établies in vitro. La chaperonne CopZ va séquestrer le cuivre de manière à le passiver, tandis que les deux gènes suivants détoxifient l' $H_2O_2$ , limitant ainsi sa réaction avec les métaux comme le cuivre et le déclenchement d'une cascade de réactions (Fenton et Haber-Weiss) qui provoquent l'accumulation du stress oxydant.

## 2.4.5. Régulation des mécanismes de défenses

### 2.4.5.1. Cas du régulateur CueR des *B. pertussis*

Nous avons caractérisé en profondeur la régulation du système *bp1727-1728-1729* dans l'article. Néanmoins, malgré nos efforts il manque la caractérisation d'un des acteurs majeurs de ce système : la protéine CueR (BP1726). Sa caractérisation n'a pu être effectuée que par sa délétion, qui a mis en évidence une modification de la régulation de l'opéron. Nous avons tenté de produire une protéine recombinante chez *E. coli* en utilisant divers plasmides d'expression, mais sans succès. Lors des clonages dans ces vecteurs, même si l'expression du gène recombinant devait être minimal en absence d'induction, plusieurs mutations spontanées apparaissaient, provoquant des sauts de phase ou des codons stop dans le gène. Lorsque nous parvenions à obtenir un plasmide d'expression final, les cultures d'*E. coli* mouraient lors de l'induction, et celles qui poussaient ne produisaient pas la protéine. En analysant par séquençage les différents plasmides obtenus lors des clonages intermédiaires, nous avons pu observer la récurrence de certaines mutations. En dehors des sauts de phase ou des codons stop la mutation des histidines autour du site de liaison au métal était relativement fréquente.



*Figure 57: Weblogo du site de liaison aux métaux des régulateurs de type MerR. Seuls des régulateurs à cuivre de type CueR, et non pas ceux à zinc, ont été utilisés pour ces logos. A, weblogo obtenu avec les régulateurs CueR de Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Escherichia coli, Cupriavidus metallidurans et Rubrivivax gelatinosus. B, le second weblogo a été réalisé avec les CueR de toutes les espèces du genre Bordetella.*

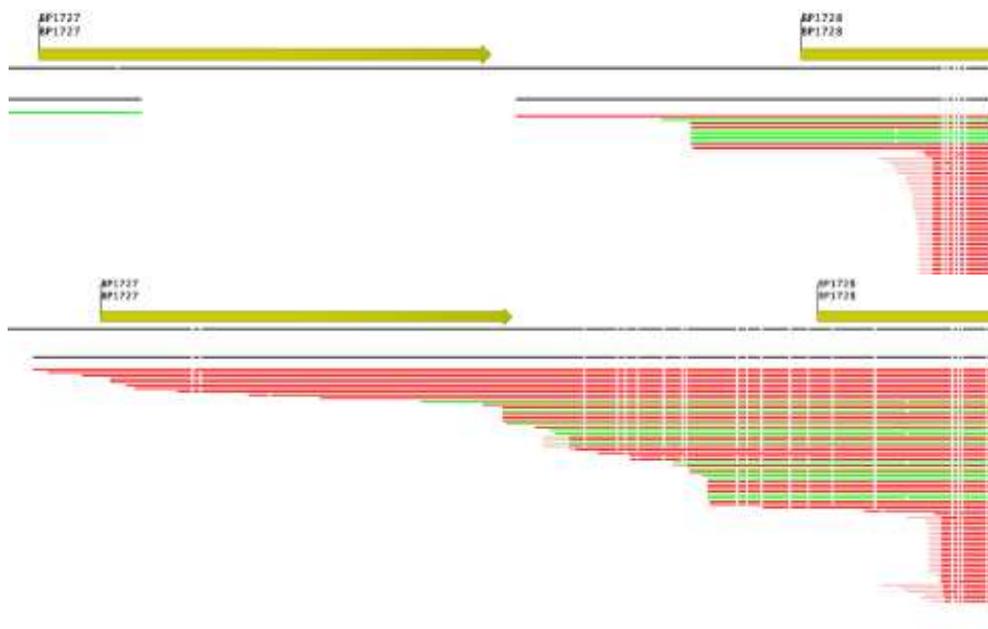
Les régulateurs de la famille MerR, dont font partie ceux de type CueR, présentent un site de liaison au métal composé de deux cystéines. Le site de sélection du métal (cuivre ou zinc) est lié à la présence d'une Ser ou d'une Cys plus en amont (Ibáñez et al., 2015). Il est possible de voir chez les Bordetelles 3 histidines extrêmement conservées, qui sont absentes dans les autres CueR. Il est donc probable que ces histidines interviennent dans la complexation du cuivre, et peut être confèrent à CueR une affinité accrue. De fait, il s'avère que ce sont justement ces histidines qui étaient remplacées dans nos plasmides par des mutations spontanées.

La littérature scientifique a mis en évidence l'extrême affinité de CueR au cuivre  $\text{Cu}^{1+}$  de l'ordre de  $10^{-21}$  M (Changela et al., 2003). Serait-il possible que ces histidines augmentent encore l'affinité, à tel point qu'elles rendraient la protéine toxique pour *E. coli*? En effet, si l'affinité de CueR est telle qu'elle titre les ions cuivre nécessaires à l'assemblage des cuproprotéines, on s'attendrait à ce que la bactérie qui doit produire la protéine recombinante ne puisse croître que si elle trouve un moyen de ne pas exprimer le gène ou si elle sélectionne un variant moins affiné.

Nous avons contacté le groupe d'Oleg Melnik du CILL, qui tente de produire CueR par synthèse chimique. Ce travail est en cours.

#### 2.4.5.2. 5'RACE

Nous avons eu recours à la technique du 5'RACE pour identifier le +1 de transcription du gène *bp1727*. Nous avons également cherché à identifier une potentielle ré-initiation de transcription dans la région intergénique entre *bp1727-bp1728*.



*Figure 58: Mapping des reads obtenues par séquençage après isolement des transcrits primaires. En haut en conditions normales de cultures et en bas en condition d'excès de cuivre.*

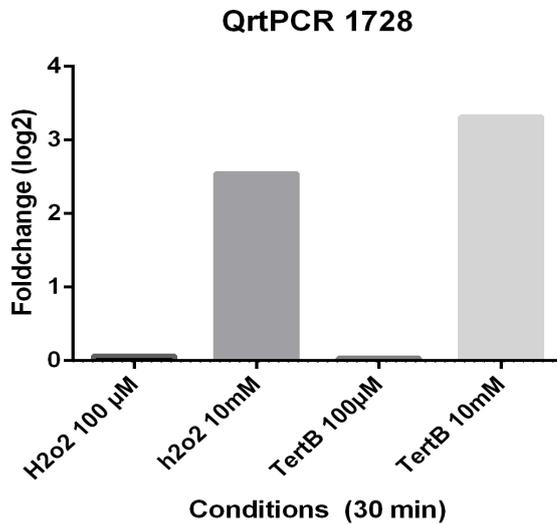
Dans les deux conditions testées, la faible couverture (faible nombre de 'reads') ne permet pas d'identifier clairement un +1 de transcription. Néanmoins, en conditions standard, on observe quelques départs de transcription dans la région intergénique. En conditions d'excès en cuivre, la plupart des reads proviennent du gène précédent. Ces données nous ont fait supposer la présence d'une double régulation des gènes *bp1728-1729* :

la régulation traversante due au site de liaison à l'ADN de CueR devant bp1727 et peut être la régulation ancestrale des deux gènes présents avant la récupération de ce système sous la régulation « cuivre ».

Nous avons également cherché le +1 de transcription de bp1726 (cueR). Néanmoins, son faible niveau de transcription n'a pas permis d'obtenir assez de reads pour conclure. Le plus étonnant est que, contrairement à de nombreux organismes, CueR n'est pas autorégulé chez *B. pertussis*. Si l'on analyse la région intergénique entre bp1726 et bp1727, on peut voir le site de liaison de CueR devant bp1727 mais il en existe un autre très similaire avec un palindrome identique devant bp1726. Néanmoins, la distance séparant les deux moitiés du palindrome n'est que de 4 nucléotides par rapport au 7 habituels. Il est possible que ce motif de liaison ait dégénéré, empêchant l'autorégulation de CueR.

### 2.4.5.3. Régulation OxyR

La seconde régulation médiée par OxyR a elle aussi été investiguée dans l'article.

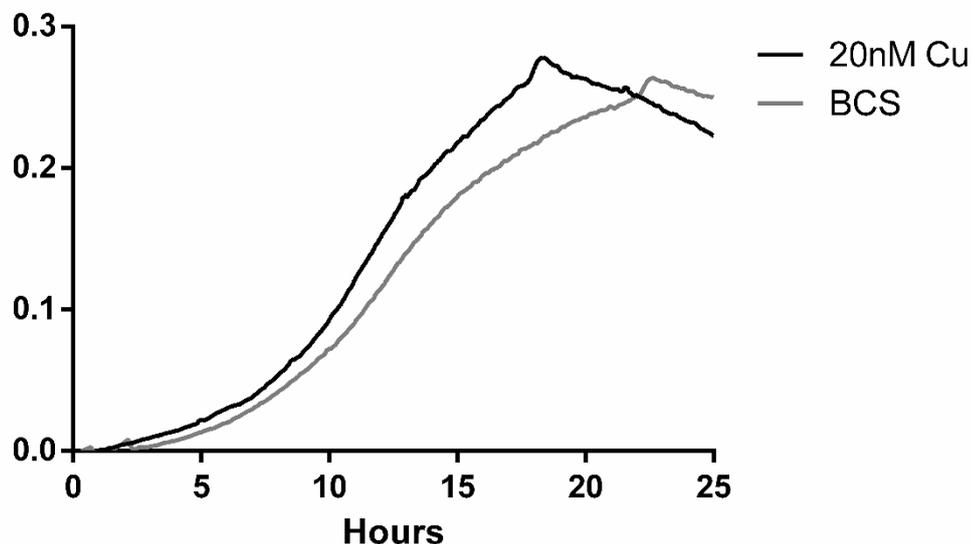


*Figure 59: qRT-PCR sur le gène bp1728. Les histogrammes représentent la variation d'expression comparée à une culture non traitée. Les données sont normalisées grâce au gène de ménage bp3416*

Au cours de nos recherches sur ce régulateur, nous avons pu observer, grâce à des qRT-PCR, qu'il ne semble pas spécifique du peroxyde d'hydrogène. Lors des caractérisations enzymatiques de BP1728, nous avons constaté que cette enzyme dégrade non seulement le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes organiques comme l'hydroperoxyde de tert-Butyl. Si l'enzyme régulée par OxyR n'est pas spécifique d'un peroxyde, il est probable que OxyR non plus. La figure 59 nous montre que le peroxyde organique semble même induire une régulation de bp1728 qui est plus forte que celle causée par l' $H_2O_2$ . Cette différence vient probablement du fait que l' $H_2O_2$  n'est pas seulement dégradé par les peroxydases comme BP1728 mais aussi par la catalase qui est inactive sur les peroxydes organiques.

#### 2.4.6. Mise au point des conditions de carence en cuivre

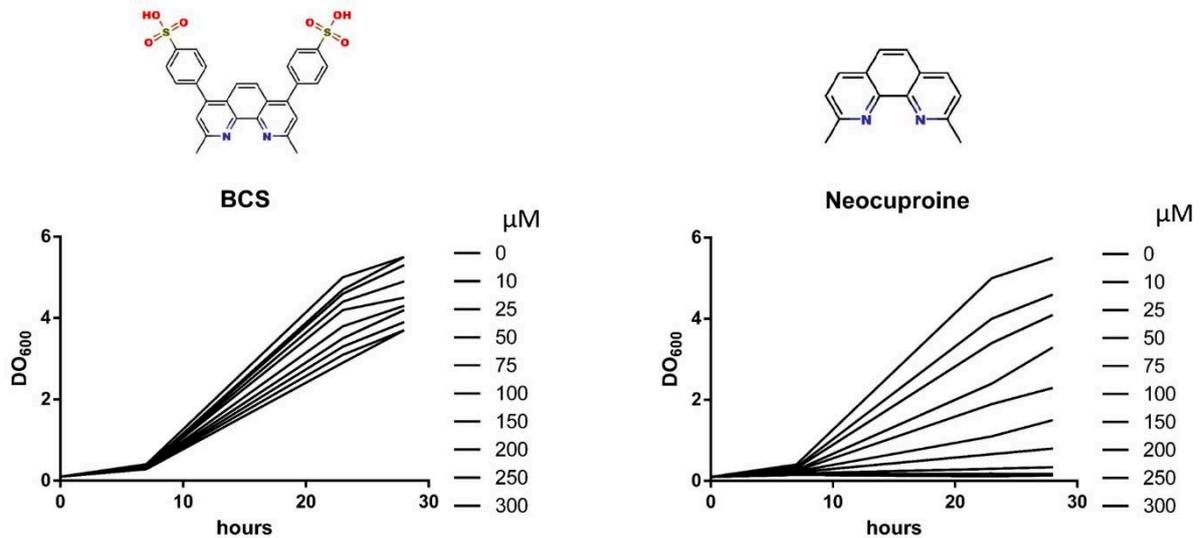
En parallèle à la recherche de conditions de croissance en excès de cuivre, nous avons développé des conditions de carence en cuivre. Aucun des milieux de culture à notre disposition ne contient de cuivre ajouté, mais il semble que les contaminations issues du sulfate de fer, des différents acides aminés et d'autres composants du milieu suffisent à la croissance de *B. pertussis*. Dans un premier temps nous avons réalisé des cultures dans le milieu Thijs bien plus défini chimiquement que le milieu SS. Dans l'espoir d'accentuer les différences observées dans une des conditions, nous avons rajouté une « trace » de cuivre (20 nM  $\text{CuSO}_4$ ) et dans l'autre de la bathocuproïne disulfonate (BCS) ( $10\mu\text{M}$ ) un chélateur spécifique du cuivre.



*Figure 60 : Suivi de croissance en milieu Thijs par Elocheck. La culture représentée par le trait noir est supplémentée avec une trace de cuivre. La culture représentée par le trait gris est supplémentée avec un chélateur spécifique du cuivre.*

Les effets de la chélation en milieu Thijs sont faibles mais très reproductibles. Néanmoins, comme nous souhaitons comparer des analyses transcriptomiques en conditions d'excès et de carence nous avons choisi de mettre au point des conditions de carence en milieu SS.

Le milieu SS étant beaucoup plus complexe, il est probable que la concentration en cuivre issu des contaminations des différents composants soit plus importante. Nous avons donc testé deux chélateurs différents à plusieurs concentrations.



*Figure 61 : En haut : représentation semi développée du BCS et de la Néocuproïne. En bas : courbe de croissance en milieu SS avec différentes concentrations des chélateurs.*

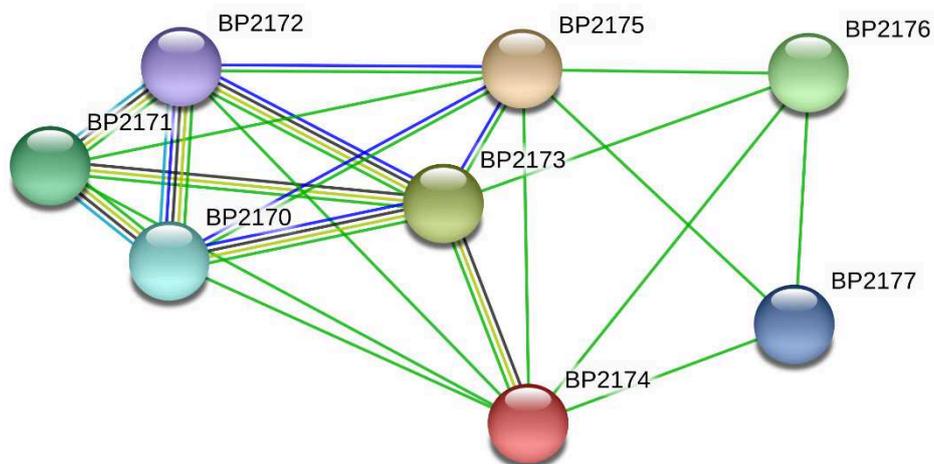
Le BCS et la néocuproïne sont deux chélateurs spécifiques du cuivre sous forme  $\text{Cu}^{1+}$ . La plupart des bactéries réduisent le cuivre accidentellement via les transferts d'électrons de la chaîne respiratoire, qui peuvent directement ou indirectement céder un électron à ce métal. Par chance, notre milieu de culture contient une importante concentration d'un agent réducteur, l'ascorbate, et il n'est pas nécessaire d'avoir recours à la réduction accidentelle du cuivre pour provoquer la chélation et donc la carence. La principale différence entre ces deux chélateurs est leur aptitude à passer les membranes ou non. Le BCS reste dans le milieu extérieur tandis que la néocuproïne traverse les membranes. Cette propriété est probablement à l'origine de l'important défaut de croissance observé en présence de néocuproïne. Cette dernière traverse les membranes et déplacerait le cuivre présent dans certaines cuproprotéines. En revanche, le BCS ne fait qu'entraîner un retard de croissance probablement dû au défaut de métallation de ces protéines. Nous avons donc retenu la croissance à 250  $\mu\text{M}$  de BCS comme condition de carence.

#### 2.4.7. Analyse transcriptomique de la carence en cuivre

Après avoir mis au point les conditions de carence en cuivre, une analyse transcriptomique a été effectuée. Comme pour les analyses en condition d'excès de cuivre, des mises au point sur biopuces (microarray) ont été réalisées avant de confirmer par RNAseq (Tableau 3).

Les trois gènes les plus réprimés par le cuivre codent pour les protéines BP2173-BP2174-BP2175. Dans le génome de référence, les fonctions de ces protéines ne sont pas définies. Néanmoins, dans le cas de BP2173 les alignements de séquences montrent qu'il s'agit d'un homologue de la protéine CcoG qui est une protéine faisant partie de la chaîne de transport et d'intégration du cuivre dans la Cytochrome C oxidase *cbb3*. Les deux autres protéines sont de fonction inconnue. De manière à émettre des hypothèses sur leur fonction et la raison de leur régulation par le cuivre, nous avons réalisé des analyses STRING. Cette base de données permet de prédire le contexte génomique, et la co-expression avec d'autres gènes dans différents organismes, mais compile également les informations présentes dans de nombreuses bases de données allant des données cristallographiques à celles d'interactions protéines-protéines, et réalise une analyse de la littérature scientifique par « texte mining ».

Dans ces analyses il est possible de voir que le gène de BP2175 est voisin de ceux des sous-unités de la cytochrome c oxidase (BP2170-BP2171-BP2172) et que cette proximité génétique et fonctionnelle est retrouvée chez d'autres organismes. Il est donc possible que cette protéine BP2175 soit une protéine accessoire de l'assemblage ou du fonctionnement de ce complexe respiratoire.



*Figure 62 : Représentation des interactions prouvées ou prédites de différentes protéines avec BP2174. Les liens en vert foncé représentent le voisinage génétique, ceux en vert clair représentent la co-occurrence de ces protéines dans la littérature scientifique, les liens noirs représentent la co-expression, les liens bleus clairs représentent l'interaction des protéines prédites par les bases de données, les liens bleus foncés représentent la co-occurrence des gènes dans d'autres organismes. Source : String software*

Tableau 4 : Résumé des analyses transcriptomiques (RNAseq) de *B. pertussis* en conditions de carence en cuivre (250µM BCS)

Transcription Start	Translation Start	Translation Stop	Transcription Stop	Strand	Name	Synonym	Product	SS medium (RPKM)	SS medium 250µM BCS (RPKM)	Foldchange (Log2)
2295200	2295279	2295431	2295444	+	-	BP2174	lipoprotein	286	20	-3,84
2295445	2295445	2295684	2295691	+	-	BP2175	inner membrane protein	306	22	-3,80
2293703	2293703	2295193	2295199	+	-	BP2173	ferredoxin	66	5	-3,72
396200	396200	395097		-	-	BP0397	hypothetical protein	107	20	-2,42
2033259			2033335	+	-	BPt24	Arg tRNA	1350	259	-2,38
	398007	396388	396201	-	-	BP0398	membrane protein	89	18	-2,31
399062	399062	398004		-	-	BP0399	glycosyl transferase family protein	132	29	-2,19
692900			692825	-	-	BPt08	Phe tRNA	103	23	-2,16
2597285			2597374	+	-	BPt33	Ser tRNA	234	61	-1,94
3735180			3735096	-	-	BPt47	Leu tRNA	465	126	-1,88
1659552	1659536	1658823		-	-	BP1580	cytochrome C	61	17	-1,84
	1658826	1657909	1657852	-	-	BP1579	cytochrome C	83	24	-1,79
1078128			1078053	-	-	BPt14	Glu tRNA	3791	1109	-1,77
2996473			2996548	+	-	BPt37	Lys tRNA	51	15	-1,77
1078235			1078160	-	-	BPt15	Ala tRNA	9472	2832	-1,74
3386736			3386646	-	-	BPt42	Ser tRNA	263	79	-1,74
1301250			1301325	+	-	BPt18	Asn tRNA	430	130	-1,73
2659402			2659477	+	-	BPt34	Gly tRNA	281	87	-1,69
	2292673	2293611	2293611	+	-	BP2172	cytochrome C oxidase subunit III	72	23	-1,65
1078017			1077941	-	-	BPt13	Asp tRNA	735	243	-1,60
2235156			2235231	+	-	BPt28	Ala tRNA	21	7	-1,58
822707			822623	-	-	BPt10	Leu tRNA	27	9	-1,58
3741999			3742059	+	-	predicted RNA	-	2541	877	-1,53
764870			764946	+	-	BPt09	Pro tRNA	1131	396	-1,51
1793088	1793172	1794170		+	-	BP1708	ABC transporter substrate-binding protein	29	83	1,52
3433803	3433803	3434504		+	ompR	BP3222	two component response regulator	23	67	1,54
2339952	2339936	2339391		-	-	BP2216	MarR family transcriptional regulator	68	199	1,55
2647845	2647758	2646601	2646022	-	dnaJ	BP2498	chaperone protein DnaJ	84	249	1,57
	627612	625789		-	-	BP0620	branched-chain amino acid ABC transporter permease	1	3	1,58
	3930242	3929373		-	-	BP3720	branched-chain amino acid ABC transporter permease	1	3	1,58
	1468874	1468533		-	fliO	BP1392	flagellar protein FliO	1	3	1,58
	3030781	3029999		-	-	BP2853	short chain dehydrogenase	1	3	1,58
3031544	3031544	3030795	3030782	-	-	BP2854	short chain dehydrogenase	3	9	1,58
1686527	1686461	1685412	1685340	-	-	BP1605	iron binding protein	159	483	1,60
3110908	3110897	3109428	3108840	-	-	BP2921	exported protein	22	67	1,61
3665623	3665592	3664684	3664684	-	-	BP3455	taurine dioxygenase	17	54	1,67
	3434504	3435928	3436264	+	-	BP3223	two-component sensor kinase	18	58	1,69
3968527	3968727	3969365	3969446	+	-	BP3755	outer membrane protein	19	62	1,71
3663589	3663589	3661928	3661862	-	-	BP3453	thiamine pyrophosphate protein	3	10	1,74
3113137	3113107	3110909	3110909	-	bfrG	BP2922	TonB-dependent receptor	56	188	1,75
2069974	2069974	2067866	2067833	-	bfrI	BP1962	ferrisiderophore receptor	3	11	1,87
2649784	2649784	2647859	2647849	-	dnaK	BP2499	chaperone protein DnaK	150	565	1,91
939247	939247	938066		-	-	BP0903	membrane protein	7	27	1,95
	2290070	2290213	2290348	+	-	BP2168	outer membrane protein	16	62	1,95
	237325	236528	236528	-	-	BP0229	beta-D-hydroxybutyrate dehydrogenase	1	4	2,00
	1636843	1635722		-	-	BP1558	exported protein	1	4	2,00
1639366	1639343	1637931	1637881	-	-	BP1560	hypothetical protein	7	28	2,00
3664683	3664629	3663664	3663590	-	-	BP3454	lipoprotein	6	24	2,00
	938069	937857	937844	-	-	BP0902	membrane protein	6	26	2,12
2288945	2289099	2290073		+	-	BP2167	integral membrane protein	22	97	2,14
352516	352516	352007	351988	-	hurl	BP0349	heme uptake regulator	3	14	2,22
1640764	1640749	1639439	1639439	-	-	BP1561	exported protein	16	75	2,23
2556337	2556329	2555988	2555973	-	-	BP2414	hypothetical protein	14	67	2,26
1198526	1198526	1199059		+	fecl	BP1136	ECF family RNA polymerase sigma factor	1	5	2,32
2128968	2128969	2131173	2131215	+	brfB	BP2016	ferric siderophore receptor	1	5	2,32
351971	351971	351054	351022	-	hurR	BP0348	heme uptake transmembrane sensor	1	6	2,58
1275836	1275832	1274816		-	apbE	BP1210	thiamine biosynthesis lipoprotein	1	7	2,81
1276637	1276637	1275837	1275837	-	-	BP1211	exported protein	8	57	2,83
1277204	1277182	1276667	1276638	-	-	BP1212	exported protein	3	22	2,87
1277834	1277834	1277205	1277205	-	-	BP1213	membrane protein	1	8	3,00
238233	238275	238685	238767	+	pcaC	BP0231	4-carboxymuconolactone decarboxylase	8	67	3,07
2290394			2290499	+	-	predicted RNA	-	38	324	3,09
1807858	1808076	1808828	1808946	+	-	BP1724	exported protein	3	26	3,12
1807188	1807188	1807787	1807805	+	-	BP1723	exported protein	39	383	3,30
1257358			1257579	+	-	predicted RNA	antisense: btr	23	314	3,77

Enfin dans le cas de BP2174, les analyses nous montrent que dans un certain nombre d'organismes le gène est co-régulé avec les autres gènes du complexe protéique de la Cytochrome c oxidase, ce qui confirme nos résultats. Néanmoins, il ne semble pas que ce gène soit présent dans ce contexte génétique chez d'autres organismes. Cette protéine n'ayant aucun motif reconnaissable, il est difficile de lui définir un rôle. Néanmoins, le fait que le gène fasse partie du locus génétique codant la synthèse et l'assemblage de la cytochrome c oxidase *cbb3* et qu'il soit souvent co-régulé avec ce locus, tendent à montrer que cette protéine serait impliquée dans ce système.

On peut observer la sous expression des cytochromes C, ce qui semble cohérent avec le fait que les complexes protéiques les utilisant (CytC oxydase), sont eux-mêmes sous exprimés.

*B. pertussis* possédant plusieurs Cytochrome C oxidases, il n'est pas impossible de penser que la carence en cuivre entraîne la down régulation de celles à cuivre au profit des autres.

Il est également possible de voir la sous expression de trois gènes *bpo397-0398-0399*. Ces trois gènes se retrouvent ensemble chez de nombreux organismes. Les analyses STRING ont également montré une régulation de ces homologues chez *Acinetobacter sp. ADP1*, *Salmonella enterica CT18*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces gènes semblent apparemment impliqués dans la modification des LPS. Il est donc possible que ce soit le stress de membrane dû au cuivre qui soit responsable de leur légère surexpression en excès de cuivre et de leur répression en carence.

Enfin on observe la répression de la plupart des ARN de transfert suggérant une baisse de la synthèse des protéines, ce qui est cohérent avec le ralentissement de la croissance observée.

Nous nous sommes davantage intéressés aux gènes régulés positivement par la carence en cuivre, qui sont plus nombreux. La majorité code pour des protéines du métabolisme ou des protéines de fonction non encore connue, mais aussi pour des chaperonnes comme DnaK ou DnaJ, qui constituent des réponses à un stress général.

Il est également possible d'observer la surexpression majeure de deux gènes codant les protéines BP1723 et BP1724. Ces deux protéines sont de fonction inconnue et ne portent pas de domaine pFam. BP1723 est une protéine de 199 acides aminés, riche en histidines et méthionines, avec un peptide-signal et prédite pour se replier en hélices alpha. BP1724 porte également un peptide signal, et des prédictions de structure (I-TASSER) indiquent qu'il formerait un tonneau beta transmembranaire. Ces caractéristiques suggèrent que ces deux gènes pourraient coder des protéines liées à l'importation du cuivre. Néanmoins cette hypothèse est mise à mal par le fait que ces deux gènes sont également up régulés en excès

de cuivre. De plus les analyses STRING tendent à établir un lien entre la protéine BP<sub>1723</sub> et la protéine BP<sub>1721</sub>. Les gènes des deux protéines homologues sont co-régulés chez *E. coli*. L'homologue de BP<sub>1721</sub> chez *E. coli* est *IdtC*, impliqué dans l'ancrage des lipoprotéines de membrane externe au peptidoglycane. Toujours d'après ces analyses, l'homologue chez *E. coli* de BP<sub>1723</sub> serait une chaperonne périplasmique impliquée dans l'aide au repliement des protéines.

Ces deux protéines ne semblent donc pas directement liées à l'homéostasie du cuivre mais plutôt au stress que l'excès ou l'absence de cuivre provoque, au même titre que DnaK et DnaJ.

En plus de ces gènes, il est possible d'observer l'up régulation de certains systèmes d'importation du fer comme *brfB*, *bfrI* ou *hurR*. Il est possible que la BCS en excès chélate une partie du Fer libre à défaut de cuivre, entraînant une légère carence en fer pour la bactérie.

Parmi ceux-ci, un a particulièrement attiré notre attention : *bfrG*. La protéine BfrG est un transporteur TonB-dépendant. Ces transporteurs de membrane externe en tonneau beta permettent l'import de petits composés (sidérophores, vitamines) grâce à l'énergie fournie par le système TonB. Les séquences protéiques des transporteurs TonB-dépendants étant très proches, il est difficile de déterminer la spécificité de BfrG par des analyses bio-informatiques. Cette protéine a particulièrement attiré notre attention car elle est déjà apparue dans nos analyses de l'homéostasie du cuivre. En effet, nous avons pu constater qu'en présence d'un excès de cuivre le gène *bp2922* (*bfrG*) et ses deux voisins *bp2921* et *bp2923* sont régulés négativement, d'un facteur élevé. Il semble donc raisonnable de penser que ce gène est impliqué dans l'homéostasie du cuivre. Les études préliminaires de cette protéine et de sa régulation seront présentées dans les chapitres suivants.

## 2.4.8. Mécanismes d'importation

### 2.4.8.1. Survie à la carence

Aucun des suivis de croissance en carence ou en excès de cuivre n'a permis de mettre en évidence un phénotype chez le mutant de délétion de *bfrG*. Nous avons également tenté de mettre en place des carences sur gélose permettant de tester beaucoup plus de conditions en parallèle. Pour cela nous avons utilisé du milieu SS supplémenté en agar et en différentes concentrations de chélateur spécifique du cuivre. La croissance sur ce milieu étant relativement difficile il est nécessaire de déposer un nombre relativement important de bactéries sur les géloses dès le départ. Nous avons donc cultivé les bactéries dans un milieu standard puis déposé environ 1 million de bactéries par spot sur les géloses. Après 5 jours à 37°C, les géloses ont été photographiées (Figure 63).



*Figure 63 : Photos de boîtes de pétri contenant de milieu SS avec différentes concentrations de chélateur. De gauche à droite : 20μM, 40μM, 60μM, 80μM. Les dépôts du haut correspondent à la souche sauvage BPSM, ceux du bas au mutant de délétion pour BfrG.*

Le BCS entraîne un défaut de croissance à plus faible concentration sur boîte qu'en milieu liquide. Il est possible que l'oxygénation importante du milieu liquide entraîne l'oxydation d'une partie de  $\text{Cu}^{1+}$  présent dans le milieu SS et initialement chélaté par le BCS au cours de la culture, ce qui entrainerait sa libération. À l'inverse, sur boîte, l'oxygénation est limitée et le chélateur semble avoir un impact plus important. Néanmoins, comme il est possible de le voir sur la figure 63, le mutant de délétion pour *BfrG* ne présente pas de phénotype différent de la souche sauvage (BPSM).

Aucune des expérimentations sur la croissance en conditions de carence n'a permis de mettre en évidence un phénotype chez le mutant de délétion de *BfrG*. Nous nous sommes donc tournés vers d'autres méthodes de caractérisation de cette protéine.

#### 2.4.8.2. Mise au point du dosage de cuivre intracellulaire

En collaboration avec le Dr. Gabriel Billon de l'Université de Lille 1, nous avons mis en place un protocole de quantification absolue du cuivre par ICP-AES et ICP-MS. Dans un premier temps nous avons utilisé cette technologie pour établir les concentrations en cuivre présents dans nos différents milieux de cultures.

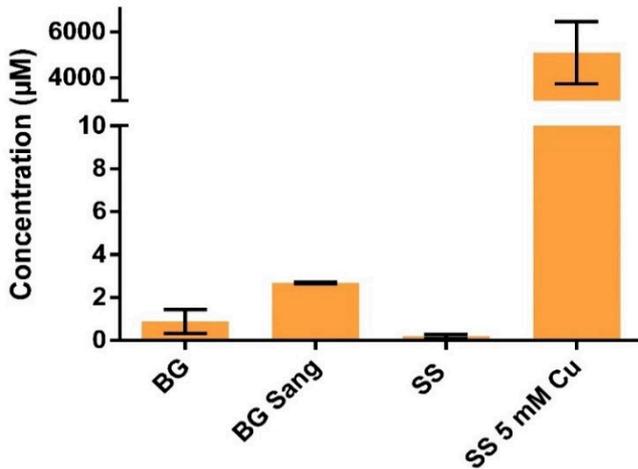


Figure 64: Quantification de cuivre par ICP-AES dans les différents milieux de cultures. BG = Bordet Gengou ; BG+sang = Bordet-Gengou supplémenté avec 10% de sang de mouton défibriné ; SS = Stainer-Scholte ; SS 5mM Cu = milieu Stainer Scholte supplémenté avec 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Les barres verticales sont des déviations standard.

Nous avons pu voir que le milieu solide BG+sang sur lequel les bactéries sont cultivées avant chaque expérience est relativement riche en cuivre (environ 3 µM). Il est probable que ce milieu permette à la bactérie de faire des « réserves » permettant sa croissance en milieu liquide malgré l'absence de cuivre dû au chélateur. En revanche, le milieu SS semble assez pauvre en cuivre (environ 0,5 µM). Nous avons également rajouté un témoin, un milieu SS supplémenté de 5 mM de cuivre.

Par la suite, nous avons mis au point un protocole de dosage de cuivre intracellulaire. Dans ce protocole les bactéries sont cultivées en milieu liquide dans les différentes conditions à tester puis sont centrifugées et lavées avec une solution contenant de l'EDTA afin d'éliminer les traces de métaux adsorbés sur la face extérieure de la membrane externe. Les cellules sont lysées et les métaux mis en solution grâce à de l'acide nitrique. Les lysats obtenus avec l'acide nitrique sont ensuite analysés par ICP-AES.

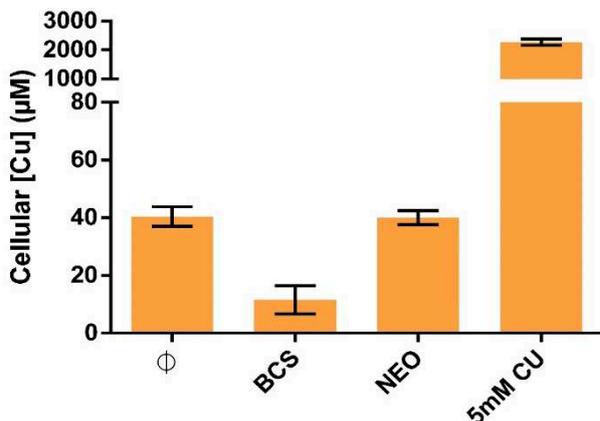
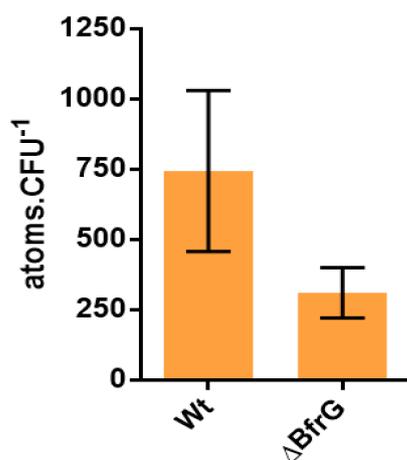


Figure 65: Dosage intracellulaire du cuivre par ICP-AES dans différentes conditions de cultures. Le nombre d'atomes de cuivre est rapporté au volume théorique de la bactérie pour obtenir la concentration intracellulaire. Les barres verticales sont des déviations standard.

On voit sur la figure 65 que le cuivre s'accumule à forte concentration dans les bactéries cultivées avec 5 mM de Cu. Outre la chélation du cuivre dans le cytoplasme notamment par CopZ et le glutathion, et possiblement dans le périplasma par du glutathion et d'autres systèmes, il est possible que les ions cuivre liés aux groupements chargés négativement des LOS ne soient pas extraits de façon quantitative par le traitement à l'EDTA. On voit aussi que le BCS diminue la concentration intracellulaire en Cu, puisqu'il le chélate dans le milieu. En revanche, la néocuproïne peut traverser les membranes. Le cuivre se retrouve donc dans les bactéries à une concentration similaire à celle mesurée dans les bactéries non traitées, même s'il n'est pas biodisponible.

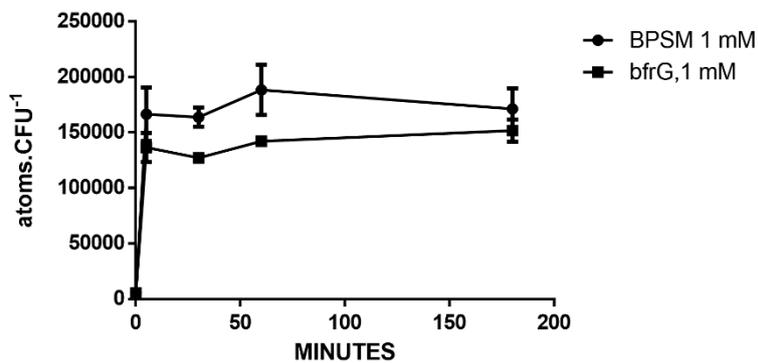


*Figure 66: Dosage intracellulaire du cuivre par ICP-AES en conditions de culture normales. Wt correspond à la bactérie sauvage BPSM. Les données de chaque souche contiennent 5 réplicats. Les barres verticales sont des déviations standard.*

Nous avons également mesuré la concentration en cuivre de nombreux mutants pour différentes protéines comme l'ATPase CopA, la multicopper oxidase PcoA et son système d'extrusion PcoB, les chaperonnes CopI, CopZ, et CusF, ou encore l'azurine, une cuproprotéine très abondante qui pourrait servir de réserve de cuivre dans le périplasma. Aucune de ces analyses n'a mis en évidence de différences significatives, quels que soient les conditions de cultures (carence, excès, déplétion du glutathion / cystéines) ou les stades de croissance (début ou milieu de phase exponentielle, phase stationnaire). Le seul mutant présentant une différence a été le mutant de délétion pour le transporteur TonB-dépendant BfrG.

La figure 66 montre que le mutant de délétion de bfrG présente un déficit intracellulaire de cuivre. Néanmoins, cette analyse est à relativiser car il n'a pas été possible de reproduire ces données. En regardant dans les détails les données de cette analyse et en les comparant à d'autres, il semblerait que deux des 5 réplicats faits avec la bactérie sauvage soient anormalement élevés. Il est donc probable que dans nos conditions de culture ce transporteur n'induit pas une différence de concentration en cuivre suffisante pour être mesurée.

Par conséquent nous avons pris le parti inverse. Il apparait que bfrG est très finement régulé et est fortement réprimé en présence d'un excès de cuivre (voir section régulation). D'après nos connaissances, *B. pertussis* est soumise à un excès de cuivre dans une unique situation : la phagocytose. Il n'est donc pas impossible de penser que BfrG soit utile lorsque la bactérie est à la surface des épithélia où le cuivre libre se fait rare ; en revanche elle doit être réprimée lors de la phagocytose afin de bloquer l'entrée du cuivre dans la bactérie. Nous avons donc appliqué un excès important de cuivre aux deux bactéries (mutante et sauvage) et mesuré la vitesse d'entrée du cuivre. En toute logique ce dernier devrait rentrer plus lentement dans le cas du mutant.



*Figure 67: Dosage du cuivre intracellulaire au cours d'un stress cuivrique de 1 mM de CuSO<sub>4</sub>. Les barres verticales sont des déviations standard.*

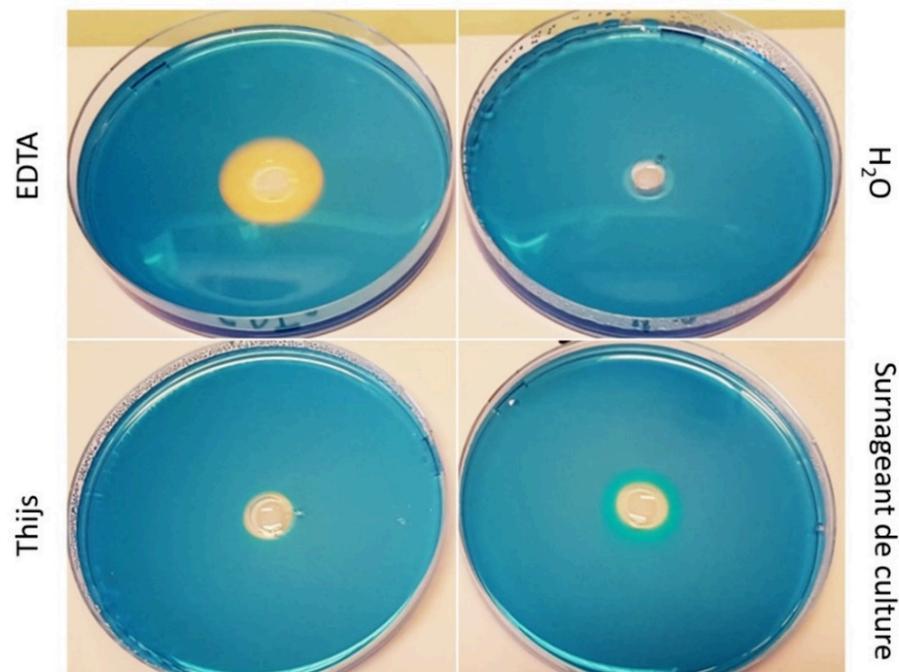
La figure 67 met en évidence un certain retard d'entrée du cuivre dans la bactérie mutante. Ces données constituent une preuve indirecte du rôle d'importation du cuivre de BfrG. Depuis l'obtention de ces données, la technique de préparation des bactéries pour l'ICP-AES a été retravaillée et améliorée par Gauthier Roy, le doctorant ayant pris la suite de la caractérisation de cette protéine. Il a pu obtenir des résultats similaires.

Il est néanmoins important d'être prudent sur ces données. Il n'y a pas de différence significative même si ces observations sont reproductibles. De plus, on ne peut pas exclure la possibilité que BfrG soit un importateur de fer qui importe accidentellement du cuivre, expliquant sa régulation négative en présence d'un excès de cuivre.

### 2.4.8.3. Recherche d'un chalcophore

Les transporteurs TonB-dépendants n'importent généralement pas les métaux "nus" mais dans la plupart des cas chélatés par des sidérophores. Néanmoins, certains de ces transporteurs lient des protéines de transport du fer (ex., la transferrine) et en extraient le métal pour le transporter. Comme le cas des sidérophores est le plus commun, il est raisonnable de penser que BfrG pourrait importer du cuivre avec un chalcophore.

Par conséquent, nous avons tenté d'identifier un éventuel chalcophore. Pour cela, nous avons eu recours à un test de détection des chalcophores utilisant le chromazurol S (Yoon et al., 2010). Ce test consiste en la formation d'un complexe instable entre le chromazurol S et le cuivre. Ce complexe assez labile présente la particularité d'être bleu (bien plus bleu que le cuivre seul). En présence d'un chalcophore, le cuivre est déplacé de ce complexe, la couleur bleue disparaît et le chromazurol S reprend sa couleur jaune. Dans les tests habituels la moitié d'une boîte de pétri est réservée au milieu de culture solide sur lequel la bactérie est cultivée et l'autre moitié est composée de milieu contenant le complexe. Les bactéries secrètent le chalcophore qui diffuse dans la gélose vers l'autre moitié de la boîte et fait reculer le front bleu.



*Figure 68 : Test Chromazurol S de détection des chalcophores. EDTA constitue le témoin positif. L'eau et le milieu Thijs seuls sont deux témoins négatifs. Le dernier puits contient un surnageant de culture faite dans du milieu Thijs jusqu'à DO 2.*

Dans notre cas, nous avons été confrontés à un problème majeur, la compatibilité de nos milieux avec le test. En effet le milieu solide BG+Sang contient des molécules venant autant du sang que de la pomme de terre, qui déplacent le cuivre du complexe. Nous avons également tenté ce test en utilisant les milieux liquides solidifiés (SS ou Thijs) par de l'agarose. Malheureusement, nos milieux liquides sont très réducteurs, or le complexe Chromazurol S-cuivre est bleu uniquement en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ . Après de nombreux essais, nous avons pu modifier le test pour l'appliquer à un surnageant de culture.

Le complexe est dilué dans de l'eau mQ et de l'agarose, le tout coulé dans des boîtes de pétri. Un puits central est creusé pouvant accueillir l'échantillon à tester. Cette technique permet de déposer un surnageant de culture. Le faible volume de l'échantillon à tester et la lenteur de diffusion permettent aux réducteurs initialement présents dans le milieu de culture de s'oxyder assez rapidement, ce qui doit laisser la possibilité au chalcophore de diffuser plus lentement et de déplacer le cuivre. Dans la figure 68, il est possible d'observer un halo jaunâtre autour du puits contenant le surnageant de culture, contrairement aux différents témoins. Ce résultat suggère que le surnageant de culture contient un composé peu abondant mais absent du milieu de culture neuf, qui pourrait déplacer le cuivre très lentement. Il est peu probable qu'il s'agisse d'un chalcophore, mais ce pourrait être une protéine ou autre molécule relarguée en petite quantité par de la lyse cellulaire au cours de la culture liquide. *B. pertussis* pourrait donc plutôt importer le cuivre à partir de protéines de l'hôte ou de petits composés produits par d'autres bactéries, comme elle peut importer du fer via l'entérobactine, qu'elle ne produit pas elle-même mais pour lequel elle possède un transporteur TonB-dépendant.

Nous avons tout de même tenté de chercher un éventuel chalcophore par spectrométrie de masse sur surnageants de culture, sur cellules entières et sur extraits de périplasme. Malheureusement ces études n'ont pas été finalisées et nous avons choisi de nous concentrer sur les mécanismes de défense.

#### 2.4.8.4. Sensibilité de la régulation BfrG

En étudiant la régulation de *bp1728* nous avons constaté que là cette dernière se déclenche à un seuil de 5  $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture. Nous avons donc souhaité étudier la régulation de *bfrG* de la même manière. Pour cela, nous avons exposé la bactérie à différentes concentrations de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) durant toute sa croissance (jusqu'à  $\text{DO} = 2$ ) avant d'arrêter la culture et d'extraire les ARN pour qRT-PCR. Nous avons déjà pu voir par les RNAseq et les qRT-PCR que *bfrG* est rapidement et fortement réprimé.

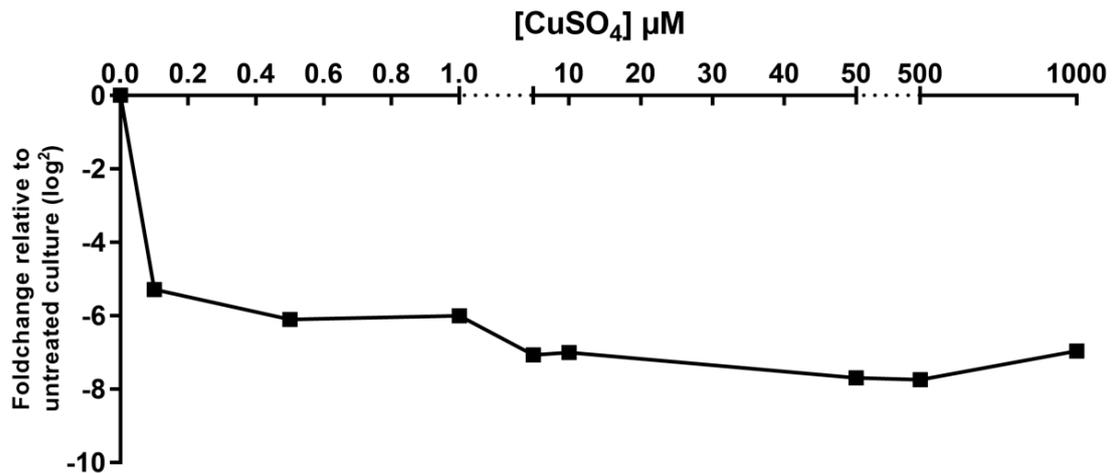


Figure 69 : qRT-PCR de *bfrG* en fonction de la concentration en cuivre ajouté au milieu de culture. Les données sont normalisées grâce au gène de ménage *bp3416*.

Au travers de ces données, il est possible de voir que la régulation par le cuivre de *bfrG* est extrêmement sensible. La répression est quasi maximale dès 0.1  $\mu\text{M}$ . Néanmoins, il est probable que cette régulation très sensible soit liée au fait que la bactérie a été exposée au cuivre pendant plus de 16 heures. Nous pouvons supposer qu'une si faible quantité de cuivre ne déclencherait pas cette régulation en quelques minutes. Ici, le métal a eu le temps de rentrer dans la bactérie de manière aspécifique, complexé à des molécules comme le glutathion par exemple. *B. pertussis* ne possédant pas de système d'extrusion actif, il est probable que cette faible quantité de cuivre s'accumule progressivement dans la cellule jusqu'à déclencher la régulation.

## 2.4.9. Colonisation animale et réponse immunitaire

Après les caractérisations *in vitro* et *ex vivo*, nous avons souhaité pousser l'étude du rôle des gènes identifiés dans un modèle d'infection animale. Il est possible de voir les effets de la délétion de l'opéron *bp1727-1728-1729* lors d'une colonisation animale comme montré dans l'article ci-dessus. Nous avons également cherché à voir si le transporteur BfrG était utile à la colonisation animale. En effet, le cuivre libre étant quasiment absent des muqueuses, il est possible que le transporteur BfrG soit utile à la surface de ces muqueuses si la bactérie ressent une carence, tandis qu'il serait réprimé au contact du cuivre en excès utilisé par les macrophages pour déclencher une toxicité.

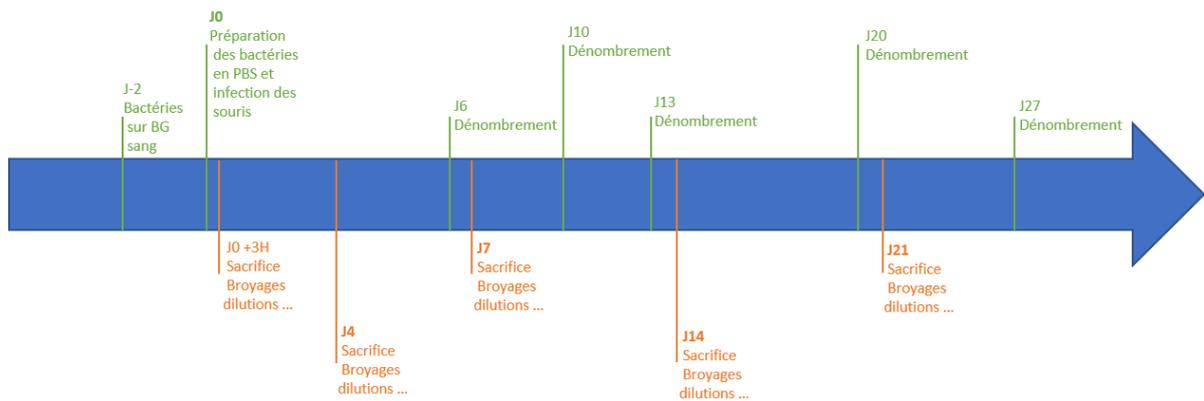


Figure 70 : Calendrier de la colonisation animale réalisée dans le cadre de la caractérisation du rôle *in vivo* des gènes *bp1727-1728-1729* et *bfrG*.

Dans le cas de l'étude du rôle *in vitro* de BfrG, nous avons procédé à une colonisation animale standard similaire à celle décrite dans l'article. Le calendrier du suivi est décrit dans la figure 70. La colonisation des cavités nasales et des poumons a été suivie au cours du temps.

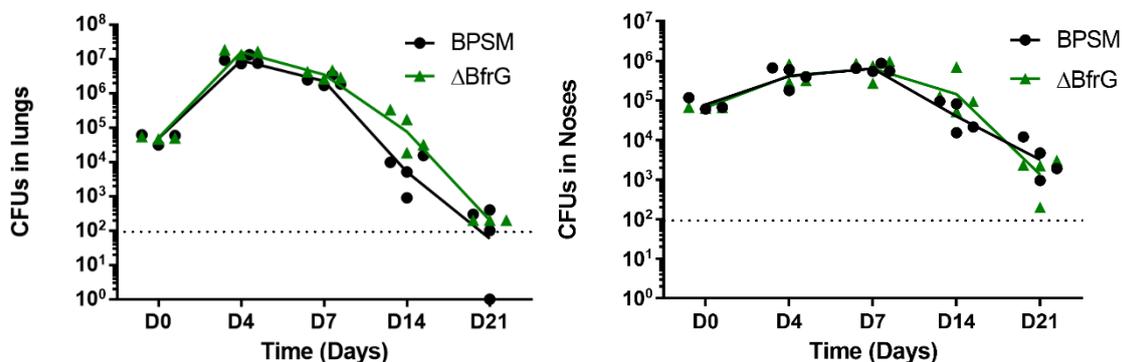
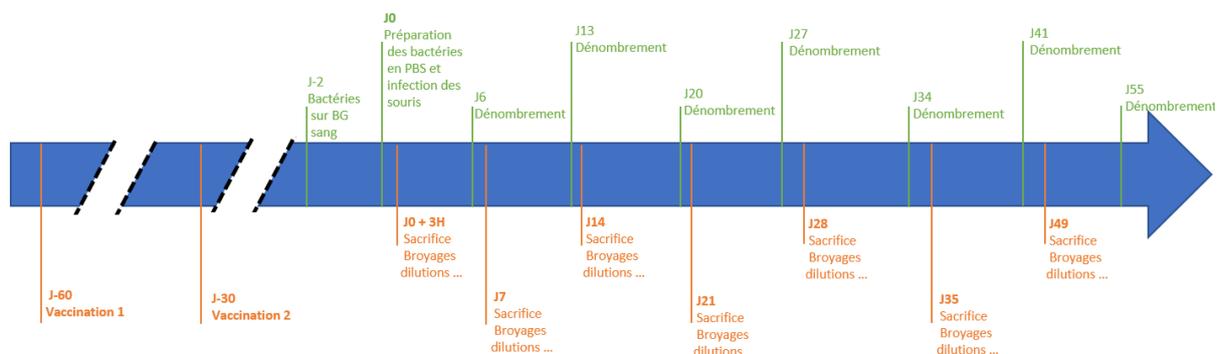


Figure 71 : Dénombrement de bactéries présentes dans les différents organes. BPSM est la souche sauvage et  $\Delta$ BfrG est le mutant de délétion pour le transporteur TonB-dépendant. Le graphique de gauche représente la colonisation des poumons tandis que le graphique de droite représente la colonisation des fosses nasales. Chaque point représente les bactéries présentes dans un organe issu d'une souris. Les lignes joignent les moyennes géométriques des répliques biologiques.

Malheureusement, avec ce protocole nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un défaut de survie du mutant pour bfrG.

Comme il est possible de le voir dans l'article, nous avons mis en évidence un défaut de persistance dans les temps tardifs de la courbe de colonisation du mutant de délétion pour l'opéron de trois gènes. Néanmoins l'apparition de ce phénotype étant très tardif, il n'a pas été possible de confirmer ces données plus loin dans le temps, car la charge bactérienne après 21 jours était proche de notre limite de détection.

En nous basant sur les données obtenues au laboratoire, nous avons tenté d'appliquer un nouveau protocole pour voir plus nettement les différences potentielles. Dans le cadre des études sur la protection induite par les différents types de vaccins, il a été montré au laboratoire que le vaccin aP (acellulaire) protège contre la colonisation pulmonaire mais pas contre la colonisation nasale. En revanche, ce vaccin accroît la persistance des bactéries dans les cavités nasales au-delà de 21 jours. Nous avons donc soumis des souris Balb/c à un protocole de vaccination standard à deux injections. Comme nous avons observé un défaut de persistance du mutant pour l'opéron uniquement dans les temps tardifs de l'infection avec le protocole standard, nous espérons observer l'écart entre les souches sauvage et mutante se creuser au cours du temps avec ce protocole modifié. Nous espérons également voir un écart se former dans le cas du mutant de délétion pour bfrG. Ce protocole a donc suivi le calendrier présenté en figure 72.



*Figure 72 : Calendrier de la colonisation animale réalisé dans un modèle de souris vacciné avec le vaccin aP de manière à prolonger le portage nasal.*

Au terme de cette expérimentation animale de 4 mois, nous n'avons malheureusement pas été en mesure de montrer un défaut des deux mutants testés. Il est possible de voir sur la figure 73 que les trois souches bactériennes suivent la même cinétique de colonisation dans le nez. Il est à noter que seule la colonisation des cavités nasales a été suivie, puisque le vaccin aP protège les souris contre la colonisation de la partie basse du tractus respiratoire par les bactéries.

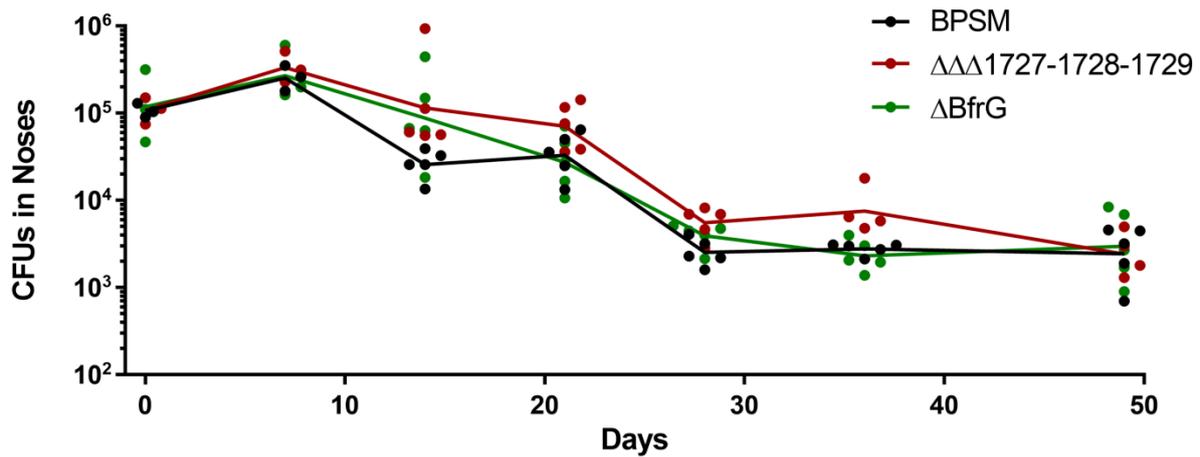


Figure 73 : Dénombrement de bactéries présentes dans les cavités nasales. BPSM est la souche sauvage,  $\Delta BfrG$  est le mutant de délétion pour le transporteur TonB-dépendant et  $\Delta\Delta\Delta 1727-1728-1729$  est le mutant de délétion pour l'opéron CopZ. Chaque point représente les bactéries présentes dans un organe issu d'une souris. Les lignes joignent les moyennes géométriques des répliques biologiques.

Il semble étonnant que sur une colonisation de 21 jours on observe un écart significatif tandis que sur une colonisation de 49 jours, cet écart ne soit plus visible. Ce sont les travaux récents de Violaine Dubois (post doctorante du laboratoire) qui ont apporté, quelque mois après, l'explication de ces observations. En effet, lors de l'étude des réponses immunitaires aux différents vaccins, il est apparu que le vaccin aP oriente la réponse immunitaire vers la voie Th2 qui est le volet humoral de l'immunité. De plus ce vaccin inhibe le recrutement des cellules phagocytaires. Or, nous avons vu précédemment que l'opéron de trois gènes est utile dans le cas de la survie à la phagocytose. L'inhibition du recrutement cellulaire par le vaccin aP est certainement impliquée dans la persistance de la bactérie mais également dans l'absence de phénotype de nos mutants. À l'inverse, nous savons que l'infection naturelle induit une réponse Th1 et Th17, responsable du recrutement de cellules phagocytaires.

A posteriori, il apparaît que notre premier modèle de colonisation était plus pertinent dans notre étude. Nous avons donc choisi de conserver ces résultats dans l'article en précisant que l'expérience n'a été réalisée qu'une fois dans ces conditions.

### 3. Travaux issus de l'encadrement de Stagiaires

Au cours de ces années de doctorat, j'ai eu l'occasion de superviser des stagiaires qui ont travaillé sur différents sujets en lien avec mes problématiques de thèse. La plupart d'entre eux ont réalisé des mutants, comme par exemple des mutants de tous les régulateurs de type MerR.

Dans cette section nous nous pencherons plus particulièrement sur une partie du travail de Blanche Daunou.

Comme il est possible de le voir dans l'article : « Streamlining of defenses against copper makes host-restricted pathogen reliant on custom-made operon », nous avons construit un plasmide permettant de suivre l'activation du promoteur de l'opéron de trois gènes au sein des macrophages en utilisant le promoteur de *bp1727* devant un gène rapporteur. Lors des tests *in vitro*, avant la mise en place de l'infection cellulaire, nous avons pu voir que la présence d'une faible quantité de cuivre dans le milieu de culture entraîne une surexpression majeure de la protéine rapportrice mRFP1. Cette production est telle qu'elle est visible à l'œil nu, les bactéries devenant roses.



*Figure 74 : Cultures de *B. pertussis* portant le plasmide rapporteur avec mRFP1 sous le contrôle du promoteur de *bp1727-28-29*. Les cultures ont été réalisées en milieu SS supplémenté en BCS (à droite) ou en sulfate de cuivre (à gauche). Les culots de bactéries après centrifugation sont présentés.*

Il apparaît donc que ce plasmide d'expression inductible est fonctionnel chez *B. pertussis*. Actuellement il n'existe pas de plasmide inductible autre qu'utilisant la régulation de la virulence chez *B. pertussis*. Nous avons donc eu l'idée d'optimiser ce plasmide pour l'utiliser comme un outil moléculaire pour l'étude des Bordetelles.

C'est dans ce contexte que Blanche Daunou est intervenue. Lors de son stage elle a pu modifier ce vecteur en ajoutant des sites de restriction, en enlevant le gène rapporteur pour le remplacer par celui d'une protéine test de *B. pertussis*, FmtB, avec ses propres signaux de traduction (site putatif de liaison du ribosome ou RBS) ou ceux de *bp1727*. FmtB est utilisée comme contrôle étant donné que nous disposons d'anticorps pour suivre la production de cette protéine, ainsi que d'une souche dont le gène *fmtB* est délété.

Enfin, elle a ajouté le gène *bp1726* du régulateur CueR de *B. pertussis* avec son propre promoteur en vue de pouvoir utiliser ce vecteur chez d'autres bactéries que les Bordetelles.

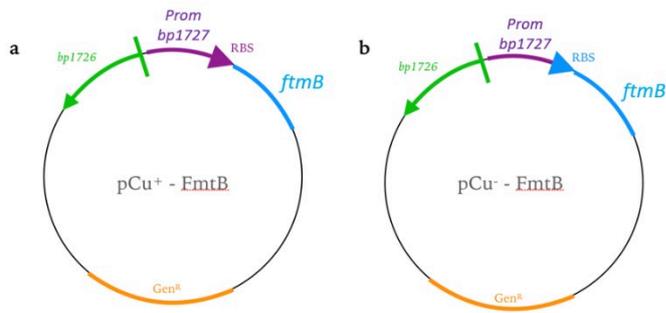


Figure 76 : Représentation schématique des plasmides pCu- et pCu+. Prom bp1727 correspond au promoteur de bp1727. La différence entre les deux plasmides est le RBS : le gène à exprimer a été cloné avec son RBS putatif dans le plasmide de droite, ou avec celui de bp1727 dans le plasmide de gauche.

Dans un premier temps ces plasmides ont été testés dans la souche de laboratoire de *B. pertussis* délétée de *ftmB*, dans différentes conditions de culture, et la production de FtmB a été détectée par immunoblotting.

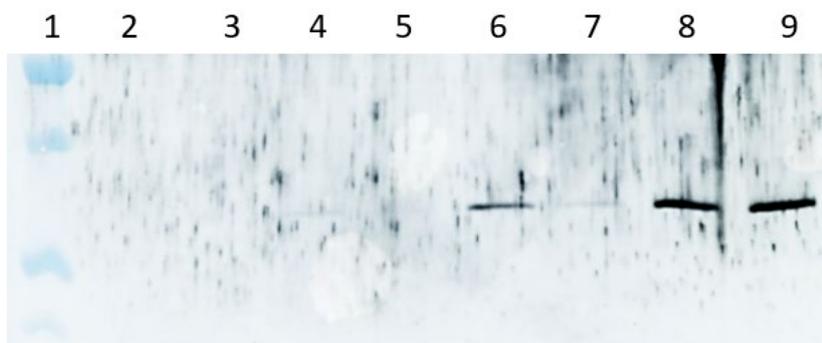


Figure 75 : Western blot de détection de la protéine FtmB dans un lysat de *B. pertussis* cultivé dans différentes conditions. La colonne 1 contient le marqueur de taille, les pistes 2 à 5 contiennent des lysats issus des bactéries contenant le plasmide pCu-. Les pistes de 6 à 9 contiennent des lysats issus des bactéries contenant le plasmide pCu+. Concernant les conditions de cultures, les bactéries analysées dans les pistes 2 et 6 n'ont pas reçu de traitement particulier, celles des pistes 3 et 7 ont été traitées au BCS, celles des pistes 4 et 8 ont reçu du cuivre (50  $\mu$ M), enfin celles des pistes 5 et 9 ont d'abord été traitées avec du BCS (50 $\mu$ M) puis 50  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  ont été ajoutés pour induire l'expression durant 3 heures.

Au travers de ces résultats (figure 76), il est possible de voir que le plasmide utilisant le RBS natif du gène *ftmB* n'est pas fonctionnel. En revanche, le second plasmide pCu+ fonctionne. On peut voir que ce plasmide présente une fuite d'expression, il est néanmoins possible de réprimer cette fuite d'expression grâce à un chélateur de cuivre dans le milieu. Et encore plus important, il est possible d'induire l'expression avec du cuivre même en présence de ce chélateur.

Ce plasmide fonctionne chez *B. pertussis* mais les différents tests menés chez *E. coli* n'ont pas montré d'expression du gène *ftmB*. Nous avons déjà vu, avec le plasmide initial, que CueR d'*E. coli* n'induisait pas l'expression du gène rapporteur mRFP1 via le promoteur de bp1727. C'est pour cette raison que nous avons rajouté le régulateur CueR de *B. pertussis*. Néanmoins, il apparaît que le gène *cueR* de *B. pertussis* n'est pas exprimé à partir du plasmide chez *E. coli*, empêchant le fonctionnement du plasmide dans cette bactérie.



## Discussion et Perspectives

Les travaux menés durant cette thèse visaient à caractériser l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*. Le cuivre étant un métal à la fois toxique et essentiel, son homéostasie fait l'objet d'un intérêt croissant dans la relation hôte-pathogène, en particulier chez les bactéries. Il existe en effet des modèles bactériens pour lesquels l'homéostasie de ce métal est relativement bien comprise. Chez les organismes dénués de pouvoir pathogène soumis à des stress métalliques environnementaux extrêmes, comme *Cupriavidus metallidurans*, qui vit dans les sols pollués par des métaux lourds, l'homéostasie consiste essentiellement à déployer de multiples systèmes de résistance. *E. coli* demeure également un des modèles les plus étudiés. Parmi les pathogènes dont les stratégies d'homéostasie ont été décrites, on trouve *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila*, etc. Ces quatre bactéries peuvent être séparées en deux catégories. *P. aeruginosa* et *S. enterica* sont certes des bactéries pathogènes mais elles possèdent la capacité de vivre dans l'environnement. En effet, elles ne se transmettent pas directement d'humain à humain mais infectent certains individus à partir de l'environnement. Cet état de fait implique que ces bactéries peuvent être exposées à des stress en lien avec le cuivre (excès ou carence) qui sont différents dans leur hôte et dans l'environnement. Dans le cas de *M. tuberculosis* et *L. pneumophila*, il se trouve que ces bactéries sont très dépendantes de leurs hôtes. *M. tuberculosis* est spécifique de l'homme tandis que si *L. pneumophila* peut infecter l'homme, son hôte privilégié demeure l'amibe. La particularité de ces deux bactéries est donc que ce sont des pathogènes intracellulaires. Elles ne ciblent pas n'importe quelles cellules eucaryotes, puisqu'elles se sont spécialisées dans l'invasion des cellules phagocytaires comme les macrophages. Lorsqu'on analyse les connaissances sur l'homéostasie du cuivre des bactéries en fonction de leur niche écologique, on identifie les bactéries environnementales ou les bactéries particulièrement soumises à la pression induite par les macrophages ou les amibes, puisque ces cellules utilisent les mêmes stratégies pour tuer des bactéries.

Dans la méta-analyse présentée précédemment, nous avons pu, esquisser une trajectoire évolutive concernant les mécanismes d'homéostasie du cuivre en fonction des styles de vie bactériens. Au travers de 119 espèces de beta protéobactéries, il nous a été possible de compiler les différents sets de gènes présents chez ces bactéries et de les mettre en lien avec leur style de vie. Le panel de bactéries représentait diverses niches écologiques. Nous avons choisi de nous concentrer sur l'évolution en direction d'une dépendance croissante à un hôte. Il semble que l'homéostasie du cuivre soit un élément suffisamment critique pour faire l'objet d'une pression de sélection assez intense aboutissant à des profils qui dépendent du style de vie. En effet, les bactéries environnementales, tout comme les bactéries opportunistes, possèdent un arsenal très diversifié pour utiliser mais surtout pour

détoxifier le cuivre. Ces organismes sont soumis à des stress très différents et ont donc acquis de nombreux systèmes de défense. On observe aussi chez certaines bactéries la présence d'un nombre important de paralogues des systèmes de défense trouvés de façon plus restreinte chez d'autres espèces. Cette surabondance semble être le signe d'un mode de vie environnemental ou opportuniste qui nécessite une grande capacité d'adaptation à des situations parfois contrastées. À l'inverse, les pathogènes animaux présentent en moyenne un profil de protéines lié à l'homéostasie du cuivre moins diversifié et redondant. Il est probable que cette évolution soit liée au fait que ces bactéries ne subissent d'excès de cuivre que lors de contacts avec des cellules de l'immunité innée, lors de situations d'inflammation déclenchées par l'infection. Contrairement aux organismes environnementaux où la proportion de protéines utilisant le cuivre est comparable à celle des protéines liées à son homéostasie, les pathogènes stricts semblent maintenir les sets de gènes utilisateurs de cuivre au détriment de ceux de l'homéostasie. Celle-ci se limitant à la défense contre le cuivre des cellules phagocytaires, les sets de gènes impliqués dans la défense se sont réduits, probablement à des fins d'économie d'énergie. Aux étapes évolutives suivantes, qui mènent aux commensaux et symbiotes, on trouve toujours des proportions de cuproprotéines aussi élevées que dans les autres bactéries. En revanche celles liées à l'homéostasie sont quasiment absentes du génome. Cette observation peut être expliquée par le fait que ces organismes possèdent toujours un métabolisme complexe, mais n'induisent que peu, voire pas du tout, de réponse immunitaire. N'étant pas soumis au risque d'excès de cuivre lié aux aléas de l'environnement, ils ont éliminé de leur génome les protéines liées à l'homéostasie pour économiser de l'énergie et des ressources. Enfin, chez les endosymbiotes, les mécanismes de défense contre le cuivre sont inexistant, inutiles quand l'hôte ne cherche pas à l'utiliser contre la bactérie. De plus, ces organismes présentent également une diminution importante des chaperonnes et utilisateurs du cuivre car les voies métaboliques utilisant ces protéines sont majoritairement assurées par la cellule hôte. Il n'est pas utile de conserver des systèmes nécessitant l'importation du cuivre, étant donné que l'hôte va assurer les voies métaboliques ayant besoin de cuivre. De plus utiliser le cuivre représente un danger potentiel d'autant plus important que la bactérie ne possède plus de systèmes de détoxification.

Au travers de ces travaux, il est possible de voir qu'au cours de l'évolution vers la dépendance à un hôte eucaryote non végétal, la pression de sélection est très forte sur les gènes codant des protéines liées au cuivre.

C'est ici qu'apparaît l'intérêt de l'étude de l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*. Les données précédemment obtenues ne sont que des hypothèses et il apparaît intéressant de confronter ces hypothèses à un modèle en cours d'évolution. *B. pertussis* est une bactérie pathogène propre à l'homme et qui s'est séparée de l'espèce *B. bronchiseptica* très récemment à l'échelle évolutive. Ces deux bactéries sont extrêmement proches en ce qui concerne leurs génomes, mais celui *B. bronchiseptica* contient un million de paires de bases en plus que celui de *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* est, certes, une bactérie pathogène, mais

elle demeure capable de se développer dans l'environnement extérieur indépendamment d'un hôte. À l'inverse, *B. pertussis* est totalement dépendante de son hôte. Cela en fait un modèle d'autant plus intéressant que sa niche écologique n'est pas juste restreinte à l'humain mais spécifiquement à la surface de l'épithélium de l'arbre respiratoire supérieur. Contrairement à *B. bronchiseptica*, qui est capable de résister à la phagocytose, *B. pertussis* n'est que très peu capable de survivre à l'intérieur des cellules de son hôte et encore moins dans les cellules phagocytaires. Au contraire, l'évolution a doté *B. pertussis* d'une myriade de mécanismes lui permettant d'échapper à l'immunité cellulaire déclenchée par l'hôte, et notamment des capacités à induire une réponse anti-inflammatoire. Il est donc envisageable que *B. pertussis* soit en train d'évoluer vers la commensalité en inhibant la réponse immunitaire de l'hôte à son encontre. Néanmoins *B. pertussis* ayant évolué récemment dans sa niche environnementale actuelle, elle est encore extrêmement dépendante de ces toxines pour persister et se transmettre. Or ces toxines ont, certes une capacité immunomodulatrice mais demeurent malgré tout immunogènes. Le principal frein à l'évolution de *B. pertussis* vers le commensalisme est sa méthode de propagation. En effet, cette bactérie est dépendante de la toux pour se propager, or ce sont ces symptômes respiratoires qui sont responsables des morts imputés à la coqueluche.

À partir de ces informations et des hypothèses émises précédemment, *B. pertussis* devrait présenter un panel de systèmes de défense extrêmement pauvre. Pourtant, les gènes des protéines de l'homéostasie qu'elle possède ne sont pas différents de ceux présents chez sa cousine environnementale, *B. bronchiseptica*. Les analyses transcriptomiques des deux souches ont néanmoins montré ce qui n'était pas visible uniquement en analysant le génome. Plusieurs des systèmes de défense induits chez *B. bronchiseptica* par le stress lié au cuivre sont complètement inactifs chez *B. pertussis*. Cette bactérie a évolué en délétant des pans entiers de son génome, mais peut également inactiver des gènes grâce à l'usage de séquences d'insertion. Et c'est le cas pour l'homéostasie du cuivre : tous les systèmes décrits chez d'autres organismes ont fait l'objet d'inactivation par des séquences d'insertion. Cette évolution supporte fortement l'hypothèse que les systèmes de l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis* sont en cours d'épuration génomique. La bactérie n'étant plus soumise aux stress présents dans l'environnement et ayant développé un important arsenal permettant l'échappement aux cellules phagocytaires, les mécanismes de l'homéostasie du cuivre très énergivores comme les ATPases et les RND ou encore les multicopper oxydases ne sont plus indispensables à la survie bactérienne.

Pourtant, les analyses transcriptomiques ont mis en évidence l'existence d'un dernier système encore régulé. Les gènes le composant ne sont pas à proprement parler un système de défense contre le cuivre, mais plutôt impliqués dans la tolérance. Ce dernier se compose d'une chaperonne à cuivre CopZ et de deux protéines impliquées dans la détoxification du stress oxydant, une peroxydase glutathion-dépendante et une glutathion réductase. CopZ est généralement impliquée dans l'adressage du cuivre à l'ATPase d'export CopA, or ici

l'ATPase n'est probablement plus fonctionnelle. Il est donc probable que la chaperonne CopZ joue un rôle de détoxification passive en chélatant le cuivre libre. Les deux autres gènes ne sont pas décrits comme impliqués dans la tolérance aux métaux, mais c'est ce qui constitue l'intérêt de ce système. En effet, les deux gènes de détoxification du stress oxydant sont toujours sous la régulation d'OxyR, réagissant aux peroxydes. Cependant, le fait d'avoir été raboutés au gène codant la protéine CopZ leur permet de bénéficier d'une régulation beaucoup plus sensible et dynamique via le cuivre. De plus, les quantités de cuivre nécessaires à l'induction de ce système n'étant rencontrées que dans le phagosome des macrophages, ce système est très spécifique d'une situation donnée, déclenchant la production de ces protéines uniquement lors de ce stress et donc permettant à la bactérie d'économiser de l'énergie. À l'inverse, en dehors de ces cellules le cuivre se faisant rare, le système est réprimé. Ainsi il n'y a pas de perte d'énergie par la synthèse de protéines non essentielles lors de la multiplication extracellulaire de *B. pertussis* à la surface de la muqueuse respiratoire.

La question qui demeure est, quel est l'intérêt de posséder un tel système ? En effet, nous savons que *B. pertussis* survit assez mal à la phagocytose. Alors qu'apporte un tel système ? *B. pertussis* est certes très adaptée à son hôte et possède de nombreux facteurs d'échappement au système immunitaire mais elle demeure un pathogène induisant une réaction immunitaire innée particulièrement médiée par des cellules phagocytaires. De plus, *B. pertussis* ne possède pas seulement des facteurs de virulence immuno-modulateurs, elle possède aussi plusieurs protéines ciblant les macrophages et autres cellules phagocytaires et induisant leur apoptose ou leur nécrose. Il est donc probable que ce système de trois gènes soit apparu chez un ancêtre faisant face à des cellules phagocytaires qui utilisent de façon concomitante **Stress Cuivrique** et **Stress Oxydant**. Ce système devait alors faire partie de tout un arsenal de défense dont il était un simple composant. Néanmoins, dans le cas de *B. pertussis*, il semble que les pressions de sélection aient entraîné la perte de la plupart de ces systèmes à l'exception de l'opéron CopZ. Il semble donc envisageable que ce système constitue un équilibre adéquat entre détoxification des stress liés à la phagocytose et coût énergétique pour la bactérie. Ces trois protéines permettraient donc un temps de survie dans le phagosome suffisant pour que les facteurs de virulence lysent ou neutralisent la cellule phagocytaire. Lors des expérimentations animales, nous avons pu constater que la perte de l'opéron entraîne une élimination plus rapide de la bactérie, en particulier dans les cavités nasales. Des travaux récents menés au laboratoire par Violaine Dubois montrent que le nombre de bactéries présentes dans les cellules phagocytaires avoisine 10% des bactéries totales présentes dans le naso-pharynx. Il est possible qu'en absence de l'opéron, une part plus importante de ces bactéries meure avant un potentiel relargage des survivantes de la cellule phagocytaire, rendue possible par les facteurs de virulence. Il est important de noter que chez *B. pertussis*, l'abondance de systèmes de virulence rend difficile l'observation de phénotype lors d'expériences de colonisation animale avec des souches ayant perdu un seul système. Il faut souvent cumuler les délétions pour observer un véritable défaut de colonisation. Les observations faites sur le mutant de délétion de l'opéron de trois gènes

semblent donc attester de son rôle dans la persistance de la bactérie. Néanmoins il s'agit d'un seul système parmi de nombreux autres, d'où l'absence de phénotype très marqué.

Dans tous les cas, que ce système soit utile dans le contexte étudié ou dans un autre qui nous est inconnu, il semble que cet opéron soit important. En effet, la totalité des souches de *B. pertussis* a conservé cet opéron malgré les remaniements génomiques. De plus, cette conservation ne se limite pas à *B. pertussis* mais s'étend à toutes les *Bordetella* et à une partie des *Achromobacter*. Comme cela a été présenté dans l'introduction, les bactéries environnementales sont également soumises à la prédation par des cellules phagocytaires, les amibes. Il est donc probable que cette organisation opéronique soit apparue chez des bactéries environnementales soumises à la prédation amibienne. De plus, il est fortement envisageable que ce système permette une survie à moindre coût lié au fait que le phagosome des amibes est plus permissif que celui des macrophages (German et al., 2013). En effet, de nombreuses bactéries ont acquis la capacité de survivre dans les phagosomes amibiens et même de s'y multiplier. D'ailleurs, parmi ces bactéries il y a *B. bronchiseptica*. Vu l'origine environnementale des *Bordetella*, cet opéron est vraisemblablement apparu comme mécanisme de persistance à la phagocytose amibienne à moindre coût chez un ancêtre commun aux *Bordetella* et *Achromobacter*. À ce moment évolutif, l'opéron coexistait avec de nombreux autres systèmes de défense. Les adaptations à l'amibe ont probablement servi de prémices à la résistance au système immunitaire eucaryote, dont une part importante se compose de cellules phagocytaires.

Chez *B. pertussis*, ce système semble donc être le dernier à avoir été conservé par l'évolution. Il est possible que dans l'avenir, si la réponse immunitaire induite par *B. pertussis* s'estompe pour devenir une bactérie commensale, ce système également fasse les frais de l'épuration génomique.

Dans le but d'étendre la compréhension du rôle de ce système, il serait intéressant de voir les effets de ce dernier chez une bactérie ne le possédant pas naturellement. Cette idée vient d'études menées chez *Salmonella enterica*. En effet, cette bactérie ne possède pas de transporteur RND CusABC comme la majorité des entérobactéries. Néanmoins, elle possède une adaptation originale, la chaperonne périplasmique CueP. Il s'avère que cette protéine octroie une protection contre le cuivre presque aussi efficace que le RND. Dans l'article Pontel and Soncini, 2009, un mutant *E. coli* délétant pour le système CusABC présente une sensibilité importante au cuivre en condition anaérobie, mais ce phénotype est compensé par l'expression de la protéine CueP de *Salmonella*. Il serait donc intéressant d'évaluer l'utilité de l'opéron CopZ dans un modèle hétérologue. Ce système augmenterait-il la survie d'*E. coli* ou d'une autre bactérie à la phagocytose ?

De manière plus générale, il serait intéressant d'étudier le rôle des autres systèmes d'homéostasie du cuivre des *Bordetella* dans la survie à la phagocytose. Les travaux récents du groupe de Eric Harvill ont mis en évidence les capacités de *B. bronchiseptica* à survivre et même à utiliser les amibes comme vecteur de propagation. L'opéron CopZ joue-t-il un rôle important dans l'interaction entre *B. bronchiseptica* et son hôte amibien? Et plus généralement, l'homéostasie du cuivre est-elle importante dans ce contexte? En effet *B. pertussis* ne survit pas dans les amibes, contrairement à *B. bronchiseptica*. Pourtant ces bactéries possèdent des régulateurs de virulence extrêmement proches. Les différences entre les bactéries semblent majoritairement concerner les différentes voies de biosynthèse que *B. pertussis* a considérablement réduites, étant donné qu'elle est en mesure d'utiliser les ressources produites par son hôte. Le cuivre est-il donc une des clés des différences de résistance à la phagocytose des deux bactéries? Pour vérifier cela il serait nécessaire de faire l'inventaire de tous les autres systèmes impliqués dans la survie à la phagocytose : détoxification du stress oxydant, résistance aux peptides antimicrobiens, acquisition des nutriments ...

Pour étudier cela, il serait très intéressant de produire un mutant de délétion des principaux systèmes de l'homéostasie du cuivre chez *B. bronchiseptica* et à l'inverse de restaurer le fonctionnement des systèmes inactivés chez *B. pertussis*. Ces deux mutants pourraient alors être comparés au niveau de leur résistance à la phagocytose amibienne et macrophagique.

Dans le cadre de ces travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à la défense contre le cuivre et à son rôle dans la trajectoire évolutive de *B. pertussis*. Néanmoins, l'homéostasie concerne également l'importation du cuivre. *B. pertussis* possède de nombreuses enzymes utilisant le cuivre comme cofacteur. Au cours de nos recherches, nous avons constaté que par exemple la superoxyde dismutase périplasmique à cuivre/zinc est quasi essentielle chez notre bactérie modèle. L'acquisition du cuivre est donc probablement capitale dans le mode de vie de *B. pertussis*. De plus, la disparition de la plupart des systèmes de défense et à l'inverse la présence d'un importateur putatif semblent montrer que *B. pertussis* est plus soumise à la carence qu'à l'excès de cuivre. Nos expérimentations n'ont à ce jour pas permis de mettre en évidence le rôle exact du transporteur TonB-dépendant BfrG. Il est peu probable que cette protéine importe le métal directement. De manière générale, les transporteurs de ce type importent les métaux comme le fer couplé à des sidérophores. Chez *E. coli* ou encore chez les bactéries méthanotrophes le cuivre couplé à des chalcophores (respectivement la yersiniabactine et la méthanobactine) est importé via un transporteur TonB-dépendant. Mais en dehors de son rôle biologique direct, c'est bien la régulation de cet opéron de trois gènes dont BfrG est membre qui est intrigante. En effet, nous avons pu constater que cette régulation est non seulement rapide mais également extrêmement sensible. De plus, nous n'avons pas été en mesure d'identifier de protéine impliquée dans la régulation de cet opéron. Il est donc envisageable de penser qu'il s'agit d'une régulation post-

transcriptionnelle. De telles régulations sont courantes dans le cas de l'homéostasie d'autres métaux comme le manganèse (Dambach et al., 2015). De plus, un modèle de régulation post transcriptionnelle sensible au cuivre et impliquée dans la régulation de la multicopper oxidase CutO a déjà été décrit chez *Rhodobacter capsulatus*, (Rademacher et al., 2012). Dans ce dernier cas, la présence de cuivre stabilise l'ARN messager, le préservant de la dégradation. Ici, ce pourrait être l'inverse, à savoir que la présence de cuivre entrainerait la déstabilisation du messager et sa dégradation par des RNAses. En plus de cette régulation encore assez mystérieuse, nous ne connaissons toujours pas le rôle des deux gènes adjacents à celui du transporteur. La fonction d'aucun homologue n'a été décrite à ce jour. Enfin, un dernier fait intéressant concerne le pourcentage de GC de cette région qui est particulièrement élevé, encore plus que le reste du génome.

Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi de nous concentrer sur les mécanismes de détoxification du cuivre lié à CopZ. Néanmoins, les recherches sur le transporteur BfrG ont été reprises par Gauthier Roy dans le cadre de son doctorat avec l'espoir d'élucider les différents points évoqués précédemment.

À la fin de ces travaux de thèse, de nombreuses incompréhensions persistent au sujet de l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*. Nous avons pu mettre en évidence l'inactivation de nombreux systèmes de défense mais aussi le rôle de la chaperonne CopZ permettant la passivation du cuivre, alors que cette protéine habituellement interagit plutôt avec l'ATPase CopA. L'importateur putatif est en cours d'étude. Mais qu'en est-il pour les autres chaperonnes orphelines ? En effet, le génome de *B. pertussis* comporte les gènes codant deux chaperonnes, CopD et CusF. Dans les deux cas les partenaires habituels de ces protéines que sont CopC et CusABC sont absents du génome. Pourtant, nos analyses transcriptomiques ont montré une expression de ces gènes non négligeable, même s'ils ne sont pas régulés par le cuivre. Ces protéines ont-elles un rôle similaire à celui de CopZ ? Malheureusement le temps a manqué pour caractériser ces protéines. Néanmoins nous avons réalisé un mutant de délétion du gène *bp3088* codant la protéine CusF. Nos courbes de croissance n'ont pas montré de sensibilité particulière ni à l'excès ni à la carence en cuivre. Cette protéine n'a pas l'air impliquée dans la tolérance au métal, tout du moins dans les conditions testées. Néanmoins, les travaux préliminaires de Gauthier Roy et de stagiaires ont, semble-t-il, montré un léger défaut de croissance en excès de cuivre dans le cas de mutant cumulant la perte de CusF ainsi que d'autres protéines à cuivre comme l'Azurine. L'une des hypothèses serait que CusF n'a pas un rôle direct dans la résistance au cuivre mais qu'elle fournisse le cuivre à la superoxyde dismutase périplasmique. En effet, chez *Salmonella* la protéine périplasmique CueP permet le transfert du cuivre à la superoxyde dismutase (Osman et al., 2013). Il est donc envisageable que chez *B. pertussis*, CusF ait été détournée de son usage premier.

Du côté du régulateur à cuivre que nous avons identifié, CueR, je me suis heurté à la difficulté de produire la protéine recombinante. Quelles que soient les conditions testées, le plasmide comportait des mutations spontanées ou s'avérait toxique pour *E. coli*. Lors de ces tentatives de construction de plasmides, nous avons pu observer la récurrence de certaines mutations en particulier de certaines histidines entourant le site de liaison au métal. Or, les MerR du type CueR sont déjà décrites comme ayant une affinité extrême pour le cuivre (Changela et al., 2003). Serait-il envisageable que ces histidines augmentent encore l'affinité pour le cuivre, provoquant une toxicité pour la bactérie? Ou au contraire, qu'elles diminueraient la sélectivité au cuivre et capteraient d'autres ions métalliques? Ou encore déclencheraient des régulations accidentelles chez *E. coli*? Pour tenter de faire la lumière sur ces interrogations, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe d'Oleg Melnyk du centre d'infection et d'immunité de Lille. Cette collaboration vise à obtenir CueR par synthèse chimique complète, pour pouvoir étudier ses différentes caractéristiques comme l'affinité au métal ou la liaison à l'ADN.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons donc pu mettre en évidence un système de tolérance au cuivre et ses effets toxiques, système 'fait sur mesure' pour faire face aux stress présents dans le phagosome. L'étude plus large de l'homéostasie du cuivre a permis de mettre en évidence le rôle du cuivre dans l'interface hôte-pathogène de *B. pertussis*, ainsi que la perte des systèmes de cette homéostasie au cours de la trajectoire évolutive des Bordetelles et plus généralement des Beta protéobactéries. Ces travaux ne constituent que l'initiation des recherches sur le rapport qu'entretiennent les *Bordetella* aux métaux, mais aussi plus généralement le rôle du cuivre dans la relation des bactéries à leurs hôtes.

## Annexes

### 1. Matériels et méthodes

**Test de survie au cuivre :** Les milieux solides classiques pour *B. pertussis* empêchant l'usage du cuivre, le test de survie est effectué en milieu Stainer-Scholte. Celui-ci se décline en deux fractions. La fraction A est composée de Na-L-Glutamate (11.84 g/l), L-proline (0.24 g/l), NaCl (2.5 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5 g/l),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g/l),  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20mg/l), Tris-base (1.5 g/l), KCl (0.2 g/l), Cyclodextrine (1 g/l), et des casaminoacides (10 g/l). Cette fraction doit être ajustée à pH 7.4 avant d'être autoclavée. La fraction B se compose de L-cystéine (4 g/l),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/l), acide nicotinique (0.4 g/l), acide ascorbique (40 g/l) et glutathion réduit (15 g/l). La fraction B est sensible à la chaleur et doit être filtrée. Cette fraction doit être diluée dans 100 volumes de fraction A pour constituer le milieu de culture complet SS. Dans le cas des tests de survie au cuivre, une solution stock de sulfate de cuivre est réalisée à une concentration de 62 mM (9.9 g/l) supplémentée avec du Tris-base à 100 mM (10.6 g/l en plus du Tris-base déjà présent dans la Fraction A). Cette solution stock permet de neutraliser l'effet du cuivre sur le pH. Une solution témoin est produite avec la même quantité de Tris base mais sans cuivre. Cette solution témoin doit avoir perdu son pouvoir tampon par ajout d'HCl jusqu'à un pH de 5.5. Les bactéries sont donc cultivées en milieu SS complet sans cuivre, puis à DO 1.5 les bactéries sont exposées à la quantité voulue de cuivre durant 4 heures (temps de division de *B. pertussis*) à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite diluées et déposées par 10 µl sur gélose BG+Sang.

**Croissance en excès de cuivre :** La croissance en excès de cuivre est réalisée dans du milieu SS complet supplémenté avec les quantités de cuivre voulues à partir de la solution stock décrite précédemment. Dans le cas de *B. pertussis*, une concentration de 5 mM entraîne un retard de croissance conséquent sans pâtir des effets délétères du Tris-base à haute concentration.

**Croissance en carence en cuivre :** La carence peut être réalisée en milieu Thijs (milieu moins riche) et en SS. Dans les deux cas, il est possible d'utiliser du BCS ou de la néocuproïne. Ces deux chélateurs sont spécifiques du cuivre sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ . Les deux milieux contiennent suffisamment de réducteur pour provoquer la réduction du cuivre et donc sa chélation. Nous avons choisi de réaliser nos tests de croissance en carence en cuivre en milieu SS avec 250 µM de BCS. Le chélateur doit être préparé à une concentration 100X dans la fraction B du milieu.

**Impact des sources de soufre :** Ce test se fait dans du milieu SS dépourvu de glutathion et/ou supplémenté avec 0.49 mM de cystéine pour compenser la perte de glutathion.

**Analyses transcriptomiques en carence de cuivre :** Plusieurs types d'expériences transcriptomiques ont été effectués. En micro-arrays (biopuces à ADN) les deux chélateurs

ont été étudiés. Dans le cas du BCS, la concentration utilisée était de 250  $\mu\text{M}$  tandis que dans le cas de la néocuproïne c'est une concentration de 50  $\mu\text{M}$  qui a été utilisée. Pour les expériences en microarrays, les cultures ont été arrêtées à DO 1 tandis que pour le RNAseq (fait uniquement avec le BCS) les cultures ont été arrêtées à DO 1.5-1.8. Les extractions d'ARN et la constitution des bibliothèques sont décrites dans les matériels et méthodes de l'article.

Précision : dans le cas de la carence toutes les fioles en verre doivent être lavées à l'HCl 0.1 M 12h sous agitation avant l'utilisation de manière à limiter le relargage de métaux par le verre durant la culture. Néanmoins dans le but de standardiser les expériences nous avons eu recours à des flasques en plastique.

**Carence sur milieu solide :** Tout d'abord les bactéries sont décongelées et cultivées 36 heures sur boîtes BG+Sang. Puis elles passent par une étape de pré-culture de 24h en milieu SS liquide. Ce test a lieu dans du milieu SS solidifié. La fraction A est additionnée de 14 g/l d'agarose à point de fusion bas. La fraction B est supplémentée avec les concentrations voulues de BCS. Cette fraction B doit être ajoutée uniquement lorsque la fraction A, encore liquide, atteint une température inférieure à 40°C. Une fois le mélange homogène, il est possible de le couler dans des boîtes de pétri avant solidification.

**Dosage du cuivre intracellulaire :** Les bactéries sont cultivées dans différentes conditions. La DO est mesurée et les cultures sont ajustées à même DO avec du milieu SS. Un volume de 30 ml de culture est centrifugé 15 minutes à 3500 g. Les bactéries du culot sont ensuite resuspendues dans 15 ml de solution de lavage composée de NaCl (120 mM), Tris-base (10 mM), EDTA (100  $\mu\text{M}$ ), puis à nouveau centrifugées 15 minutes à 3500g et lavées une deuxième fois avant une dernière centrifugation. Le culot est alors séché à 99°C de 3 à 16 h en fonction du culot. Ce dernier est ensuite repris dans 500  $\mu\text{l}$  d'acide nitrique (65%) puis placé deux heures à 80°C, bouchon fermé (les tubes devront être ouverts sous sorbonne pour dégazer les oxydes d'azote). Une fois le culot complètement dissous, la solution est diluée dans de l'eau milliQ jusqu'à une concentration d'acide nitrique de 2 à 6.5 % (un minimum de 2% est nécessaire pour maintenir les métaux en solution). Les échantillons doivent ensuite être filtrés sur filtre 0.22  $\mu\text{m}$  avant d'être dosés par ICP-AES ou ICP-MS.

Un protocole plus spécifique du cuivre a été développé par Gauthier Roy et moi. Il s'agit de remplacer l'EDTA par 250 $\mu\text{M}$  de BCS et 1 mM d'ascorbate dans la solution de lavage. Nous avons également mis en place une solution « Stop » permettant d'arrêter l'incorporation du cuivre par les bactéries instantanément. Elle se compose de BCS 250 mM et d'ascorbate à 1 M. Cette solution est à diluer 100 fois dans le milieu de culture des bactéries.

**Test de détection des chalcophores :** Le test de détection des chalcophores se base sur la formation d'un complexe labile entre le chromazurol S et le cuivre. Dans notre cas nous réalisons une solution 10X du complexe contenant 0.5 mM de  $\text{CuCl}_2$ , 0.525 mM de

ChromazurolS, 1.05 mM d'HDTMA. La solution 10X est diluée dans une solution d'agarose à 14 g/l en surfusion avant d'être coulée.

**Croissance en excès de cuivre sur milieu solide :** Ce test est relativement similaire à la carence en milieu solide, la différence étant que le cuivre est ajouté à la fraction A (car il est insoluble dans la B) à partir de la solution stock décrite précédemment. La fraction B doit être ajoutée à basse température dans le cas d'agar low melting. On peut aussi l'ajouter à la surface de la fraction A solidifiée mais dans ce cas il est nécessaire d'attendre plusieurs heures que les composés diffusent. De plus pour garder le pouvoir réducteur de la solution B, la diffusion doit se faire dans une atmosphère saturée en argon.

**5'RACE :** Les expériences de 5'race présentent dans les résultats complémentaires ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans l'article.

**Test de survie au stress oxydant induit par la xanthine oxidase :** Le test décrit dans les résultats complémentaires est similaire à celui décrit dans l'article. Les seules différences sont dans les concentrations d'enzymes qui sont notés sur les graphiques et les milieux dans lesquels on a réalisé le test.

**Test de quantification des ROS intracellulaires :** Les bactéries sont décongelées et cultivées 36 heures sur boîtes BG+Sang. Puis elles passent par une étape de préculture de 24h en milieu SS suivie d'une culture de 12h toujours en milieu SS. Une fois la DO désirée atteinte on ajoute 30 µg/ml de Dichlorofluorescine diacetate durant 30 minutes au milieu de culture. Les bactéries sont ensuite lavées et resuspendues dans du SS (uniquement la fraction A dénuée de pouvoir réducteur) et exposées aux différents stress. La fluorescence est mesurée au fluorimètre avec des longueurs d'ondes d'excitation de 485 nm et d'émission de 530 nm.

**Test de survie à la phagocytose par les RAW 264.7 :** Dans le cadre de ce test, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. Une fois à 80% de confluence, ces dernières sont privées de sérum (et pour certaines supplémentées en CuCl<sub>2</sub> 20 µM) durant 12 heures. Par la suite, les cellules sont détachées avec un « cell scraper », dénombrées et réparties à environ 1.8 millions par puits (plaques 6 puits). Ensuite du LPS de E. coli est ajouté à 500 µg/ml dans certains puits. En parallèle les bactéries sont cultivées sur BG+sang durant 36 heures et resuspendues dans du PBS pour la mise en contact avec les macrophages durant trente minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS, puis du milieu frais est ajouté contenant 100 µg/ml de polymixine B pour éliminer les bactéries extracellulaires (cette partie du protocole a été modifiée pour la plupart des autres expériences : voir protocole de l'article). Enfin, aux temps voulus les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec de la saponine (0.1%) de manière à récupérer les bactéries vivantes qui seront diluées et étalées sur boîte pour être dénombrées.

**Test de survie à la phagocytose par les THP<sub>1</sub>** : Dans le cas des infections de THP<sub>1</sub> réalisées dans les résultats complémentaires, les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI + SVF 10%. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du RPMI sans SVF (et certaines supplémentées en CuCl<sub>2</sub> 20 µM). 1.8 millions de cellules sont placées en plaques 6 puits. 50 ng/ml de PMA sont ajoutés durant 24 heures. Avant infection, les cellules sont lavées pour éliminer le PMA. La suite du protocole est similaire à celui décrit dans l'article.

**Colonisation animale** : Dans le cas de la colonisation animale sur 21 jours, il est possible de lire le protocole dans l'article concerné. Dans le cas de la seconde colonisation animale, les souris ont été vaccinées avec 1/10 de la dose humaine du vaccin Infanrix en injection sous-cutanée. Les souris Balb/c ont reçu deux doses de ce vaccin, respectivement 60 et 30 jours avant l'infection. Le reste du protocole est similaire à celui décrit précédemment à ceci près que la période de suivi s'est étalée sur 49 jours.

## 2. Recherches Annexes

### 2.1. Contexte et Résumé

L'une des thématiques de recherche principales du laboratoire est l'étude de la régulation de la virulence. Au travers de différentes études le régulon de virulence de *B. pertussis* a été bien défini. Dans ce régulon, on trouve des toxines et des adhésines mais aussi quelques gènes liés au métabolisme comme l'importation du fer. Lors de mon arrivée au laboratoire j'ai donc commencé les recherches sur la caractérisation de la protéine BP2936. Cette étude constituait mon sujet mon stage de master 2, mais j'ai complété ces travaux au début de ma thèse.

Le gène *bp2936* est strictement régulé par le système à deux composants BvgAS, clé de voûte de la virulence chez *B. pertussis*. Les analyses des RNAseq et des transcrits primaires ont montré que le codon d'initiation était mal annoté et qu'en réalité, le gène est plus court de 33 codons. Cette hypothèse a été vérifiée par western blot en comparant les protéines sauvages de *B. pertussis* à la protéine recombinante produite chez *E. coli* selon l'annotation initiale. Toujours par western blot, nous avons pu mettre en évidence que cette protéine est associée aux membranes malgré l'absence de segment transmembranaire.

La recherche des domaines présents dans la protéine ont conduit à l'hypothèse qu'il s'agissait d'une méthyl transférase. De plus, il existe une structure de cristallographie de l'homologue de cette protéine chez *B. parapertussis*. Cette protéine avait cristallisé avec un acide palmitique dans sa cavité proche du site actif. Il apparaissait donc probable que cet acide palmitique soit le substrat de cette enzyme. L'analyse des acides gras méthylés présents dans la bactérie a permis de confirmer le rôle enzymatique de cette protéine. Grâce à ces dosages, nous avons également pu identifier les acides aminés essentiels au site actif par mutagénèse dirigée.

Enfin, le rôle dans la pathogénie de cette protéine n'a pas pu être mis en évidence avec certitude. La littérature scientifique a mis en évidence que le méthyl palmitate est un inhibiteur de la phagocytose. Il est donc probable que ce gène soit utilisé à cette fin par la bactérie. Néanmoins, les tests de survie à la phagocytose n'ont pas mis en évidence de différences significatives, ni l'expérience de colonisation animale. Cette dernière montre un léger défaut de persistance de la bactérie mais qui n'est pas significatif.

### 2.2. Article: **Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase in *Bordetella pertussis***

RESEARCH ARTICLE

# Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase in *Bordetella pertussis*

Alex Rivera-Millot<sup>1</sup>, Elodie Lesne<sup>1</sup>, Luis Solans<sup>1</sup>, Loic Coutte<sup>1</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>2</sup>, Philippe Froguel<sup>3,4</sup>, Véronique Dhennin<sup>3</sup>, David Hot<sup>1</sup>, Camille Locht<sup>1</sup>, Rudy Antoine<sup>1\*</sup>, Françoise Jacob-Dubuisson<sup>1\*</sup>

**1** Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019- UMR 8204-CIIL-Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Lille, France, **2** MetaboHUB-MetaToul-Lipidomic Core Facility, Inserm U1048, Toulouse, France, **3** University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8199, European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France, **4** Department of Genomics of Common Diseases, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, United Kingdom

\* [rudy.antoine@pasteur-lille.fr](mailto:rudy.antoine@pasteur-lille.fr) (RA); [francoise.jacob@ibl.cnrs.fr](mailto:francoise.jacob@ibl.cnrs.fr) (FJ-D)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Rivera-Millot A, Lesne E, Solans L, Coutte L, Bertrand-Michel J, Froguel P, et al. (2017) Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase in *Bordetella pertussis*. PLoS ONE 12(5): e0176396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396>

**Editor:** Daniela Flavia Hozbor, Universidad Nacional de la Plata, ARGENTINA

**Received:** February 8, 2017

**Accepted:** April 10, 2017

**Published:** May 11, 2017

**Copyright:** © 2017 Rivera-Millot et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper files.

**Funding:** This work was supported by the recurrent funding of our laboratory (INSERM, Lille University). We also acknowledge the participation of the UMR 8199 LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France), which belongs to the 'Federation de Recherche' 3508 Labex EGID (European Genomics Institute for Diabetes; ANR-10-LABX-46) and was supported by the ANR Equipex 2010 session (ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM'). The LIGAN-

## Abstract

The whooping cough agent *Bordetella pertussis* controls the expression of its large virulence regulon in a coordinated manner through the two-component signal transduction system BvgAS. In addition to the genes coding for *bona fide* virulence factors, the Bvg regulon comprises genes of unknown function. In this work, we characterized a new Bvg-activated gene called *BP2936*. Homologs of *BP2936* are found in other pathogenic *Bordetellae* and in several other species, including plant pathogens and environmental bacteria. We showed that the gene product of *BP2936* is a membrane-associated methyl-transferase of free fatty acids. We thus propose to name it FmtB, for fatty acid methyl-transferase of Bordetella. The role of this protein was tested in cellular and animal models of infection, but the loss of *BP2936* did not appear to affect host-pathogen interactions in those assays. The high level of conservation of *BP2936* among *B. pertussis* isolates nevertheless argues that it probably plays a role in the life cycle of this pathogen.

## Introduction

*Bordetella pertussis* is the agent responsible for whooping cough, an acute respiratory disease that affects exclusively humans [1]. This bacterium infects mainly naive individuals, in particular infants, and it is responsible for more than 300,000 deaths each year [2]. Whooping cough also affects adults and adolescents, in whom it causes milder forms of illness [3]. The high morbidity rate associated with this infection is explained by the aerosol mode of transmission of the bacterium, and by the limited duration of the immunity provided by vaccines [4].

*B. pertussis* produces an array of virulence factors, the expression of which is regulated by a two-component system called BvgAS [5]. BvgS and BvgA are the sensor-kinase and the response regulator of this system, respectively [6]. At 37°C, BvgS autophosphorylates and then transfers its phosphoryl group to BvgA via a complex phospho-transfer cascade [7]. Phosphorylated BvgA serves as a transcriptional activator of a number of genes and operons, including

PM Genomics platform (Lille, France) is also supported by the FEDER and the Region Nord-Pas-de-Calais-Picardie. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

the *bvgAS* operon itself, that are called the *virulence-activated* genes (*vags*) [8]. In the conditions under which the *vags* are expressed, *B. pertussis* is in the virulent,  $Bvg^+$  phase. Major pathogenicity factors regulated by BvgAS include adhesins, such as fimbriae, the filamentous hemagglutinin FHA and several autotransporters, and toxins, including adenylate cyclase/hemolysin, dermonecrotic toxin and pertussis toxin [9]. *B. pertussis* is also a master at manipulating host immunity to its own advantage, with most virulence factors modulating the immune response in various ways [10].

BvgS works as a kinase by default. Signals that make BvgS switch to a phosphatase mode of activity in laboratory conditions include low temperatures and chemical modulators such as nicotinic acid and sulfate ions at millimolar concentrations [11,12]. In the so-called  $Bvg^-$  phase the *vags* are silent, while the so-called *virulence-repressed* genes (*vrgs*) are expressed at high levels. In the  $Bvg^-$  phase of *Bordetella bronchiseptica*, a closely related species that infects various mammals and can survive in the environment, a number of *vrgs*, notably coding for proteins involved in nutrient acquisition and motility functions, are expressed [12,13]. Many of those genes have been lost or are inactive in *B. pertussis*, which has undergone massive genome decay [14,15]. An intermediate ' $Bvg^i$ ' phase has been identified that is triggered by intermediate concentrations of modulators [16]. In those conditions, adhesin genes are expressed but not those coding for toxins, leading to the hypothesis that this phase might be involved in the first stage of colonization or in the transmission of the bacterium between hosts.

The chemical modulators have widely been used as tools to study the Bvg regulon. Transcriptomic analyses have thus compared the  $Bvg^+$ ,  $Bvg^-$  and  $Bvg^i$  phases [17–19]. While they largely confirmed the Bvg regulation of the *bona fide* virulence genes discovered in the pre-genomic era, they also revealed that some of them are subject to additional regulation [19]. In addition, they unveiled new Bvg-regulated genes that have no assigned function. *BP2936* (numbering of the *B. pertussis* *Tohama* I reference genome) is one such gene. Orthologs of *BP2936* are found in other *Bordetella* species and other bacterial genera, including bacterial pathogens, but their function is unknown. In this work, we performed the first characterization of *BP2936*, a new *vag* member of the Bvg regulon.

## Materials and methods

### Strains and plasmids

BPSM, a *Tohama* I streptomycin-resistant derivative, and its derivatives BPR4 (BPSM deleted of the *ptx* operon) and BPR4 (BPSM deleted of the *fhaB* gene) were described earlier [20–22]. Modified Stainer Scholte liquid medium and Bordet Gengou blood-agar medium were used with the appropriate antibiotics to culture the *B. pertussis* strains, except for the lipid analyses (see below). To construct a *BP2936* deletion in BPSM, sequences flanking the gene on each side were amplified by PCR using the pairs of oligonucleotides 5' -gaattccgtgcaggtcgaagccaacaacga-3' and 5' -ggatcccgcgcgatgggagatgagag-3', and 5' -gatccgcctgacgctcgccgta-3' and 5' -aagcttcgcaaaggccgtgacatgggaca-3'. For all the PCR performed in this work, the amplicons were first introduced into pCRII-TOPO (Invitrogen) and sequenced. The two amplicons were introduced as EcoRI-BamHI and BamHI-HindIII fragments into pUC18 by ligation, after which the EcoRI-HindIII insert of the resulting plasmid was introduced into the mobilizable plasmid pSS1129 [23]. Allelic replacement in BPSM was performed by conjugation as described in [24], resulting in BPRM1. The deletion of *BP2936* in BPRM1 was verified by PCR and immunoblotting.

To complement the deletion, the *BP2936* gene, including the promoter region, was amplified by PCR using 5' -ggtaccgacttcaaccgcggcgcatt-3' and 5' -ggatccaaaggcggaactaccggaca-3' as primers. In addition, internal sequences of the *ureJ* and *ureC*

genes were amplified, using 5' -gaattcgccgcctgatgctgttctcg-3' and 5' -ggtagcgcacacctcctggtcagaccc-3', and 5' -ggatccatgaccaggatttcgcggttcgg-3' and 5' -aagcttcagcgcctgcagcatgg-3' as primers, respectively. After sequencing, the 3 amplicons were successively introduced into pCU18 by ligation, in such a way as to flank *BP2936* on both sides with the *ure* fragments. The rest of the procedure was as described above, using BPRM1 as the recipient for conjugation. This yielded BPRM2, which harbors *BP2936* in the *ure* locus. The *BP2936*-containing amplicon was also introduced as a KpnI-BamHI fragment in pBBR1-MCS5, a replicative, low-copy plasmid [25], resulting in pBP2936. This plasmid was used for complementation of BPRM1.

Point mutations were introduced in *BP2936* by site-directed mutagenesis with the Quik Change II XL kit (Agilent). pUC18 containing the *BP2936* gene was used as the template. After sequencing, the mutated gene was introduced in pBBR1-MCS5, yielding pBP2936<sup>DA/YS</sup>.

Several constructs were generated for the production of the protein encoded by *BP2936* in *Escherichia coli*. Initially, the oligonucleotides 5' -ggatccgacgctggcgtggccatctg-3' and 5' -aagcttcaggccggcttgcgggcat-3' (called rec-Hind) were used to amplify the longer putative cds. The resulting amplicon was restricted by BamHI and HindIII and ligated with pQE30 (Qiagen). This introduced a 6-His tag at the N-terminus of the protein. A shorter PCR was performed in a similar manner, using 5' -ggatcccatcgtgcagcgtcggccgat-3' and rec-Hind as primers, and the amplicon was introduced in the same vector. *BP2936* carrying the two point mutations was also amplified and cloned similarly.

## RNA sequencing

RNA-seq was performed with two independent cultures stopped in the exponential phase of growth ( $OD_{600\text{ nm}} = 2$ ) by adding 2 ml of 5:95 (v:v) phenol/ethanol to 8 ml of bacterial suspension. Bacteria were pelleted by centrifugation, and total RNA was extracted using TriReagent (Invitrogen). Genomic DNA was removed by two steps of DNase I treatment (Sigma Aldrich). Total RNA was treated with the Ribo-Zero rRNA Removal Kits (Illumina) following the manufacturer's recommendations. The rRNA-depleted RNA were then used to prepare the two Illumina libraries using the TruSeq RNA Library Preparation Kit (Illumina), following sequencing on an Illumina NextSeq 500 benchtop sequencer on SR150 high output run mode.

Differential RNA-seq was performed according to the protocol described in [26]. Briefly, three cultures were stopped either in the exponential ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 1.5$ ), late exponential ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 2.4$ ) or early stationary phases ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 3.2$ ) by adding 2 ml of 5:95 (v:v) phenol/ethanol to 8 ml of bacterial suspension. Bacteria were pelleted by centrifugation, and total RNA was extracted using TriReagent (Invitrogen). Genomic DNA was removed by two steps of DNase I treatment (Sigma Aldrich) before pooling. To digest non-primary transcripts, 5  $\mu$ g of total RNA were then treated with 1U of Terminator<sup>TM</sup> 5'phosphate-dependant exonuclease (TEX) (Epicentre) for 60 min at 30°C. The reaction was stopped by adding 1  $\mu$ l of 100 mM EDTA pH 8, and the RNA were purified by an organic extraction. TEX-treated RNA were incubated with 1U of Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) (Epicentre) for 60 min at 37°C before organic extraction. Sequencing libraries of cDNA were constructed with 500 ng of TEX/TAP-treated RNA using the Ion Total RNA-seq Kit v2 (Life Technologies), following the manufacturer's recommendations. Libraries were purified twice with 1.8 volume of Agencourt AMPure (Beckman Coulter). Emulsion PCR, enrichment and sequencing were made using the Ion PGM<sup>TM</sup> template OT2 400 Kit and the Ion PGM<sup>TM</sup> sequencing 400 Kit. Enriched beads were sequenced on an Ion Torrent PGM machine using a 318 v2 chip. RNA-seq and dRNA-Seq sequencing reads results were then imported and mapped on the *B. pertussis* Tohama1 genome using the CLC Genomics Workbench software (QIAGEN Bioinformatics).

## Protein techniques

The recombinant pQE30 plasmids were introduced in *E. coli* M15(pREp4) for protein expression. The cells were cultured in LB medium, and induction of the recombinant proteins was performed with 1 mM IPTG for 3 hours. The bacteria were resuspended in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM imidazole (TNI buffer) and broken by passages in a French pressure cell. The lysates were clarified by centrifugation. The longer protein, which was used for antibody production, formed inclusion bodies, and thus the insoluble pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 6 M urea and rocked gently for one hour. The solution was clarified by centrifugation and the protein was purified by chromatography on a Ni<sup>++</sup> column. Polyclonal antibodies were raised in rats (Eurogentec, Belgium). The shorter protein was soluble and purified by Ni<sup>++</sup> chromatography in TNI buffer. It was concentrated by ultrafiltration to 2 mg/mL for the enzymatic assays.

The fractionation of *B. pertussis* for detection of the protein coded by *BP2936* was performed as follows. The bacteria were grown in SS medium until exponential phase, collected by centrifugation, resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8) with a tablet of Protease inhibitor (Complete, Roche) and lysed in French pressure cell. The clarified lysate was ultracentrifuged at 100,000 g for one hour to separate the soluble and membrane fractions. The samples were analyzed by immunoblotting using the antibodies raised against the longer recombinant protein. The loading of the samples was standardized based on the optical densities of the cultures when the bacteria were collected for processing. The immunoblots were developed by chemiluminescence (ECL Prime, Amersham).

## Homology modeling

A three-dimensional model of the protein was constructed with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) and palmitic acid in its enzymatic cavity. Briefly, the crystal structures of the full *B. parapertussis* ortholog [Protein Data Bank (PDB) entry 3OCJ] and of the SAH-binding domain of a methyl-transferase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 (PDB entry 1WZN) were used as templates in MODELLER version 9.17 [27]. Templates were structurally aligned using PROMALS3D [28]. Molecular structure inspections and illustrations were made using PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8.2, Schrödinger).

## *In vitro* assay of methyl-transferase activity

A kit developed by Caiman Chemicals was used for measurements of methyl-transferase activity. Briefly, the kit detects a product of the methyl-transferase reaction, SAH, by a series of enzymatic reactions that eventually produce resorufin, a fluorescent molecule. The shorter, soluble recombinant protein was used in this assay, with palmitate as the substrate at concentrations ranging from 0.4 mM to 20 mM. Palmitate was either solubilized in 2% Triton X100 or presented to the enzyme as a BSA conjugate, which was prepared according to the instructions of the manufacturer of fatty-acid-free BSA (Seahorse Bioscience). The assays were conducted in 96-wells plates. The excitation wavelength was 535 nm and the detection wavelength 585 nm.

## Quantification of free methylated fatty acids in *B. pertussis*

BPSM and its derivatives were cultured in Thijs medium, which is devoid of casaminoacids, to prevent contaminating the samples with lipids from the medium [29]. The culture flasks were disposable, and the glassware used for the rest of the procedure was first washed with a mix of chloroform and methanol to remove traces of lipids. The bacteria were collected by

centrifugation at the end of the exponential phase, washed twice in sterile PBS and diluted to  $5 \times 10^{10}$  bacteria per tube. They were killed by the addition of 1 mL chloroform. Lipids were extracted as described in [30] after addition of dichloromethane (1.5 ml), methanol (2.5 ml) and water (2.1 ml) in the presence of an internal standard, methylated heptadecanoate acid (4  $\mu$ g). The lipid extract was then evaporated to dryness and dissolved in ethyl acetate (20  $\mu$ l). Methylated fatty acids were analyzed on a ThermoScientific Trace GC coupled to a Trace ISQ Mass selective detector (ThermoScientific). The fatty acids were separated on an Agilent J&W HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m phase thickness). The oven temperature program was as follows: 180°C for 1 min, 20°C/min to 250°C, 5°C/min to 300°C where the temperature was kept for 8 min, and then 35°C/min to 325°C. High-purity helium was used as carrier gas at a flow rate of 0.8 mL/min in constant flow mode. The samples were injected in a splitless mode with an injection volume of 1  $\mu$ L. The injector, transfer line and source temperatures were 270°C, 280°C and 250°C, respectively. The mass spectrometer was operated in the full scan mode. Peak detection, integration and relative quantification analysis were executed using Xcalibur Quantitative browser (ThermoScientific).

### Infection of macrophages

The monocytic human cell line THP1 was used in these experiments. The cells were cultured in RPMI medium with 10% fetal calf serum and 0.05 mM  $\beta$  mercaptoethanol. They were treated with 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) for 18 h to induce their differentiation into macrophages. The bacteria were grown at 37°C on BG blood-agar plates, scraped from the plates after 48 hours and resuspended in PBS. They were used at a multiplicity of infection of 200. The bacteria were centrifuged onto the cells at 640 g for 5 min, and incubation was performed for 30 min at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After a wash in PBS, polymyxin B was added to a concentration of 100  $\mu$ g/mL to eliminate extracellular bacteria. After 1 h the concentration of polymyxin B was lowered 20 fold. Cells were washed in PBS and then lysed with 0.1% saponine 1 h, 4 h and 24 h after infection. Serial dilutions were plated on BG blood agar to count the bacteria. The experiments were performed in triplicates.

### Animal experiments

The bacterial strains used for the animal experiments were grown on plates for 48 h, scraped and resuspended in sterile PBS to  $10^6$  bacteria per 20 mL. Female, 6-weeks-old JAX™ BALB/cByJ mice from Charles River were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine, atropine and valium and infected by intranasal inoculation with  $10^6$  viable bacteria (S1 Fig). Groups of 3 or 4 animals per bacterial strain were sacrificed after 3 h, and 4, 7, 14 or 21 days post-inoculation in the first experiment, and after 3 h and 5 days post-inoculation in the second. Their lungs were removed in a sterile manner and homogenized using an Ultra Thurax apparatus. Serial dilutions were performed in PBS and plated to count the bacteria. All the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Research regarding animal experiments, and the protocols were approved by the Ethical Committees of the Region Nord Pas de Calais and the Ministry of Research (agreement number APAFIS#9107–201603311654342 V3).

## Results

### Genomic context of *BP2936*, a new virulence-activated gene

Transcriptomic analyses comparing the Bvg<sup>+</sup> and Bvg<sup>-</sup> phases of *B. pertussis* have unveiled uncharacterized genes that are regulated in a similar manner as the *bona fide* virulence genes

[17]. One of these genes, numbered *BP2936* in the genome of the reference strain *Tohama I*, has been annotated as coding for a putative exported protein of unknown function [14]. In addition to being positively regulated by BvgAS, *BP2936* is part of a subset of *vags* whose regulation is also under the control of another transcriptional activator called RisA [19].

Deep RNA sequencing analyses (RNA-seq; Fig 1A) indicated that *BP2936* forms a monocistronic operon. It is flanked on one side by an operon (*BP2935-BP2934*) coding for a two-component system called RegAB and potentially involved in the redox response, itself adjacent to cytochrome ubiquinol oxidase genes. On the other side of *BP2936* is found another gene of unknown function, *BP2937*. The flanking genes are coded on the same DNA strand, but RNA-seq analyses indicated that they are not co-transcribed with *BP2936*.

*BP2936* has two potential initiation codons, which would yield a protein of 302 or 335 residues. The current annotation of the *Tohama I* genome predicts that the coding DNA sequence (cds) starts at the first of the two putative initiation codons. A hydrophobic segment that does not have the features of a signal-peptide is thus found in the N-terminal region of the predicted cds (Fig 1B).

BLAST analyses of the predicted protein sequence indicated that the product of *BP2936* is most likely a putative S-adenosyl-methionine (SAM)-dependent methyl-transferase. The closest homologues are found in other pathogenic *Bordetellae* (see below), in various Gram-negative bacteria, including human or plants pathogens such as *Legionella pneumophila*, *Burkholderia cepacia*, *Dickeya dadantii*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* or *Xanthomonas campestris*, and in several environmental species. No characterization of these proteins has been reported.

### *BP2936* in pathogenic *Bordetellae*

There are currently 450 genomic sequences of isolates in the *bronchiseptica* complex, which encompasses the three closely related species *B. pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* [31]. We performed *in silico* analyses of these sequences, which showed that *BP2936* is present in all genomes except for that of *B. pertussis* 18323. In this isolate, a 31-kbp deletion between two *IS481* copies encompasses 34 cds, including *BP2936*. The sequence and the genomic context of *BP2936* are both extremely well conserved. Among the available *B. pertussis* genomic sequences, we found no case of an insertion sequence in *BP2936*, suggesting that this gene is not subject to the global genomic reduction that characterizes *B. pertussis* [31,32]. Orthologs of *BP2936* are found in the related species *Bordetella holmesii*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella pseudohinzii*, *Bordetella avium*, *Bordetella trematum*, but not in the environmental species *Bordetella petrii*. Within the *bronchiseptica* complex the predicted proteins are identical to 97%. The putative proteins of the other *Bordetella* species are approximately 50% identical to the product of *BP2936*. The genetic organizations of the locus in the other species are different from that in the *bronchiseptica* complex.

### Detection of the *BP2936* gene product

A deletion of *BP2936* was generated in the *Tohama I* derivative BPSM by allelic exchange, yielding BPRM1. To complement this deletion, the *BP2936* gene was introduced by homologous recombination into the *ure* locus, which is inactive in *B. pertussis*. This yielded BPRM2. BPRM1 was also complemented by the introduction of *BP2936* under the control of its own promoter on a replicative plasmid, called pBP2936.

A recombinant protein was produced in *Escherichia coli* to raise polyclonal antibodies. The first potential initiation codon was used, and a 6-His tag was added at the N-terminus of the recombinant protein to facilitate purification. The recombinant protein called rec2936P-Ig



and sense strands, respectively. B. Differential RNA sequencing was used to identify the transcription initiation site of BP2936. The consensus sequence is indicated. Translation of the coding DNA sequence is shown from right to left, indicating the two possible initiation Met. The primary transcripts identified by dRNA seq show that the transcription start site maps between these two codons, at nucleotide position 3125512 in the genome of *Tohama* I.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g001>

formed inclusion bodies, and it was thus purified in the presence of urea. Antibodies were raised against rec2936P-Ig. Immunoblot analyses showed that they recognized a protein from *B. pertussis* migrating at approximately 30 kDa in BPSM, but not in BPRM1. This demonstrated that the BP2936 gene is expressed in *B. pertussis* grown under usual laboratory growth conditions. The chromosomal complementation of the deletion restored the production of the protein to wild type (wt) levels in BPRM2, and to higher levels in BPRM1 (pBP2936), in which the gene is carried by a plasmid (Fig 2A and 2B).

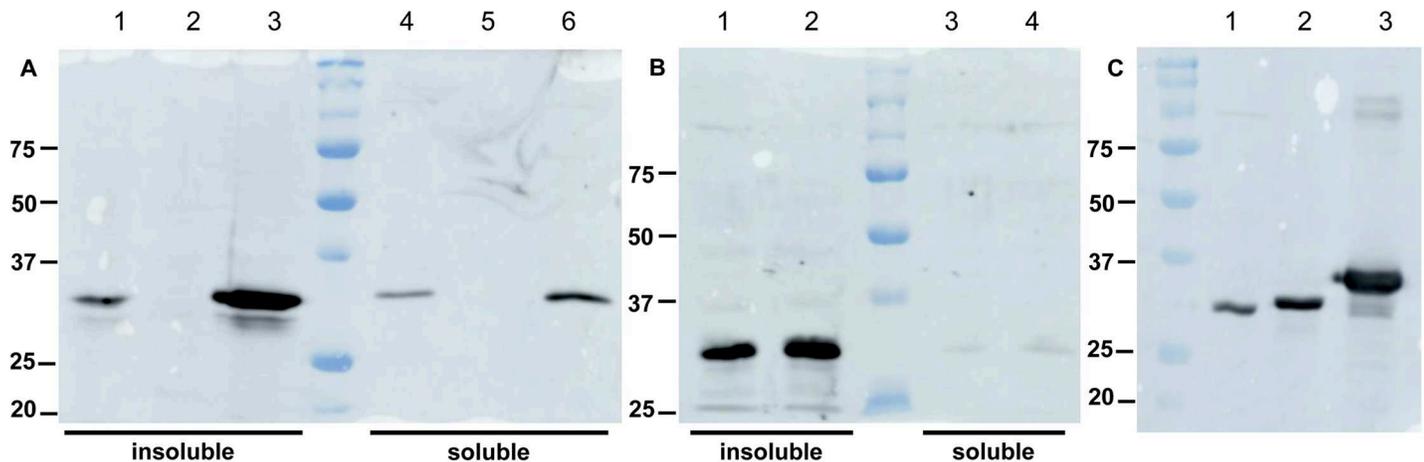
The *B. pertussis* protein, called 2936P, was found to migrate faster than the recombinant rec2936P-Ig protein produced in *E. coli* (Fig 2C), indicating that the second putative initiation codon is used in *B. pertussis*. This is consistent with the mapping by differential RNA sequencing (dRNA seq) of the transcription initiation site, which was found to be located at nucleotide position 3125512 in the genome of *Tohama* I, between the two putative initiation codons (Fig 1B). Therefore, the protein encoded by BP2936 is 302-residue long and devoid of a hydrophobic segment or signal sequence. It should thus be cytoplasmic. Intriguingly, however, fractionation of BPSM cell extracts between soluble and membrane fractions showed that most of 2936P was found in the latter (Fig 2A and 2B). This concurs with proteomic data that identified 2936P in membrane-enriched fractions of *B. pertussis* [33].

### Activity of the protein coded by BP2936

SAM-dependent methyl-transferases are a large class of enzymes whose possible substrates include DNA, RNA, small molecules or proteins [34]. Interestingly, the X-ray structure of the protein coded by BPP1064, the BP2936 ortholog of *B. parapertussis*, has been reported by another group thanks to a program of structural genomics (Protein Data Bank number: 3OJC). As the sequences of the two proteins are > 97% identical, we used the structure of the *B. parapertussis* protein as a model for 2936P. The putative SAM-binding domain of the *B. parapertussis* ortholog adopts a typical Rossmann-like fold, widespread among methyl-transferases [34]. Basically, it is composed of alternating  $\alpha$  helices and  $\beta$  strands, with the latter forming a central  $\beta$  sheet flanked by  $\alpha$  helical layers on both sides (Fig 3A). The functionally important SAM-binding residues that are conserved among SAM-dependent methyl-transferases and located at the C termini of the  $\beta$  strands were found in the *B. parapertussis* ortholog of 2936P [34–38]. The less conserved substrate-binding domain, which is all  $\beta$  helical in this case, crystallized with a small molecule, most likely a palmitic acid, in its cavity (Fig 3A).

The X-ray structure of another SAM-dependent methyl transferase that co-crystallized with S-adenosyl homocysteine (SAH), the reaction product of SAM, was used for structural alignments with that of the *B. parapertussis* enzyme. We were thus able to predict the position of SAH in the cavity of the protein, revealing that the carboxylate group of the palmitate molecule might be oriented in an appropriate manner for methylation in a SAM-dependent manner (Fig 3B and 3C). The reaction product would thus be a methyl palmitate, suggesting that the protein coded by BP2936 may be a fatty acid methyl-transferase.

In order to test this hypothesis, a new recombinant protein corresponding to the shorter ORF was prepared with an N-terminal His tag. This protein, called rec2936P-sh, was produced in *E. coli* and purified in a soluble form (Fig 2C). Structural alignments of SAM-dependent methyl-transferases have identified a conserved motif Ile-(Asp/Glu)-Tyr in the second  $\beta$



**Fig 2. Detection of the product of *BP2936* by immunoblot analyses.** (A), insoluble and soluble fractions of BPSM (wt control; lanes 1 and 4), BPRM1 (deletion mutant; lanes 2 and 5) and BPRM1 (pBP2936) (mutant complemented on plasmid; lanes 3 and 6) were analyzed by immunoblotting with antibodies raised against the recombinant protein. (B), the same experiment was performed with the insoluble and soluble fractions of BPSM (lanes 1 and 3) and BPRM2 (mutant complemented on chromosome; lanes 2 and 4). (C), a comparison of the sizes of the three proteins, i.e., the 2936P protein produced by *B. pertussis* (lane 1), and the recombinant proteins rec2936P-sh (lane 2) and rec2936P-Ig (lane 3) produced in *E. coli*, was performed. Note that 2936P migrates slightly faster than the shorter recombinant protein, most likely because of the purification tag added to the latter.

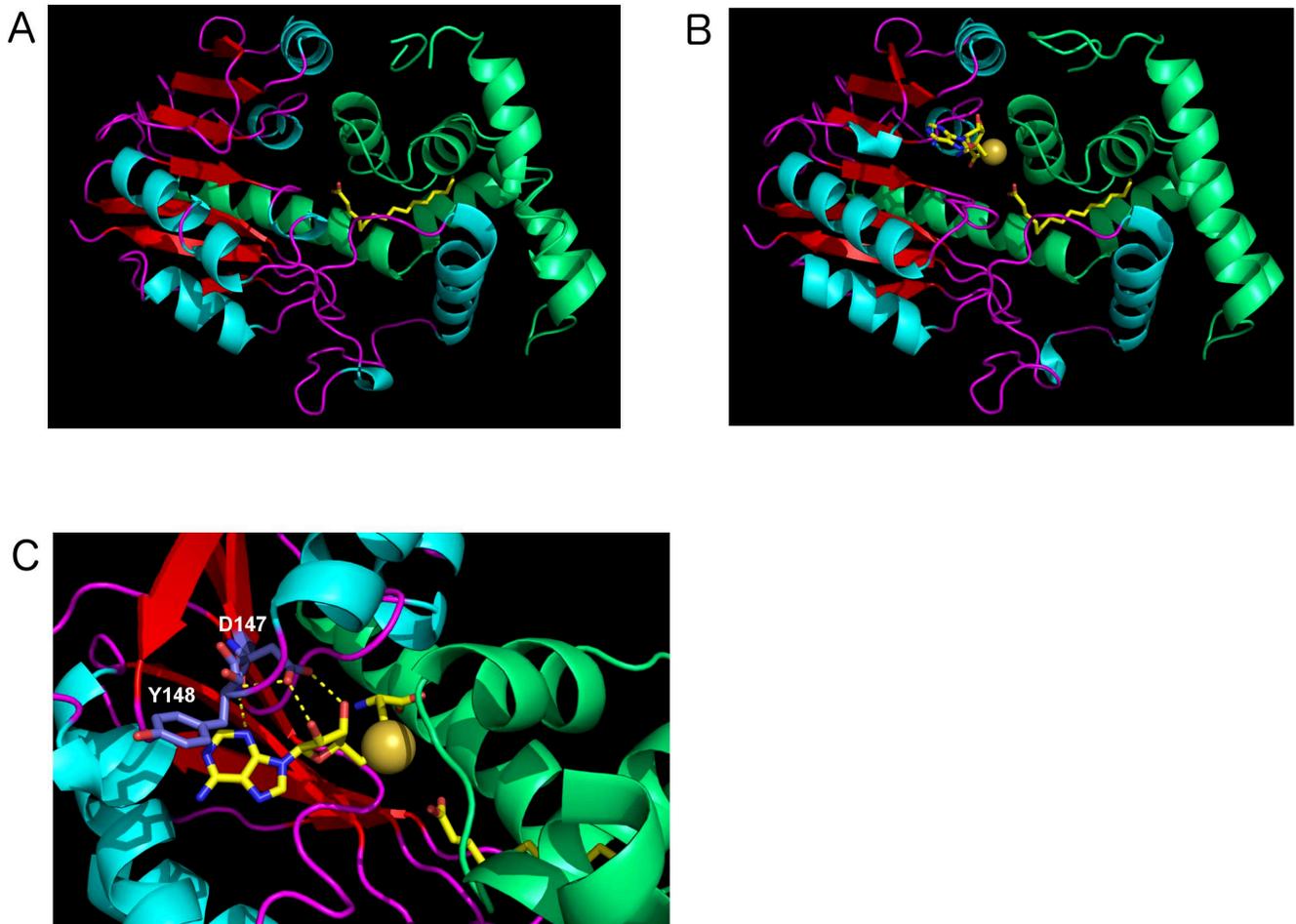
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g002>

strand. The acidic residue located at the edge of the  $\beta$  sheet is involved in the binding of SAM, and the aromatic residue might also form pi interactions with its adenine moiety [34–39] (Fig 3C). To disrupt the putative enzymatic activity of rec2936P-sh, the Asp<sup>147</sup> residue that corresponds to the acidic residue of the conserved SAM-binding motif was replaced by Ala. Similarly, the following Tyr<sup>148</sup> residue that may also contribute to SAM binding was replaced with a Ser. These two substitutions were combined in a new recombinant protein, called rec2936P-sh<sup>DA/YS</sup>. It was produced in *E. coli* and purified like its wt counterpart.

The two recombinant proteins were used in an *in vitro* assay of methyl-transferase activity. This assay detects the production of SAH by a series of successive reactions that yield a fluorescent product, resorufin. However, the background reaction in the absence of enzyme proved to be very high in our hands, and no clear increase of activity was detected in the presence of rec2936P-sh (not shown). In an attempt to enhance substrate accessibility, we also conjugated palmitate to fatty-acid free BSA, to optimize its presentation to rec2936P-sh. This did not reveal enzymatic activity either.

We thus turned to the detection of free methylated fatty acids produced by *B. pertussis*. We introduced the Asp to Ala and Tyr to Ser substitutions in the complementation plasmid, yielding pBP2936<sup>DA/YS</sup>. The level of production of the variant protein from this plasmid in *B. pertussis* was similar to that of the wt protein produced from the parent plasmid. Total *B. pertussis* cell extracts of BPSM, BPRM1, BPRM2, BPRM1 (pBP2936) and BPRM1 (pBP2936<sup>DA/YS</sup>) were prepared for the detection of methyl-ester fatty acids by mass spectrometry analyses. The classical protocol to quantify cellular fatty acids involves an acid methanolysis step, which was omitted in order to detect exclusively the naturally occurring fatty acids methylated on their carboxylate group.

The amounts of methyl-ester fatty acids appeared to be somewhat higher in BPSM extracts than in BPRM1 extracts, even though the difference was not significant according to the results of a non-parametric Kruskal-Wallis statistic test. However, BPRM1 (pBP2936), which carries *BP2936* on the complementation plasmid, produced significantly higher levels of methyl-ester fatty acids than the other strains (Fig 4). This is consistent with the immunoblot data, showing



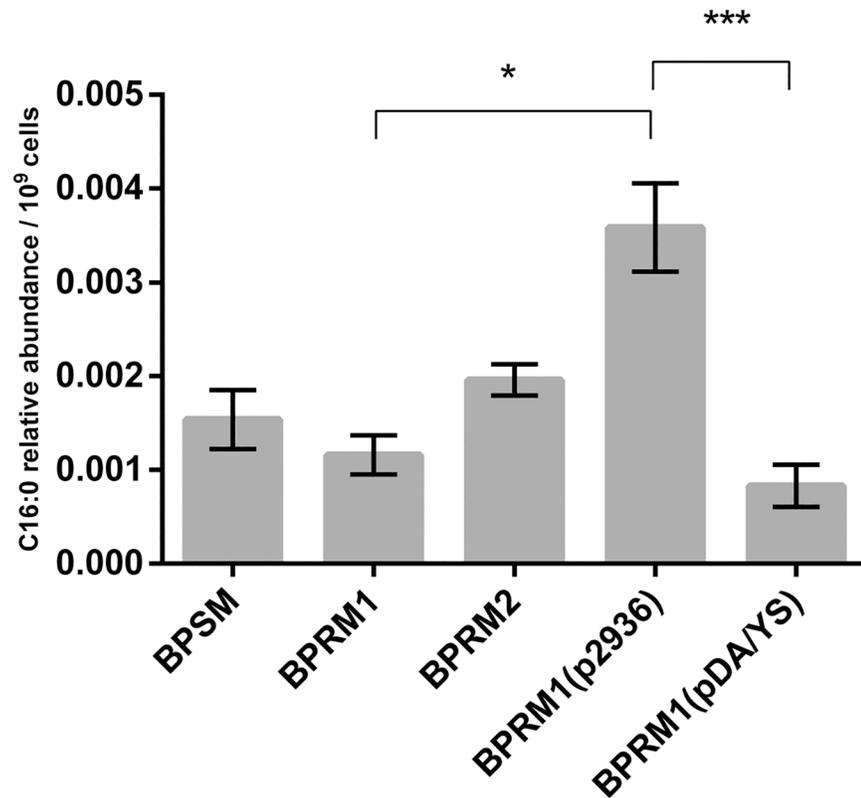
**Fig 3. Structure of the protein coded by the *B. parapertussis* ortholog of BP2936.** The coordinates found in the RCSB Protein Data Bank (Nr 3OJC) correspond to the *B. parapertussis* ortholog (97% sequence identity with 2936P). (A), the structure of the protein coded by BPP1064 is shown in cartoon representation. The palmitate molecule found in the cavity is shown in yellow stick representation. (B), A model of 2936P with palmitate and S-adenosyl homocysteine (SAH) in the cavity was constructed. Both SAH and the methyl palmitate are displayed in sticks. A zoom of the relevant region is presented in C. The sulfur atom of SAH, which carries the methyl group in SAM, is shown as a yellow ball. The conserved residues modified by site-directed mutagenesis (colored in slate blue) are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g003>

that 2936P-wt was produced at higher levels than in the parental strain when the deletion was complemented from a plasmid (Fig 2A). This result thus corroborates the trends observed in the comparison between BPSM, BPRM1 and BPRM2 (Fig 4). In contrast, very low levels of methylated fatty acids were detected in the strain producing the mutant protein 2936P<sup>DA/YS</sup>, similar to those found in the BPRM1 strain, even though the mutant protein was overproduced in the former (Fig 4). These data thus support the hypothesis that BP2936 codes for a methyl-transferase that esterifies fatty acids in *B. pertussis*. We propose to name this gene *fmtB*, for fatty acid methyl-transferase of *Bordetella*. We cannot formally rule out the possibility that *fmtB* has an indirect effect on the amounts of methyl-ester fatty acids in *B. pertussis*, but the X-ray and mutagenesis data make this alternative explanation less likely.

### BP2936/*fmtB* in host-pathogen interactions

Interestingly, methyl-palmitate was reported to inhibit phagocytosis [40–42]. As *B. pertussis* is a mainly extracellular pathogen that poorly survives internalization by phagocytic cells [43,44],



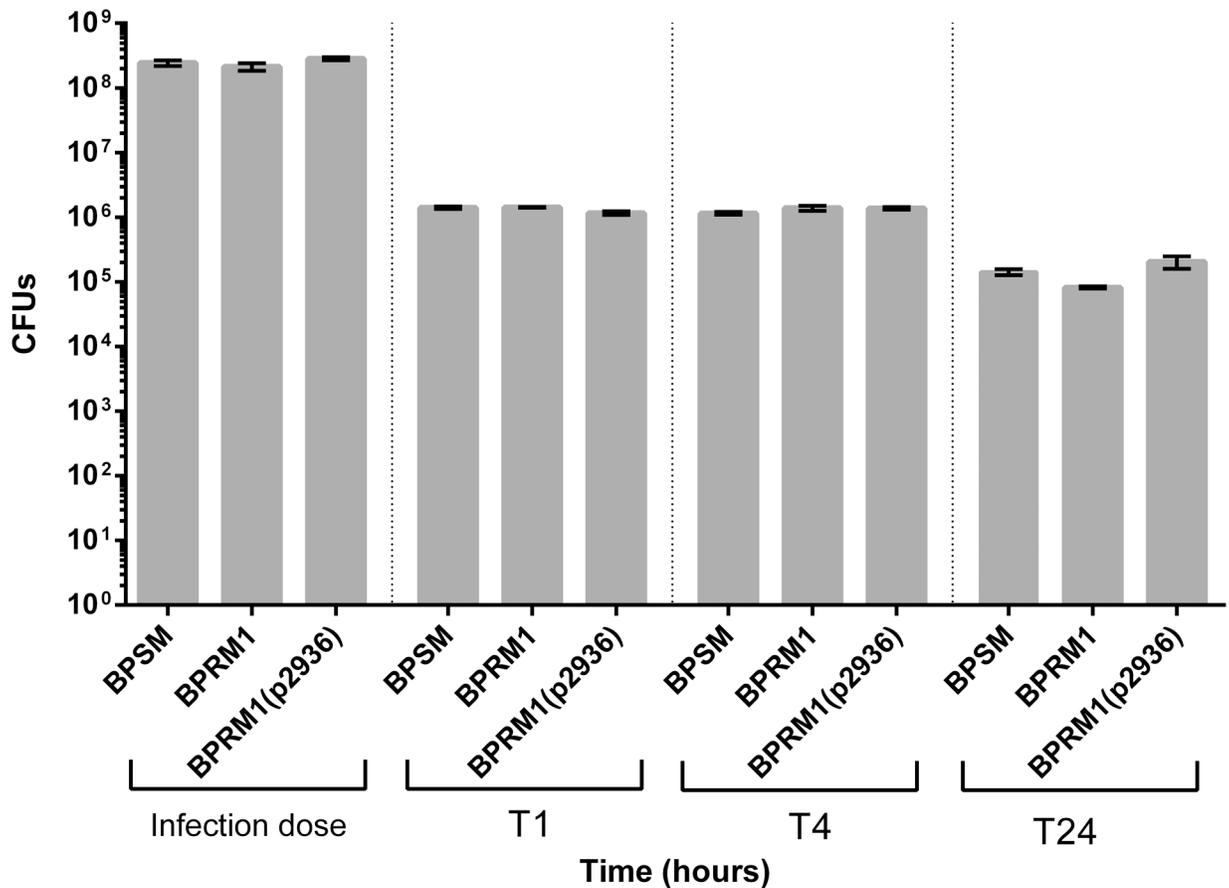
**Fig 4. Detection of methyl fatty acids in *B. pertussis*.** The amounts of methyl fatty acids were determined in BPSM (wt control), BPRM1 (deletion mutant), BPRM2 (chromosomal complementation), BPRM1 (pBP2936) (plasmid complementation) and BPRM1 (pBP2936<sup>DA/Y5</sup>) (complementation on plasmid with mutated *BP2936*). The relative abundance is defined as the ratio between the area of the C16 peak and the area of the internal standard peak, normalized to the number of cells. The experiments were performed on 3 to 5 independent samples for each strain. Means and standard errors of the means are shown. A Kruskal-Wallis test was used to analyze the data (\*, p value <0.05; \*\*\*, p value <0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g004>

we reasoned that the FmtB enzyme might interfere with internalization of the bacteria by macrophages. We thus determined the numbers of bacteria internalized upon contact with human THP1 macrophages, and their survival rates over the first hours. BPSM, BPRM1 and BPRM1 (pBP2936) bacteria were incubated with THP1-derived macrophages. After killing the extra-cellular bacteria, the viable bacteria inside the macrophages were counted, and their survival was followed over a few hours time. Very few bacteria survived the internalization, and no significant difference was observed between the three strains (Fig 5).

Animal infection experiments were also performed. Balb/c mice were infected intranasally with 10<sup>6</sup> BPSM, BPRM1 or BPRM2 bacteria, and the numbers of bacteria present in the lungs of the animals were determined after 3 h and 4, 7, 14 and 21 days. Bacterial multiplication occurred after one week, followed by a progressive clearance. This typical colonization kinetics did however not differ between the three strains tested (Fig 6).

It has been reported that all the virulence factors are not necessary for mouse colonization by *B. pertussis*, and that the role of some of them might be masked by the presence of others even if they do not play similar roles in the infection [45]. We reasoned that by weakening the pathogenic potential of the bacterium a putative minor contribution of FmtB to pathogenesis might be revealed. Thus, we tested whether the effect of FmtB could be uncovered in the absence of either of two major virulence factors of *B. pertussis*, filamentous hemagglutinin or



**Fig 5. Intracellular survival of *B. pertussis* in THP1 macrophages.** The BPSM, BPRM1 and BPRM1(pBP2936) strains were used in this experiment. The colony forming units were determined at each time point, expressed in hours after bacteria-macrophages contacts. The experiments were performed in triplicates, and the means and errors of the means are indicated.

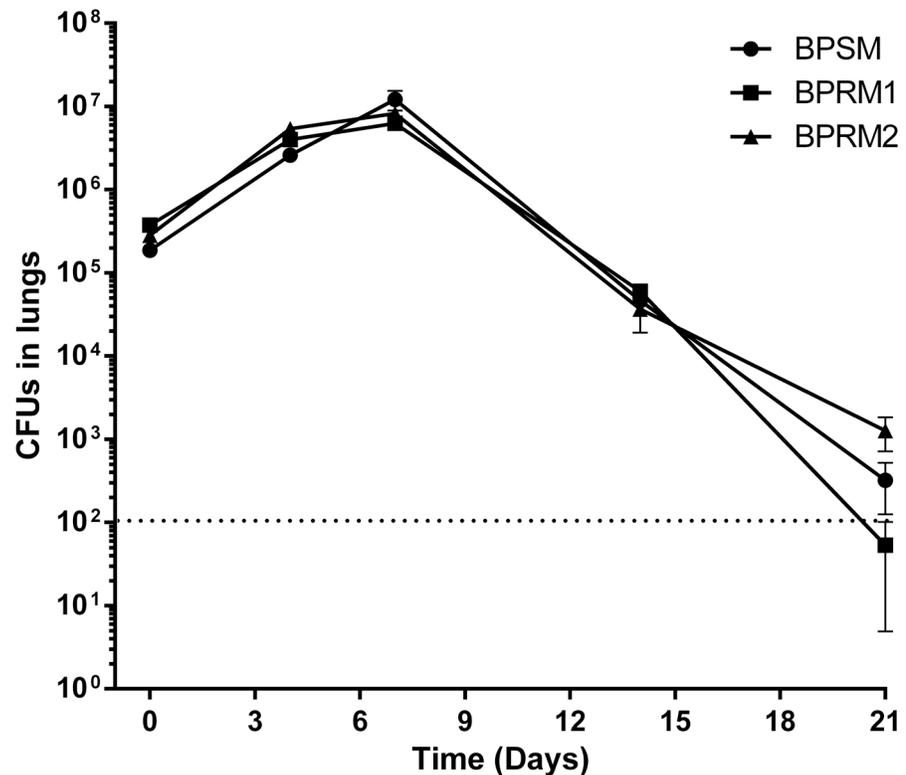
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g005>

*pertussis* toxin. We inactivated *fntB* by allelic exchange in BPGR4 (*fhaB* KO) and BPRM1 (*ptx* KO). Animal colonization experiments were performed with the resulting mutant strains, using BPGR4 and BPRM1 as controls. As reported previously, bacterial multiplication was more limited for the strains that do not produce pertussis toxin or FHA [45]. Nevertheless, the mutants harboring the *fntB* deletion behaved similarly as their respective parental strains (Fig 7). Altogether, thus, the *in vivo* and *ex vivo* experiments have not revealed a role for FntB in host-pathogen interactions thus far, at least with the models used in this study.

## Discussion

Among new members of the Bvg regulon revealed by transcriptomic analyses, *BP2936*, which we propose to name *fntB*, appears to be present in the overwhelming majority of the sequenced strains of the *bronchiseptica* complex. It is also found in other pathogenic *Bordetella* species, but not in non-pathogenic *B. petrii*. We showed here that the protein coded by this gene is produced under laboratory growth conditions. This is consistent with the results of two distinct proteomics experiments [33,46].

The *B. parapertussis* ortholog of FntB protein has a typical fold of SAM-dependent methyltransferases. The identification of a palmitic acid in its enzymatic cavity, the high level of identity between FntB and its ortholog and results presented in this study strongly support the

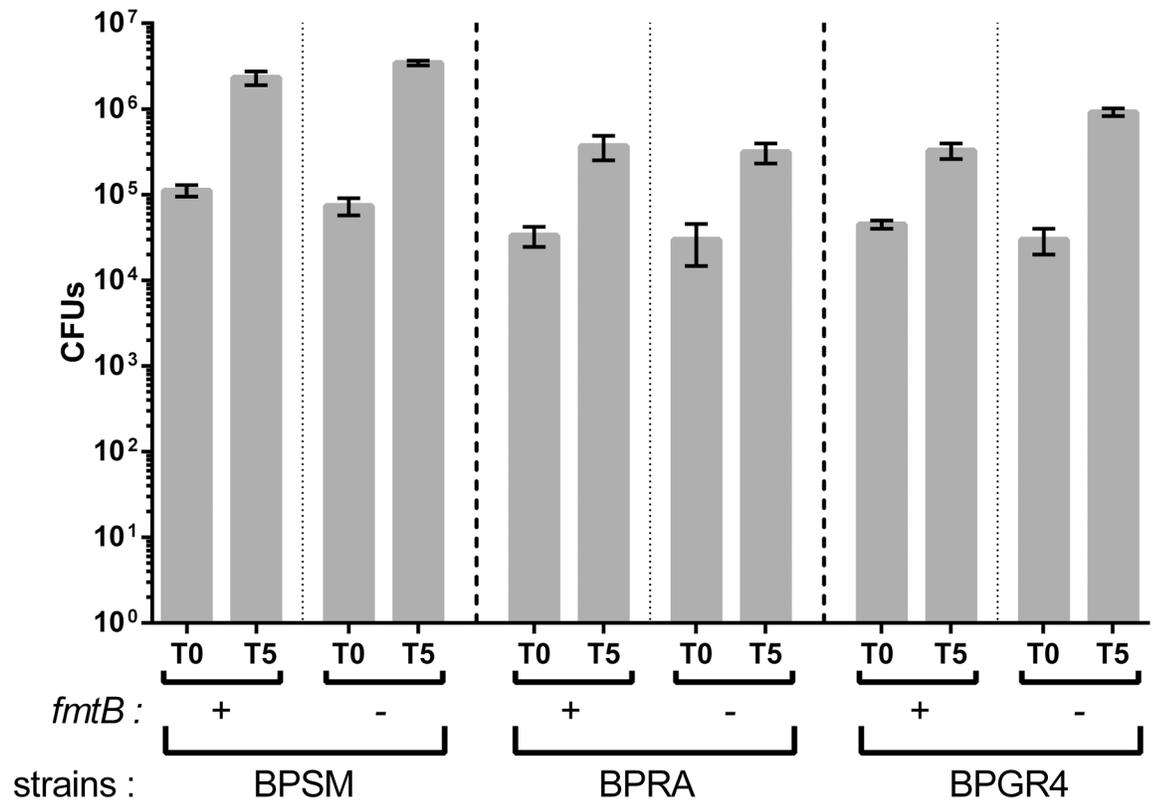


**Fig 6. Effect of *BP2936* deletion on colonisation of mice lungs by *B. pertussis*.** BPSM, BPRM1 and BPRM2 were used to inoculate BalB/c mice intranasally. The mice were sacrificed at the indicated time points (in days), and the viable bacteria present in the lungs were counted. The dashed line indicates the lower limit for the counts of bacteria in the lungs. The means and errors of the means are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g006>

hypothesis that FmtB generates methyl fatty acids in *B. pertussis*. We cannot exclude the possibility that its mode of action is indirect, but the available data do not favor this interpretation. Fatty acids are known to be present in free form in *B. pertussis* [47,48], and they might thus represent substrates for FmtB.

Nevertheless, our attempts to detect the methyl-transferase activity of the purified protein *in vitro* were unsuccessful. It is unlikely that the recombinant protein produced in *E. coli* was misfolded, since its closely related ortholog from *B. parapertussis* expressed in the same host crystallized in a perfectly folded form. Substrate presentation in an assay performed in solution might however be problematic, as insoluble fatty acids are likely not available in free form to the enzyme. In this regard, it is noteworthy that in *B. pertussis*, most FmtB was found associated with the membrane fraction, and only a small proportion of the protein was present in the soluble fraction. This observation is in agreement with previously reported proteomic data that detected the product of *BP2936* in membrane-enriched fractions of four different *B. pertussis* isolates [33]. However, it contrasts with the situation in *E. coli*, where the recombinant protein was largely soluble. These observations may indicate that in its natural host, FmtB is recruited to the membrane via non-covalent interactions with another protein or with specific phospholipids, as described for other methyl-transferases [49]. Of note, the cytoplasmic membrane of *B. pertussis* is known to contain lipids absent from *E. coli* membranes [48,50]. The association of FmtB with the membrane might facilitate its productive interaction with its free fatty acid substrates in *B. pertussis*, consistent with the high levels of methyl fatty acids detected



**Fig 7. Colonisation of mice lungs by mutant *B. pertussis* strains.** BPSM, BPRA (*ptx*KO), BPGR4 (*thaB*KO) strains and their respective derivatives in which *BP2936* (*fmtB*) was deleted, were used in this experiment. Counts of viable bacteria found in the lungs were performed 3 hours (T0) and 5 days (T5) after infection. The means and errors of the means are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176396.g007>

in the strain over-producing FmtB. It is also conceivable that FmtB is modified in *B. pertussis*, and that this modification affects its localization and its function.

Methyl-palmitate was reported to inhibit phagocytosis [40–42]. As a mostly extracellular pathogen, *B. pertussis* does not survive well internalization by phagocytic cells [43,44]. We thus hypothesized that the production of methyl fatty acids by FmtB might help bacteria avoid clearance by phagocytic cells, thus maximizing the number of bacteria for colonization of the respiratory tract. If this hypothesis was correct, one would have expected lower numbers of wt bacteria internalized upon contact with macrophages compared with bacteria without *fmtB*. However, we observed no marked difference at that time point or at other time points in those experiments. It is therefore difficult to draw a conclusion regarding a potential role for FtmB-methylated fatty acids in the interaction between *B. pertussis* and phagocytic cells.

The *fmtB* gene is co-regulated with the virulence genes of *B. pertussis*, indicating that it may be involved in the pathogenic potential of the bacterium or contribute to its fitness within the host. Nevertheless, our animal colonization experiments did not demonstrate an effect of the *fmtB* deletion, even in the absence of *fhaB* or *ptx*. The loss of a major virulence factor might enhance the role of another factor [45,51], but this was not observed in the case of the *fmtB* deletion. However, mouse colonization is not the ideal animal model, as it does not fully mimic human infection, and therefore a minor effect might be missed. Experiments with better models are needed to assess the role of this new member of the Bvg regulon. It should however be noted that not all genes positively regulated by BvgAS are *bona fide* virulence factors.

In fact, the functions of many of them remain to be established. In any case, the strong sequence conservation of *BP2936* suggests that it is involved in the current lifestyle of *B. pertussis* rather than being an evolutionary remnant bound to decay.

Interestingly, *fmtB* gene homologs have been identified in plant pathogens such as *R. solanacearum* and *D. dadantii*. The function of these genes in those organisms remains to be addressed. An ortholog is also found in *L. pneumophila*. Notably, the life cycle of this latter bacterium involves two hosts, an amoeba and a mammal. It will be interesting to determine at which stage of the infectious cycle of this pathogen a fatty acid methyl-transferase may be beneficial. This might also provide clues on the role of FtmB in *Bordetella*.

## Supporting information

**S1 Fig. ARRIVE guidelines checklist.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

We thank Guy Condemine and Vladimir Shevchik for performing preliminary experiments on the *D. dadantii* homolog, and Tahla Rashid for his participation in the initial phase of the project. This work was supported by the recurrent funding of our laboratory (INSERM, Lille University). We also acknowledge the participation of the UMR 8199 LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France), which belongs to the 'Federation de Recherche' 3508 Labex EGID (European Genomics Institute for Diabetes; ANR-10-LABX-46) and was supported by the ANR Equipex 2010 session (ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM'). The LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France) is also supported by the FEDER and the Region Nord-Pas-de-Calais-Picardie.

## Author Contributions

**Conceptualization:** AR-M CL RA FJ-D.

**Data curation:** LC RA.

**Formal analysis:** AR-M LS LC JB-M DH RA PF VD.

**Funding acquisition:** CL FJ-D PF.

**Investigation:** AR-M EL LS LC DH JB-M VD.

**Methodology:** JB-M.

**Project administration:** RA FJ-D.

**Supervision:** RA FJ-D PF.

**Validation:** AR-M EL JB-M.

**Visualization:** AR-M LS LC RA.

**Writing – original draft:** FJ-D VD.

**Writing – review & editing:** LS LC JB-M DH CL RA FJ-D PF.

## References

1. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. Nat Rev Microbiol. 2014; 12: 274–288. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235> PMID: [24608338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24608338/)

2. Libster Edwards CA. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11: 1331–1346. <https://doi.org/10.1586/erv.12.118> PMID: [23249233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23249233/)
3. Rohani P, Zhong X, King AA. Contact network structure explains the changing epidemiology of pertussis. *Science*. 2010; 330: 982–985. <https://doi.org/10.1126/science.1194134> PMID: [21071671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21071671/)
4. Lavine JS, King AA, Bjornstad ON. Natural immune boosting in pertussis dynamics and the potential for long-term vaccine failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 7259–7264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014394108> PMID: [21422281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21422281/)
5. Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 367–373. PMID: [12915094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915094/)
6. Jacob-Dubuisson F, Wintjens R, Herrou J, Dupré E, Antoine R. BvgS of pathogenic *Bordetellae*: a paradigm for sensor kinase with Venus Flytrap perception domains. In: Two-component system in bacteria (ed. Gross R, Beier D). Caister Academic Press. 2012; pp. 57–83.
7. Uhl MA, Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J*. 1996; 15: 1028–1036. PMID: [8605872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8605872/)
8. Stibitz S. The bvg regulon. *Bordetella Molecular Biology* (ed. C. Locht); 2007; pp. 47–68.
9. Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol*. 2001; 4: 82–89. PMID: [11173039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11173039/)
10. de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PW, Mooi FR. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35: 441–474. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x> PMID: [21204863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204863/)
11. Melton AR, Weiss AA. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1993; 61: 807–815. PMID: [8432601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8432601/)
12. Coote JG. Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*. *Adv Microb Physiol*. 2001; 44: 141–181. PMID: [11407112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11407112/)
13. Porter JF, Parton R, Wardlaw AC. Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl Environ Microbiol*. 1991; 57: 1202–1206. PMID: [2059041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2059041/)
14. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003; 35: 32–40. <https://doi.org/10.1038/ng1227> PMID: [12910271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12910271/)
15. Cummings CA, Brinig MM, Lepp PW, van de Pas S, Relman DA. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol*. 2004; 186: 1484–1492. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1484-1492.2004> PMID: [14973121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14973121/)
16. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol*. 2001; 40: 669–683. PMID: [11359572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11359572/)
17. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol*. 2006; 188: 1775–1785. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1775-1785.2006> PMID: [16484188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16484188/)
18. Nakamura MM, Liew SY, Cummings CA, Brinig MM, Dieterich C, Relman DA. Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2006; 74: 5537–5548. <https://doi.org/10.1128/IAI.00781-06> PMID: [16988229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16988229/)
19. Coutte L, Huot L, Antoine R, Slupek S, Merkel TJ, Chen Q, et al. The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep*. 2016; 6: 32774. <https://doi.org/10.1038/srep32774> PMID: [27620673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27620673/)
20. Menozzi FD, Mutombo R, Renaud G, Gantiez C, Hannah JH, Leininger E, et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1994; 62: 769–778. PMID: [8112848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8112848/)
21. Locht C, Geoffroy M-C, Renaud G. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J*. 1992; 11: 3175–3183. PMID: [1354611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1354611/)
22. Antoine R, Locht C. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun*. 1990; 58: 1518–1526. PMID: [2341166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2341166/)
23. Stibitz S. Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol*. 1994; 235: 458–465. PMID: [8057916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8057916/)
24. Herrou J, Debrie AS, Willery E, Renaud-Mongenie G, Locht C, Mooi F, et al. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* 2009; 4: e6996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006996> PMID: [19750014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19750014/)

25. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM II, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995; 166: 175–176. PMID: [8529885](#)
26. Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, Sittka A, et al. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2010; 464: 250–255. <https://doi.org/10.1038/nature08756> PMID: [20164839](#)
27. Webb B, Sali A Comparative protein structure modeling using modeler. In: *Current Protocols in Bioinformatics* (John Wiley and sons, ed.) 2014; pp. 5.6.1–5.6.32.
28. Pei J, Kim B-H, Grishin NV PROMALS3D: a tool for multiple sequence and structure alignment. *Nucl Acid Res*. 2008; 36: 2295–2300.
29. Thalen M, van den IJssel J, Jiskoot W, Zomer B, Roholl P, de Gooier C, et al. Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *J Biotechnol*. 1999; 75: 147–159. PMID: [10553654](#)
30. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37: 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099> PMID: [13671378](#)
31. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog*. 2005; 1: e45. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010045> PMID: [16389302](#)
32. Preston A, Parkhill J, Maskell DJ. The *Bordetellae*: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 379–390. <https://doi.org/10.1038/nrmicro886> PMID: [15100691](#)
33. Williamson YM, Moura H, Simmons K, Whitmon J, Melnick N, Rees J, et al. A gel-free proteomic-based method for the characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates. *J Microbiol Methods*. 2012; 90: 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.007> PMID: [22537821](#)
34. Kozbial PZ, Mushegian AR. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct Biol*. 2005; 5: 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-19> PMID: [16225687](#)
35. Aktas M, Gleichenhagen J, Stoll R, Narberhaus F. S-adenosylmethionine-binding properties of a bacterial phospholipid N-methyltransferase. *J Bacteriol*. 2011; 193: 3473–3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-10> PMID: [21602340](#)
36. Kumar V, Sivaraman J. Structural characterization of BVU\_3255, a methyltransferase from human intestine antibiotic resistant pathogen *Bacteroides vulgatus*. *J Struct Biol*. 2011; 176: 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.08.007> PMID: [21872662](#)
37. Shields DJ, Altarejos JY, Wang X, Agellon LB, Vance DE. Molecular dissection of the S-adenosyl-methionine-binding site of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *J Biol Chem*. 2003; 278: 35826–35836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306308200> PMID: [12842883](#)
38. Chatterjee T, Mukherjee D, Banerjee M, Chatterjee BK, Chakrabarti P. Crystal structure and activity of protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Vibrio cholerae*, and the effect of AdoHcy binding. *Arch Biochem Biophys*. 2015; 583: 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.001> PMID: [26255776](#)
39. Im HN, Kim HS, An DR, Jang JY, Kim J, Yoon HJ, et al. Crystal structure of Rv2258c from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, an S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase. *J Struct Biol*. 2016; 193: 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.01.002> PMID: [26772148](#)
40. Eftimiadi C, Tonetti M, Cavallero A, Sacco O, Rossi GA. Short-Chain Fatty Acids Produced by Anaerobic Bacteria Inhibit Phagocytosis by Human Lung Phagocytes. *J Infect Dis*. 1990; 161: 138–142. PMID: [2295846](#)
41. Cai P, Kaphalia BS, Ansari GA. Methyl palmitate: inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells. *Toxicology*. 2005; 210: 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.02.001> PMID: [15840433](#)
42. Sarkar S, Khan MF, Kaphalia BS, Ansari GA. Methyl palmitate inhibits lipopolysaccharide-stimulated phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006; 20: 302–308. <https://doi.org/10.1002/jbt.20150> PMID: [17163484](#)
43. Vandebriel J, Hellwig S, Vermeulen J, Hoekman J, Dormans J, Rohool PJM, et al. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog*. 2003; 35: 19–29. PMID: [12860455](#)
44. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovic ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages. *Infect Immun*. 2010; 78: 907–913. <https://doi.org/10.1128/IAI.01031-09> PMID: [20065021](#)
45. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Loch C. Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 2001; 69: 6038–6043. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6038-6043.2001> PMID: [11553541](#)

46. Lamberti Y, Cafiero JH, Surmann K, Valdez H, Holubova J, Vecerek B, et al. Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages. *J Proteomics*. 2016; 136: 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.002> PMID: [26873878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26873878/)
47. Frohlich BT, d'Alarcao M, Feldberg RS, Nicholson ML, Siber GR, Swartz RW. Formation and cell-medium partitioning of autoinhibitory free fatty acids and cyclodextrin's effect in the cultivation of *Bordetella pertussis*. *J Biotechnol*. 1996; 45: 137–148. PMID: [9147447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9147447/)
48. Thiele OW, Schwinn G. The free lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *Eur J Biochem*. 1973; 34: 333–344. PMID: [4351160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4351160/)
49. Danne L, Aktas M, Gleichenhagen J, Grund N, Wagner D, Schwalbe H, et al. Membrane-binding mechanism of a bacterial phospholipid N-methyltransferase. *Mol Microbiol*. 2015; 95: 313–331. <https://doi.org/10.1111/mmi.12870> PMID: [25403021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403021/)
50. Kawai Y, Moribayashi A. Characteristic lipids of *Bordetella pertussis*: simple fatty acid composition, hydroxy fatty acids, and an ornithine-containing lipid. *J Bacteriol*. 1982; 151: 996–1005. PMID: [6284719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6284719/)
51. Coutte L, Alonso S, Reveneau N, Willery E, Quatannens B, Loch C, et al. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med*. 2003; 197: 735–742. <https://doi.org/10.1084/jem.20021153> PMID: [12629063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12629063/)

## Bibliographie

- Abicht, H.K., Gonskikh, Y., Gerber, S.D., Solioz, M., 2013. Non-enzymic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology* 159, 1190–1197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066928-0>
- Abramson, T., Kedem, H., Relman, D.A., 2001. Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin. *Infection and Immunity* 69, 2650–2658. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2650-2658.2001>
- Achard, M.E.S., Tree, J.J., Holden, J.A., Simpfendorfer, K.R., Wijburg, O.L.C., Strugnell, R.A., Schembri, M.A., Sweet, M.J., Jennings, M.P., McEwan, A.G., 2010. The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is required for systemic virulence. *Infect. Immun.* 78, 2312–2319. <https://doi.org/10.1128/IAI.01208-09>
- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C.E., Lodge, D.J., Mann, D.G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Smirnov, A.V., Spiegel, F., 2007. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst Biol* 56, 684–689. <https://doi.org/10.1080/10635150701494127>
- Afton, S.E., Caruso, J.A., Britigan, B.E., Qin, Z., 2009. Copper egress is induced by PMA in human THP-1 monocytic cell line. *Biometals* 22, 531–539. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9210-y>
- Ahmad, J.N., Holubova, J., Benada, O., Kofronova, O., Stehlik, L., Vasakova, M., Sebo, P., 2019. Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Inhibits Monocyte-to-Macrophage Transition and Dedifferentiates Human Alveolar Macrophages into Monocyte-like Cells. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01743-19>
- Aires, J.R., Nikaido, H., 2005. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 1923–1929. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1923-1929.2005>
- Altunajji, S., Kukuruzovic, R., Curtis, N., Massie, J., 2007. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev* CD004404. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004404.pub3>
- Andreasen, C., Carbonetti, N.H., 2008. Pertussis Toxin Inhibits Early Chemokine Production To Delay Neutrophil Recruitment in Response to *Bordetella pertussis* Respiratory Tract Infection in Mice. *Infection and Immunity* 76, 5139–5148.

- <https://doi.org/10.1128/IAI.00895-08>
- Angelini, R., Cona, A., Tavladoraki, P., 2018. Determination of Copper Amine Oxidase Activity in Plant Tissues. *Methods Mol. Biol.* 1694, 129–139. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_13)
- Antoine, R., Raze, D., Loch, C., 2000. Genomics of Bordetella pertussis toxins. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 301–305. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80026-0](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80026-0)
- Antsotegi-Uskola, M., Markina-Iñarrairaegui, A., Ugalde, U., 2020. New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. *Int Microbiol* 23, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00081-5>
- Aricò, B., Rappuoli, R., 1987. Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *Journal of Bacteriology* 169, 2847–2853. <https://doi.org/10.1128/jb.169.6.2847-2853.1987>
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Aziz, R.K., Breitbart, M., Edwards, R.A., 2010. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Res* 38, 4207–4217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq140>
- Bachate, S.P., Khapare, R.M., Kodam, K.M., 2012. Oxidation of arsenite by two  $\beta$ -proteobacteria isolated from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2135–2145. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3606-7>
- Baker, J., Sitthisak, S., Sengupta, M., Johnson, M., Jayaswal, R.K., Morrissey, J.A., 2010. Copper stress induces a global stress response in Staphylococcus aureus and represses sae and agr expression and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 150–160. <https://doi.org/10.1128/AEM.02268-09>
- Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Cell Biology of Metals* 1763, 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.001>
- Balasubramanian, R., Kenney, G.E., Rosenzweig, A.C., 2011. Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria. *J. Biol. Chem.* 286, 37313–37319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284984>
- Barkoff, A.-M., He, Q., 2019. Molecular Epidemiology of Bordetella pertussis, in: Fedele, G., Ausiello, C.M. (Eds.), *Pertussis Infection and Vaccines: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 12, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 19–33.

- [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_402](https://doi.org/10.1007/5584_2019_402)
- Barré, O., Mourlane, F., Solioz, M., 2007. Copper induction of lactate oxidase of *Lactococcus lactis*: a novel metal stress response. *J. Bacteriol.* 189, 5947–5954. <https://doi.org/10.1128/JB.00576-07>
- Berggård, K., Johnsson, E., Morfeldt, E., Persson, J., Stålhammar-Carlemalm, M., Lindahl, G., 2001. Binding of human C<sub>4</sub>BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 42, 539–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02664.x>
- Bjørnstad, O.N., Harvill, E.T., 2005. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends in Microbiology* 13, 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.06.007>
- Bock, A., Gross, R., 2001. The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 119–130. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00109>
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleur, L., Tilleul, S., Charrière, G.M., Waddell, S.J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P.D., Castagnoli, P.R., Gicquel, B., de Chastellier, C., Neyrolles, O., 2011. Mycobacterial P<sub>1</sub>-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host & Microbe* 10, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006>
- Braun, V., Killmann, H., 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* 24, 104–109. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01359-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01359-6)
- Brickman, T.J., Anderson, M.T., Armstrong, S.K., 2007. *Bordetella* iron transport and virulence. *Biometals* 20, 303. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9031-1>
- Brose, J., La Fontaine, S., Wedd, A.G., Xiao, Z., 2014. Redox sulfur chemistry of the copper chaperone Atox1 is regulated by the enzyme glutaredoxin 1, the reduction potential of the glutathione couple GSSG/2GSH and the availability of Cu(I). *Metallomics* 6, 793–808. <https://doi.org/10.1039/c4mt00020j>
- Bryce, E.A., Velapatino, B., Akbari Khorami, H., Donnelly-Pierce, T., Wong, T., Dixon, R., Asselin, E., 2020. In vitro evaluation of antimicrobial efficacy and durability of three copper surfaces used in healthcare. *Biointerphases* 15, 011005. <https://doi.org/10.1116/1.5134676>
- Burns, V.C., Pishko, E.J., Preston, A., Maskell, D.J., Harvill, E.T., 2003. Role of *Bordetella* O Antigen in Respiratory Tract Infection. *Infection and Immunity* 71, 86–94. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.86-94.2003>
- Cahyono, R.N., Yamanaka, M., Nagao, S., Shibata, N., Higuchi, Y., Hirota, S., 2020. 3D domain swapping of

- azurin from *Alcaligenes xylooxidans*. *Metallomics*. <https://doi.org/10.1039/c9mt00255c>
- Cantini, F., Banci, L., Solioz, M., 2009. The copper-responsive repressor CopR of *Lactococcus lactis* is a “winged helix” protein. *Biochem. J.* 417, 493–499. <https://doi.org/10.1042/BJ20081713>
- Carbonetti, N.H., 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* 5, 455–469. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.133>
- Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Rooijen, N.V., Ayala, V.I., 2007. Pertussis Toxin Targets Airway Macrophages To Promote *Bordetella pertussis* Infection of the Respiratory Tract. *Infection and Immunity* 75, 1713–1720. <https://doi.org/10.1128/IAI.01578-06>
- Catalá, A., 2010. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399, 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.087>
- Cha, J.S., Cooksey, D.A., 1993. Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1671–1674.
- Chandrangsu, P., Loi, V.V., Antelmann, H., Helmann, J.D., 2018. The Role of Bacillithiol in Gram-Positive Firmicutes. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 445–462. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7057>
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O’Halloran, T.V., Mondragón, A., 2003. Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. *Science* 301, 1383–1387. <https://doi.org/10.1126/science.1085950>
- Chaturvedi, K.S., Henderson, J.P., 2014. Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00003>
- Chaturvedi, K.S., Hung, C.S., Crowley, J.R., Stapleton, A.E., Henderson, J.P., 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* 8, 731–736. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1020>
- Chen, G., Zhuchenko, O., Kuspa, A., 2007. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* 317, 678–681. <https://doi.org/10.1126/science.1143991>
- Cherry, J.D., 1996. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 3, S259–263.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65, 3759–3767.
- Clarke, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., Bertelli, C., Schilde, C.,

- Kianianmomeni, A., Bürglin, T.R., Frech, C., Turcotte, B., Kopec, K.O., Synnott, J.M., Choo, C., Paponov, I., Finkler, A., Heng Tan, C.S., Hutchins, A.P., Weinmeier, T., Rattei, T., Chu, J.S.C., Gimenez, G., Irimia, M., Rigden, D.J., Fitzpatrick, D.A., Lorenzo-Morales, J., Bateman, A., Chiu, C.-H., Tang, P., Hegemann, P., Fromm, H., Raoult, D., Greub, G., Miranda-Saavedra, D., Chen, N., Nash, P., Ginger, M.L., Horn, M., Schaap, P., Caler, L., Loftus, B.J., 2013. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 14, R11. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-2-r11>
- Cobine, P., Wickramasinghe, W.A., Harrison, M.D., Weber, T., Solioz, M., Dameron, C.T., 1999. The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett.* 445, 27–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00091-5)
- Cobine, P.A., George, G.N., Jones, C.E., Wickramasinghe, W.A., Solioz, M., Dameron, C.T., 2002. Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry* 41, 5822–5829. <https://doi.org/10.1021/bio25515c>
- Cong, X., Poyton, M.F., Baxter, A.J., Pullanchery, S., Cremer, P.S., 2015. Unquenchable Surface Potential Dramatically Enhances Cu<sup>2+</sup> Binding to Phosphatidylserine Lipids. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 7785–7792. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b03313>
- Cooksey, D.A., 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00112.x>
- Corbett, D., Schuler, S., Glenn, S., Andrew, P.W., Cavet, J.S., Roberts, I.S., 2011. The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopA-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 81, 457–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07705.x>
- Cotruvo, J.A., Aron, A.T., Ramos-Torres, K.M., Chang, C.J., 2015. Synthetic fluorescent probes for studying copper in biological systems. *Chem Soc Rev* 44, 4400–4414. <https://doi.org/10.1039/C4CS00346b>
- Coutte, L., Huot, L., Antoine, R., Slupek, S., Merkel, T.J., Chen, Q., Stibitz, S., Hot, D., Loch, C., 2016. The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep32774>
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L., Manclark, C.R., 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 25, 896–901.
- Crichton, R.R., Pierre, J.L., 2001. Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* 14, 99–112. <https://doi.org/10.1023/a:1016710810701>

- Cundell, D.R., Kanthakumar, K., Taylor, G.W., Goldman, W.E., Flak, T., Cole, P.J., Wilson, R., 1994. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infection and Immunity* 62, 639–643.
- Dalecki, A.G., Crawford, C.L., Wolschendorf, F., 2017. Chapter Six - Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology, Microbiology of Metal Ions*. Academic Press, pp. 193–260. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.01.007>
- Dambach, M., Sandoval, M., Updegrove, T.B., Anantharaman, V., Aravind, L., Waters, L.S., Storz, G., 2015. The ubiquitous *yybP-ykoY* riboswitch is a manganese-responsive regulatory element. *Mol. Cell* 57, 1099–1109. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.035>
- Davies, B., Edwards, S.W., 1991. Chemiluminescence and superoxide production in *Acanthamoeba castellanii*: free radicals generated during oxidative stress. *Microbiology*, 137, 1021–1027. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1021>
- de Gouw, D., Diavatopoulos, D.A., Bootsma, H.J., Hermans, P.W.M., Mooi, F.R., 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* 35, 441–474. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x>
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J.A.M., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., De Meester, L., 2007. Host–parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. *Nature* 450, 870–873. <https://doi.org/10.1038/nature06291>
- Delamater, P.L., Street, E.J., Leslie, T.F., Yang, Y.T., Jacobsen, K.H., n.d. Complexity of the Basic Reproduction Number ( $R_0$ ) - Volume 25, Number 1—January 2019 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. <https://doi.org/10.3201/eid2501.171901>
- Delmar, J.A., Su, C.-C., Yu, E.W., 2015. Heavy metal transport by the *CusCFBA* efflux system. *Protein Science* 24, 1720–1736. <https://doi.org/10.1002/pro.2764>
- Dennison, C., David, S., Lee, J., 2018. Bacterial copper storage proteins. *J. Biol. Chem.* 293, 4616–4627. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000180>
- Dercole, F., Ferrière, R., Gagnani, A., Rinaldi, S., 2006. Coevolution of slow–fast populations: evolutionary sliding, evolutionary pseudo-equilibria and complex Red Queen dynamics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 983–990. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3398>
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A., Mooi, F.R., 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.* 1, e45.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010045>
- DiSalvo, S., Haselkorn, T.S., Bashir, U., Jimenez, D., Brock, D.A., Queller, D.C., Strassmann, J.E., 2015. Burkholderia bacteria infectiously induce the proto-farming symbiosis of Dictyostelium amoebae and food bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, E5029-5037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511878112>
- DiSpirito, A.A., Semrau, J.D., Murrell, J.C., Gallagher, W.H., Dennison, C., Vuilleumier, S., 2016. Methanobactin and the Link between Copper and Bacterial Methane Oxidation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80, 387-409. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00058-15>
- Dittmer, N.T., Kanost, M.R., 2010. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.006>
- Djoko, K.Y., McEwan, A.G., 2013. Antimicrobial action of copper is amplified via inhibition of heme biosynthesis. ACS Chem. Biol. 8, 2217-2223. <https://doi.org/10.1021/cb4002443>
- Djoko, K.Y., Xiao, Z., Wedd, A.G., 2008. Copper Resistance in E. coli: The Multicopper Oxidase PcoA Catalyzes Oxidation of Copper(I) in CuI-CuII-PcoC. ChemBioChem 9, 1579-1582. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800100>
- D’Orazio, M., Cervoni, L., Giartosio, A., Rotilio, G., Battistoni, A., 2009. Thermal stability and redox properties of M. tuberculosis CuSOD. Arch. Biochem. Biophys. 486, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.04.005>
- Drancourt, M., 2014. Looking in amoebae as a source of mycobacteria. Microb. Pathog. 77, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.001>
- Drees, S.L., Klinkert, B., Helling, S., Beyer, D.F., Marcus, K., Narberhaus, F., Lübben, M., 2017. One gene, two proteins: coordinated production of a copper chaperone by differential transcript formation and translational frameshifting in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 106, 635-645. <https://doi.org/10.1111/mmi.13841>
- Driks, A., 2004. The bacillus spore coat. Phytopathology 94, 1249-1251. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1249>
- Dupont, C.L., Grass, G., Rensing, C., 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. Metallomics 3, 1109-1118. <https://doi.org/10.1039/C1MT00107H>
- Durand, A., Azzouzi, A., Bourbon, M.-L., Steunou, A.-S., Liotenberg, S., Maeshima, A., Astier, C., Argentini, M., Saito, S., Ouchane, S., 2015. c-Type Cytochrome Assembly Is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm. mBio 6, 7-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01007-15>

- E. PILLY *Maladies infectieuses et tropicales* 2014, 24<sup>ème</sup> édition. ed, n.d. . Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et tropicales.
- Eby, J.C., Gray, M.C., Hewlett, E.L., 2014. Cyclic AMP-Mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *Infection and Immunity* 82, 5256–5269. <https://doi.org/10.1128/IAI.02487-14>
- Edwards, J.A., Groathouse, N.A., Boitano, S., 2005. *Bordetella bronchiseptica* Adherence to Cilia Is Mediated by Multiple Adhesin Factors and Blocked by Surfactant Protein A. *Infection and Immunity* 73, 3618–3626. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3618-3626.2005>
- Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E., Dean, J.F., 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1766–1772.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabbinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., Kuspa, A., 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57. <https://doi.org/10.1038/nature03481>
- Eisenman, H.C., Mues, M., Weber, S.E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., Casadevall, A., 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 3954–3962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011049-0>
- Ekici, S., Yang, H., Koch, H.-G., Daldal, F., 2012. Novel transporter required for biogenesis of *cbb3*-type cytochrome *c* oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *mBio* 3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00293-11>
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., Leclerc, C., 2003. Interaction of *Bordetella pertussis*

- Adenylate Cyclase with CD11b/CD18 ROLE OF TOXIN ACYLATION AND IDENTIFICATION OF THE MAIN INTEGRIN INTERACTION DOMAIN. *J. Biol. Chem.* 278, 38514–38521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304387200>
- Englund, L., Jacobs, A. a. C., Klingeborn, B., Chriél, M., 2003. Seroepidemiological survey of *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden. *Vet. Rec.* 152, 251–254. <https://doi.org/10.1136/vr.152.9.251>
- Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E.P., Pontel, L.B., Soncini, F.C., 2007. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2989–2997. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006536-0>
- Farmer, E.E., Davoine, C., 2007. Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology, Special Issue on Biotic Interactions* 10, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.019>
- Fedele, G., Schiavoni, I., Adkins, I., Klimova, N., Sebo, P., 2017. Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity. *Toxins* 9, 293. <https://doi.org/10.3390/toxins9100293>
- Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Cheung, G.Y.C., Coote, J.G., Ausiello, C.M., 2010. *Bordetella pertussis* Commits Human Dendritic Cells to Promote a Th1/Th17 Response through the Activity of Adenylate Cyclase Toxin and MAPK-Pathways. *PLOS ONE* 5, e8734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008734>
- Festa, R.A., Jones, M.B., Butler-Wu, S., Sinsimer, D., Gerads, R., Bishai, W.R., Peterson, S.N., Darwin, K.H., 2011. A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 79, 133–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07431.x>
- Flak, T.A., Goldman, W.E., 1999. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cellular Microbiology* 1, 51–60. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x>
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Freinbichler, W., Colivicchi, M.A., Stefanini, C., Bianchi, L., Ballini, C., Misini, B., Weinberger, P., Linert, W., Varešlija, D., Tipton, K.F., Della Corte, L., 2011. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2067–2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0682-x>
- Freyberg, Z., Harvill, E.T., 2017. Pathogen manipulation of host metabolism: A common strategy for immune evasion. *PLoS Pathog.* 13, e1006669.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006669>
- Fritsche, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.-H., Gautam, R.K., 2000. Phylogenetic Diversity among Geographically Dispersed Chlamydiales Endosymbionts Recovered from Clinical and Environmental Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2613–2619. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2613-2619.2000>
- Fu, Y., Chang, F.-M.J., Giedroc, D.P., 2014. Copper Transport and Trafficking at the Host–Bacterial Pathogen Interface. *Acc. Chem. Res.* 47, 3605–3613. <https://doi.org/10.1021/ar500300n>
- Fukuda, Y., Hirano, Y., Kusaka, K., Inoue, T., Tamada, T., 2020. High-resolution neutron crystallography visualizes an OH-bound resting state of a copper-containing nitrite reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1918125117>
- Gani, R., Leach, S., 2001. Transmission potential of smallpox in contemporary populations. *Nature* 414, 748–751. <https://doi.org/10.1038/414748a>
- García, J.J., Martínez-Ballarín, E., Millán-Plano, S., Allué, J.L., Albendea, C., Fuentes, L., Escanero, J.F., 2005. Effects of trace elements on membrane fluidity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Second International Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology* 19, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.07.007>
- Garner, B., Reyk, D. van, Dean, R.T., Jessup, W., 1997. Direct Copper Reduction by Macrophages ITS ROLE IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION. *J. Biol. Chem.* 272, 6927–6935. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6927>
- Gaule, T.G., Smith, M.A., Tych, K.M., Pirrat, P., Trinh, C.H., Pearson, A.R., Knowles, P.F., McPherson, M.J., 2018. Oxygen Activation Switch in the Copper Amine Oxidase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 57, 5301–5314. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00633>
- Gehman, J.D., O'Brien, C.C., Shabanpoor, F., Wade, J.D., Separovic, F., 2008. Metal effects on the membrane interactions of amyloid- $\beta$  peptides. *Eur Biophys J* 37, 333–344. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0251-2>
- German, N., Doyscher, D., Rensing, C., 2013. Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* 8, 1257–1264. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.100>
- Gestal, M.C., Whitesides, L.T., Harvill, E.T., 2019. Integrated Signaling Pathways Mediate *Bordetella* Immunomodulation, Persistence, and Transmission. *Trends in Microbiology* 27, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.010>
- Geurtsen, J., Dzieciatkowska, M., Steeghs, L., Hamstra, H.-J., Boleij, J., Broen, K., Akkerman, G., Hassan, H. el, Li, J., Richards, J.C., Tommassen, J., Ley, P. van der, 2009. Identification of a Novel Lipopolysaccharide Core Biosynthesis Gene Cluster in

- Bordetella pertussis*, and Influence of Core Structure and Lipid A Glucosamine Substitution on Endotoxic Activity. *Infection and Immunity* 77, 2602–2611. <https://doi.org/10.1128/IAI.00033-09>
- Geurtsen, J., Steeghs, L., Hamstra, H.-J., Hove, J. ten, Haan, A. de, Kuipers, B., Tommassen, J., Ley, P. van der, 2006. Expression of the Lipopolysaccharide-Modifying Enzymes PagP and PagL Modulates the Endotoxic Activity of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 74, 5574–5585. <https://doi.org/10.1128/IAI.00834-06>
- Gold, B., Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., Jiang, X., Nathan, C., 2008. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat. Chem. Biol.* 4, 609–616. <https://doi.org/10.1038/nchembio.109>
- Gómez-Santos, N., Pérez, J., Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., Muñoz-Dorado, J., 2011. CorE from *Myxococcus xanthus* is a copper-dependent RNA polymerase sigma factor. *PLoS Genet.* 7, e1002106. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002106>
- Grass, G., Rensing, C., 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 902–908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5474>
- Grass, G., Thakali, K., Klebba, P.E., Thieme, D., Müller, A., Wildner, G.F., Rensing, C., 2004. Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 5826–5833. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5826-5833.2004>
- Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Greub, G., Raoult, D., 2003. History of the ADP/ATP-Translocase-Encoding Gene, a Parasitism Gene Transferred from a Chlamydiales Ancestor to Plants 1 Billion Years Ago. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5530–5535. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5530-5535.2003>
- Greub, G., Raoult, D., 2002. Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. *Emerging Infect. Dis.* 8, 625–630. <https://doi.org/10.3201/eid806.010210>
- Grimprel, E., 2007. La coqueluche en pratique en 2007☆. *Archives de Pédiatrie* 14, 306–309. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2007.01.004>
- Gross, R., Guzman, C.A., Sebahia, M., dos Santos, V.A.P.M., Pieper, D.H., Koebnik, R., Lechner, M., Bartels, D., Buhrmester, J., Choudhuri, J.V., Ebensen, T., Gaigalat, L., Herrmann, S., Khachane, A.N., Larisch, C., Link, S., Linke, B., Meyer, F., Mormann, S., Nakunst, D., Rückert, C., Schneiker-Bekel, S., Schulze, K., Vorhölter, F.-J., Yevsa, T., Engle, J.T., Goldman, W.E., Pühler, A., Göbel, U.B., Goesmann, A., Blöcker, H., Kaiser, O., Martinez-Arias, R., 2008. The

- missing link: *Bordetella pertussis* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics* 9, 449. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-449>
- Gu, W., Farhan Ul Haque, M., Semrau, J.D., 2017. Characterization of the role of copCD in copper uptake and the "copper-switch" in *Methylophilum trichosporium* OB3b. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx094>
- Guerra, F.M., Bolotin, S., Lim, G., Heffernan, J., Deeks, S.L., Li, Y., Crowcroft, N.S., 2017. The basic reproduction number (R<sub>0</sub>) of measles: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 17, e420–e428. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30307-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30307-9)
- Guiso, N., 2009. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1565–1569. <https://doi.org/10.1086/644733>
- Guiso, N., Wirsing von König, C.-H., Forsyth, K., Tan, T., Plotkin, S.A., 2011. The Global Pertussis Initiative: report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine* 29, 1115–1121. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.010>
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.F., Silver, S., 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5, 183–188. <https://doi.org/10.1038/5545>
- Gupta, S., Goyal, P., Mattana, J., 2019. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia a thread in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *IDCases* 15, e00509. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00509>
- Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., Steinert, M., 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology* 2, 165–171. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00044.x>
- Hall, S.J., Hitchcock, A., Butler, C.S., Kelly, D.J., 2008. A Multicopper oxidase (Cj1516) and a CopA homologue (Cj1161) are major components of the copper homeostasis system of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 190, 8075–8085. <https://doi.org/10.1128/JB.00821-08>
- Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E.T., 2017. Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front Microbiol* 8, 28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00028>
- Hao, X., Lüthje, F., Rønn, R., German, N.A., Li, X., Huang, F., Kisaka, J., Huffman, D., Alwathnani, H.A., Zhu, Y.-G., Rensing, C., 2016. A role for copper in protozoan grazing – two billion years selecting for bacterial copper resistance. *Molecular Microbiology* 102, 628–641. <https://doi.org/10.1111/mmi.13483>
- Hao, X., Lüthje, F.L., Qin, Y., McDevitt, S.F., Lutay, N., Hobman, J.L., Asiani, K., Soncini, F.C., German,

- N., Zhang, S., Zhu, Y.-G., Rensing, C., 2015. Survival in amoeba—a major selection pressure on the presence of bacterial copper and zinc resistance determinants? Identification of a “copper pathogenicity island.” *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 5817–5824.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6749-0>
- Hao, Z., Lou, H., Zhu, R., Zhu, J., Zhang, D., Zhao, B.S., Zeng, S., Chen, X., Chan, J., He, C., Chen, P.R., 2014. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 10, 21–28.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1380>
- Hardin, G., 1960. The Competitive Exclusion Principle. *Science* 131, 1292–1297.
- Hassani, B.K., Astier, C., Nitschke, W., Ouchane, S., 2010. CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J. Biol. Chem.* 285, 19330–19337.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116020>
- Hatori, Y., Lutsenko, S., 2016. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants (Basel)* 5.  
<https://doi.org/10.3390/antiox5030025>
- Hatori, Y., Lutsenko, S., 2013. An Expanding Range of Functions for the Copper Chaperone/Antioxidant Protein Atox1. *Antioxid Redox Signal* 19, 945–957.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5086>
- HCSP, 2014. Conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche. Haut Conseil de la Santé Publique, Paris.
- He, Q., Viljanen, M.K., Arvilommi, H., Aittanen, B., Mertsola, J., 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA* 280, 635–637.  
<https://doi.org/10.1001/jama.280.7.635>
- Hearnshaw, S., West, C., Singleton, C., Zhou, L., Kihlken, M.A., Strange, R.W., Le Brun, N.E., Hemmings, A.M., 2009. A Tetranuclear Cu(I) Cluster in the Metallochaperone Protein CopZ. *Biochemistry* 48, 9324–9326.  
<https://doi.org/10.1021/big011995>
- Hegerle, N., Dore, G., Guiso, N., 2014. Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 32, 6597–6600.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.068>
- Hein, S., Simon, J., 2019. Chapter Four - Bacterial nitrous oxide respiration: electron transport chains and copper transfer reactions, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology*, *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 137–175.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.07.001>
- Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R., Goldman, W.E., 1993. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of

- pertussis. *Infection and Immunity* 61, 3123–3128.
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G.J., Nies, D.H., 2008. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 5431–5438. <https://doi.org/10.1128/JB.00271-08>
- Henderson, M.W., Inatsuka, C.S., Sheets, A.J., Williams, C.L., Benaron, D.J., Donato, G.M., Gray, M.C., Hewlett, E.L., Cotter, P.A., 2012. Contribution of *Bordetella* Filamentous Hemagglutinin and Adenylate Cyclase Toxin to Suppression and Evasion of Interleukin-17-Mediated Inflammation. *Infection and Immunity* 80, 2061–2075. <https://doi.org/10.1128/IAI.00148-12>
- Herrick, J., Sclavi, B., 2007. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Molecular Microbiology* 63, 22–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05493.x>
- Hewlett, E.L., 1997. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, S78-84.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M., Gray, M.C., 2006. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol. Microbiol.* 59, 447–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04958.x>
- Higgs, R., Higgins, S.C., Ross, P.J., Mills, K.H.G., 2012. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunology* 5, 485–500. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.54>
- Hiniker, A., Collet, J.-F., Bardwell, J.C.A., 2005. Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* 280, 33785–33791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505742200>
- Hodgkinson, V., Petris, M.J., 2012. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chem.* 287, 13549–13555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.316406>
- Holm, R.H., Kennepohl, P., Solomon, E.I., 1996. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews* 96, 2239–2314. <https://doi.org/10.1021/cr9500390>
- Hornibrook, J.W., 1940. Nicotinic Acid as a Growth Factor for *H. Pertussis*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 45, 598–599. <https://doi.org/10.3181/00379727-45-11763>
- Hoskins, J.D., Williams, J., Roy, A.F., Peters, J.C., McDonough, P., 1998. Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* from cats in southern Louisiana. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65, 173–176. [https://doi.org/10.1016/so165-2427\(98\)00152-4](https://doi.org/10.1016/so165-2427(98)00152-4)
- Hovingh, E.S., Broek, B. van den, Kuipers, B., Pinelli, E., Rooijackers, S.H.M., Jongerius, I., 2017. Acquisition of C1 inhibitor by *Bordetella pertussis* virulence associated gene 8 results in C2 and C4 consumption away from the bacterial surface. *PLOS*

- Pathogens 13, e1006531.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006531>
- Howson, C.P., Fineberg, H.V., 1992. Adverse events following pertussis and rubella vaccines. Summary of a report of the Institute of Medicine. *JAMA* 267, 392–396.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* 183, 5426–5430.  
<https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5426-5430.2001>
- Huston, W.M., Jennings, M.P., McEwan, A.G., 2002. The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. *Mol. Microbiol.* 45, 1741–1750.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03132.x>
- Ibáñez, M.M., Checa, S.K., Soncini, F.C., 2015. A single serine residue determines selectivity to monovalent metal ions in metalloregulators of the MerR family. *J. Bacteriol.* 197, 1606–1613.  
<https://doi.org/10.1128/JB.02565-14>
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 11, 443–454.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
- Institut de veille Sanitaire /Données épidémiologiques / Coqueluche / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses / [WWW Document], n.d. URL <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Coqueluche/Donnees-epidemiologiques> (accessed 12.28.18).
- Irving, H., Williams, R.J.P., 1953. 637. The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.* 3192–3210.  
<https://doi.org/10.1039/JR9530003192>
- Izac, M., Garnier, D., Speck, D., Lindley, N.D., 2015. A Functional Tricarboxylic Acid Cycle Operates during Growth of *Bordetella pertussis* on Amino Acid Mixtures as Sole Carbon Substrates. *PLOS ONE* 10, e0145251.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145251>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkotazka, A., Paszczyński, A., 2020. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *Int J Mol Sci* 21.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Jeon, K.W., Jeon, M.S., 1976. Endosymbiosis in amoebae: Recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *Journal of Cellular Physiology* 89, 337–344.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.1040890216>
- Jiang, J., Nadas, I.A., Kim, M.A., Franz, K.J., 2005. A Mets motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination.

- Inorg Chem 44, 9787–9794.  
<https://doi.org/10.1021/ico51180m>
- José Maschio, V., Corção, G., Rott, M.B., José Maschio, V., Corção, G., Rott, M.B., 2015. IDENTIFICATION OF *Pseudomonas* spp. AS AMOEBAS-RESISTANT MICROORGANISMS IN ISOLATES OF *Acanthamoeba*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 81–83.  
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100012>
- Jung, W.H., Hu, G., Kuo, W., Kronstad, J.W., 2009. Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 8, 1511–1520.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00166-09>
- Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., Benada, O., Just, I., Sebo, P., 2008. Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling. *The Journal of Immunology* 181, 5587–5597.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5587>
- Kapetanovic, R., Bokil, N.J., Achard, M.E.S., Ong, C.Y., Peters, K.M., Stocks, C.J., Phan, M.-D., Monteleone, M., Schroder, K., Irvine, K.M., Saunders, B.M., Walker, M.J., Stacey, K.J., McEwan, A.G., Schembri, M.A., Sweet, M.J., 2016. Salmonella employs multiple mechanisms to subvert the TLR-inducible zinc-mediated antimicrobial response of human macrophages. *The FASEB Journal* 30, 1901–1912.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201500061>
- Kasper, C.B., Deutsch, H.F., Beinert, H., 1963. Studies on the state of copper in native and modified human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 238, 2338–2342.
- Kaur, K., Sharma, A., Capalash, N., Sharma, P., 2019. Multicopper oxidases: Biocatalysts in microbial pathogenesis and stress management. *Microbiological Research* 222, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.007>
- Kaut, C.S., Duncan, M.D., Kim, J.Y., Maclaren, J.J., Cochran, K.T., Julio, S.M., 2011. A Novel Sensor Kinase Is Required for *Bordetella bronchiseptica* To Colonize the Lower Respiratory Tract. *Infection and Immunity* 79, 3216–3228.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00005-11>
- Kawai, T., Akira, S., 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21, 317–337.  
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>
- Kay, K.L., Zhou, L., Tenori, L., Bradley, J.M., Singleton, C., Kihlken, M.A., Ciofi-Baffoni, S., Le Brun, N.E., 2017. Kinetic analysis of copper transfer from a chaperone to its target protein mediated by complex formation. *Chem. Commun. (Camb.)* 53, 1397–1400.  
<https://doi.org/10.1039/c6cc08966f>
- Kendrick, P.L., 1942. Use of Alum-Treated Pertussis Vaccine, and of Alum-Precipitated Combined Pertussis Vaccine and Diphtheria Toxoid, for Active Immunization. *Am J Public Health Nations Health* 32, 615–626.

- Kerstens, K., Hinz, K.-H., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegmann, O., De Ley, J., 1984. *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34, 56–70.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-56>
- Khelef, N., Bachelet, C.M., Vargaftig, B.B., Guiso, N., 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infection and Immunity* 62, 2893–2900.
- Kim, H.J., Graham, D.W., DiSpirito, A.A., Alterman, M.A., Galeva, N., Larive, C.K., Asunskis, D., Sherwood, P.M.A., 2004. Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science* 305, 1612–1615.  
<https://doi.org/10.1126/science.1098322>
- Kirimanjeswara, G.S., Agosto, L.M., Kennett, M.J., Bjornstad, O.N., Harvill, E.T., 2005. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest* 115, 3594–3601.  
<https://doi.org/10.1172/JCI24609>
- Kittleson, J.T., Loftin, I.R., Hausrath, A.C., Engelhardt, K.P., Rensing, C., McEvoy, M.M., 2006. Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI. *Biochemistry* 45, 11096–11102.  
<https://doi.org/10.1021/bio612622>
- Klein, N.P., 2014. Licensed pertussis vaccines in the United States. History and current state. *Hum Vaccin Immunother* 10, 2684–2690.  
<https://doi.org/10.4161/hv.29576>
- Ko, K.S., Peck, K.R., Oh, W.S., Lee, N.Y., Lee, J.H., Song, J.-H., 2005. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2516–2519.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2516-2519.2005>
- Kobayashi, N., Nishino, K., Yamaguchi, A., 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 5639–5644.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5639-5644.2001>
- Koh, E.-I., Robinson, A.E., Bandara, N., Rogers, B.E., Henderson, J.P., 2017. Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat. Chem. Biol.* 13, 1016–1021.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2441>
- Kotob, S.I., Hausman, S.Z., Burns, D.L., 1995. Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infection and Immunity* 63, 3227–3230.
- Kuchar, E., Karlikowska-Skwarnik, M., Han, S., Nitsch-Osuch, A., 2016. Pertussis: History of the Disease and Current Prevention Failure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 934, 77–82.  
[https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_21](https://doi.org/10.1007/5584_2016_21)
- Kulenkampff, M., Schwartzman, J.S., Wilson, J., 1974. Neurological complications of pertussis

- inoculation. *Arch. Dis. Child.* 49, 46–49.
- Kuwaie, A., Matsuzawa, T., Ishikawa, N., Abe, H., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Abe, A., 2006. BopC Is a Novel Type III Effector Secreted by *Bordetella bronchiseptica* and Has a Critical Role in Type III-dependent Necrotic Cell Death. *J. Biol. Chem.* 281, 6589–6600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512711200>
- Kuwaie, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y., Abe, A., 2016. BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. *PLOS ONE* 11, e0148387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148387>
- Lamberti, Y., Gorgojo, J., Massillo, C., Rodriguez, M.E., 2013. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis* 69, 194–204. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12072>
- Lamberti, Y., Perez Vidakovics, M.L., van der Pol, L.-W., Rodríguez, M.E., 2008. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microbial Pathogenesis* 44, 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.01.002>
- Lamberti, Y.A., Hayes, J.A., Perez Vidakovics, M.L., Harvill, E.T., Rodriguez, M.E., 2010. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 78, 907–913. <https://doi.org/10.1128/IAI.01031-09>
- Lawarée, E., Gillet, S., Louis, G., Tilquin, F., Le Blastier, S., Cambier, P., Matroule, J.-Y., 2016. *Caulobacter crescentus* intrinsic dimorphism provides a prompt bimodal response to copper stress. *Nat Microbiol* 1, 16098. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.98>
- Lee, H.J., Reimann, J., Huang, Y., Ädelroth, P., 2012. Functional proton transfer pathways in the heme–copper oxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Respiratory oxidases* 1817, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.10.007>
- Leeuwenhoek, A.V., 1701. IV. Part of a letter from Mr Antony Van Leeuwenhoek, concerning the worms in Sheeps livers, Gants and animalcula in the excrements of Frogs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 22, 509–518. <https://doi.org/10.1098/rstl.1700.0013>
- Leo, J.C., Grin, I., Linke, D., 2012. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1088–1101. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0208>
- Li, X., Qiu, S., Shi, J., Wang, S., Wang, M., Xu, Y., Nie, Z., Liu, Chunrong, Liu, Changlin, 2019. A new function of copper zinc superoxide dismutase: as a regulatory DNA-binding

- protein in gene expression in response to intracellular hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* 47, 5074–5085.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz256>
- Libster, R., Edwards, K.M., 2012. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines* 11, 1331–1346.  
<https://doi.org/10.1586/erv.12.118>
- Lin, S.J., Culotta, V.C., 1995. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3784–3788.
- Linder, M.C., 2016. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics* 8, 887–905.  
<https://doi.org/10.1039/c6mt00103c>
- Linz, B., Ma, L., Rivera, I., Harvill, E., 2019. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 32, 223–230.  
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000549>
- Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7, 55–57; author reply 59–60.  
<https://doi.org/10.1179/135100002125000190>
- Liow, L.H., Van Valen, L., Stenseth, N.Chr., 2011. Red Queen: from populations to taxa and communities. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 349–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.016>
- Lippard, S.J., Berg, J.M., Capdevila, D.A., Edmonds, K.A., Giedroc, D.P., 2017. Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem* 61, 177–200.  
<https://doi.org/10.1042/EBC20160076>
- Liu, T., Chen, X., Ma, Z., Shokes, J., Hemmingsen, L., Scott, R.A., Giedroc, D.P., 2008. A Cu(I)-sensing ArsR family metal sensor protein with a relaxed metal selectivity profile. *Biochemistry* 47, 10564–10575.  
<https://doi.org/10.1021/bi801313y>
- Liu, T., Nakashima, S., Hirose, K., Shibasaka, M., Katsuhara, M., Ezaki, B., Giedroc, D.P., Kasamo, K., 2004. A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPx-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *J. Biol. Chem.* 279, 17810–17818.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310560200>
- Locht, C., 2016. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis? *Clin. Microbiol. Infect.* 22 Suppl 5, S96–S102.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.029>
- Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Current Opinion in Microbiology* 4, 82–89.  
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00169-7)
- Locht, C., Coutte, L., Mielcarek, N., 2011. The ins and outs of pertussis toxin. *The FEBS Journal* 278, 4668–4682.

- <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08237.x>
- Locht, C., Mielcarek, N., 2014. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert Rev Vaccines* 13, 1147–1158.  
<https://doi.org/10.1586/14760584.2014.942222>
- Locht, C., Papin, J.F., Lecher, S., Debie, A.-S., Thalen, M., Solovay, K., Rubin, K., Mielcarek, N., 2017. Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against Bordetella pertussis Disease and Infection. *J. Infect. Dis.* 216, 117–124.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
- Loftin, I.R., Franke, S., Blackburn, N.J., McEvoy, M.M., 2007. Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of Escherichia coli CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy. *Protein Sci.* 16, 2287–2293.  
<https://doi.org/10.1110/ps.073021307>
- Lu, Z.H., Solioz, M., 2001. Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of Enterococcus hirae. *J. Biol. Chem.* 276, 47822–47827.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M106218200>
- Luc, R., Vergely, C., 2008. Forgotten Radicals in Biology. *Int J Biomed Sci* 4, 255–259.
- Lutsenko, S., 2010. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current Opinion in Chemical Biology, Biocatalysis and Biotransformation/Bioinorganic Chemistry* 14, 211–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.003>
- MacIver, N.J., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Coloff, J.L., Rathmell, J.C., 2008. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 949–957.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0108024>
- Macomber, L., Imlay, J.A., 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *PNAS* 106, 8344–8349.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>
- Macomber, L., Rensing, C., Imlay, J.A., 2007. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 189, 1616–1626.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01357-06>
- Magalhaes, J.G., Philpott, D.J., Nahori, M.-A., Jéhanno, M., Fritz, J., Bourhis Le, L., Viala, J., Hugot, J.-P., Giovannini, M., Bertin, J., Lepoivre, M., Mengin-Lecreulx, D., Sansonetti, P.J., Girardin, S.E., 2005. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO reports* 6, 1201–1207.  
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400552>
- Marckmann, D., Trasnea, P.-I., Schimpf, J., Winterstein, C., Andrei, A., Schmollinger, S., Blaby-Haas, C.E., Friedrich, T., Daldal, F., Koch, H.-G., 2019. The cbb3-type cytochrome oxidase assembly

- factor CcoG is a widely distributed cupric reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 21166–21175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913803116>
- Marr, N., Hajjar, A.M., Shah, N.R., Novikov, A., Yam, C.S., Caroff, M., Fernandez, R.C., 2010. Substitution of the *Bordetella pertussis* Lipid A Phosphate Groups with Glucosamine Is Required for Robust NF- $\kappa$ B Activation and Release of Proinflammatory Cytokines in Cells Expressing Human but Not Murine Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD14. *Infection and Immunity* 78, 2060–2069. <https://doi.org/10.1128/IAI.01346-09>
- Marr, N., Tirsoaga, A., Blanot, D., Fernandez, R., Caroff, M., 2008. Glucosamine Found as a Substituent of Both Phosphate Groups in *Bordetella* Lipid A Backbones: Role of a BvgAS-Activated ArnT Ortholog. *Journal of Bacteriology* 190, 4281–4290. <https://doi.org/10.1128/JB.01875-07>
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G., 2006. The Many Faces of Glutathione in Bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 753–762. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.753>
- May, K.L., Lehman, K.M., Mitchell, A.M., Grabowicz, M., 2019. A Stress Response Monitoring Lipoprotein Trafficking to the Outer Membrane. *mBio* 10, e00618-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00618-19>
- Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F., Cotter, P.A., 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 274–288. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
- Moliner, C., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2009. Evidence of horizontal gene transfer between amoeba and bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 178–180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02216.x>
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Kwaik, Y.A., 2005. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 20–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>
- Monson, C.F., Cong, X., Robison, A.D., Pace, H.P., Liu, C., Poyton, M.F., Cremer, P.S., 2012. Phosphatidylserine Reversibly Binds Cu<sup>2+</sup> with Extremely High Affinity. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7773–7779. <https://doi.org/10.1021/ja212138e>
- Moreno Lopez, M., 1954. [The genus *Bordetella*]. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)* 28, 247–260.
- Morris, J.J., Lenski, R.E., Zinser, E.R., 2012. The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio* 3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Morse, S.I., Morse, J.H., 1976. Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 143, 1483–1502. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1483>

- Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K.D., Solioz, M., 2001. Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 172–177. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5757>
- Nagamatsu, K., Kuwae, A., Konaka, T., Nagai, S., Yoshida, S., Eguchi, M., Watanabe, M., Mimuro, H., Koyasu, S., Abe, A., 2009. Bordetella evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med* 206, 3073–3088. <https://doi.org/10.1084/jem.20090494>
- Nagata, J.M., Charville, G.W., Klotz, J.M., Wickremasinghe, W.R., Kann, D.C., Schwenk, H.T., Longhurst, C.A., 2015. Bordetella petrii sinusitis in an immunocompromised adolescent. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 458. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000564>
- Nairz, M., Schleicher, U., Schroll, A., Sonnweber, T., Theurl, I., Ludwiczek, S., Talasz, H., Brandacher, G., Moser, P.L., Muckenthaler, M.U., Fang, F.C., Bogdan, C., Weiss, G., 2013. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection. *J Exp Med* 210, 855–873. <https://doi.org/10.1084/jem.20121946>
- Nakai, T., Sawata, A., Kume, K., 1985. Intracellular locations of dermonecrotic toxins in Pasteurella multocida and in Bordetella bronchiseptica. *Am. J. Vet. Res.* 46, 870–874.
- Naninck, T., Coutte, L., Mayet, C., Contreras, V., Loch, C., Le Grand, R., Chapon, C., 2018. In vivo imaging of bacterial colonization of the lower respiratory tract in a baboon model of Bordetella pertussis infection and transmission. *Sci Rep* 8, 12297. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30896-7>
- Nasso, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Costantino, P., Rappuoli, R., Ausiello, C.M., 2009. Genetically Detoxified Pertussis Toxin Induces Th1/Th17 Immune Response through MAPKs and IL-10-Dependent Mechanisms. *The Journal of Immunology* 183, 1892–1899. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901071>
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J., 2004. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* 306, 2090–2093. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
- Neo, Y., Li, R., Howe, J., Hoo, R., Pant, A., Ho, S., Alonso, S., 2010. Evidence for an intact polysaccharide capsule in Bordetella pertussis. *Microbes Infect.* 12, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.002>
- Newton, G.L., Fahey, R.C., 2002. Mycothiol biochemistry. *Arch. Microbiol.* 178, 388–394. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0469-4>

- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L., Silver, S., 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7351–7355. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7351>
- Nilsson, A.I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J.C.D., Andersson, D.I., 2005. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12112–12116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503654102>
- Novembre, J., Han, E., 2012. Human population structure and the adaptive response to pathogen-induced selection pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 878–886. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0305>
- Obeid, M.H., Oertel, J., Solioz, M., Fahmy, K., 2016. Mechanism of Attenuation of Uranyl Toxicity by Glutathione in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3563–3571. <https://doi.org/10.1128/AEM.00538-16>
- Odermatt, A., Solioz, M., 1995. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 4349–4354.
- Ong, C.Y., Berking, O., Walker, M.J., McEwan, A.G., 2018. New Insights into the Role of Zinc Acquisition and Zinc Tolerance in Group A Streptococcal Infection. *Infection and Immunity* 86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00048-18>
- Osman, D., Patterson, C.J., Bailey, K., Fisher, K., Robinson, N.J., Rigby, S.E.J., Cavet, J.S., 2013. The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1B)-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Mol. Microbiol.* 87, 466–477. <https://doi.org/10.1111/mmi.12107>
- Ozturk, G., German, J.B., de Moura Bell, J.M.L.N., 2019. Effects of industrial heat treatments on the kinetics of inactivation of antimicrobial bovine milk xanthine oxidase. *npj Science of Food* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0046-8>
- Padilla-Benavides, T., George Thompson, A.M., McEvoy, M.M., Argüello, J.M., 2014. Mechanism of ATPase-mediated Cu<sup>+</sup> export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J. Biol. Chem.* 289, 20492–20501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577668>
- Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J.F., Sebahia, M., Bentley, S.D., Parkhill, J., Harvill, E.T., 2012. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics* 13, 545. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-545>
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher,

- C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeño-Tárraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G., Maskell, D.J., 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 35, 32–40. <https://doi.org/10.1038/ng1227>
- Pearson, R.D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A.A., Hewlett, E.L., 1987. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *The Journal of Immunology* 139, 2749–2754.
- Pearson, R.G., 1968. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *J. Chem. Educ.* 45, 581. <https://doi.org/10.1021/edo45p581>
- Pedersen, P.L., 2007. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 349–355. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9123-9>
- Pederson, J.Z., Steinkühler, C., Weser, U., Rotilio, G., 1996. Copper-glutathione complexes under physiological conditions: structures in solution different from the solid state coordination. *Biometals* 9, 3–9. <https://doi.org/10.1007/bf00188083>
- Pertussis | Surveillance Trend Reporting and Case Definition | CDC [WWW Document], 2018. URL <https://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html> (accessed 12.28.18).
- Petris, M.J., 2004. The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch.* 447, 752–755. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1092-1>
- Pilly, E., Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France), 2015. *Maladies infectieuses et tropicales*. Alinéa Plus, Paris.
- Pontel, L.B., Soncini, F.C., 2009. Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 73, 212–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06763.x>
- Poyton, M.F., Sendekki, A.M., Cong, X., Cremer, P.S., 2016. Cu<sup>2+</sup> Binds to Phosphatidylethanolamine and Increases Oxidation in Lipid Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 1584–1590. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11561>
- Purohit, R., Ross, M.O., Batelu, S., Kusowski, A., Stemmler, T.L., Hoffman, B.M., Rosenzweig, A.C., 2018. Cu<sup>+</sup>-specific CopB

- transporter: Revising P<sub>1</sub>B-type ATPase classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 2108–2113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721783115>
- Quintana, J., Novoa-Aponte, L., Argüello, J.M., 2017. Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 292, 15691–15704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.804492>
- Rademacher, C., Masepohl, B., 2012. Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158, 2451–2464. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058487-0>
- Rademacher, C., Moser, R., Lackmann, J.-W., Klinkert, B., Narberhaus, F., Masepohl, B., 2012. Transcriptional and posttranscriptional events control copper-responsive expression of a *Rhodobacter capsulatus* multicopper oxidase. *J. Bacteriol.* 194, 1849–1859. <https://doi.org/10.1128/JB.06274-11>
- Ratledge, C., Dover, L.G., 2000. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 54, 881–941. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>
- Register, K.B., Kunkle, R.A., 2009. Strain-specific virulence of *Bordetella hinzii* in poultry. *Avian Dis.* 53, 50–54. <https://doi.org/10.1637/8388-070108-Reg.1>
- Rivera, I., Linz, B., Dewan, K.K., Ma, L., Rice, C.A., Kyle, D.E., Harvill, E.T., 2019. Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic *Bordetellae*. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02839>
- Robinett, N.G., Peterson, R.L., Culotta, V.C., 2018. Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *J. Biol. Chem.* 293, 4636–4643. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000182>
- Robinson, N.J., Winge, D.R., 2010. Copper Metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry* 79, 537–562. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143539>
- Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 225–241. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>
- Rohani, P., Earn, D.J., Grenfell, B.T., 2000. Impact of immunisation on pertussis transmission in England and Wales. *Lancet* 355, 285–286. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)04482-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04482-7)
- Ross, M.O., MacMillan, F., Wang, J., Nisthal, A., Lawton, T.J., Olafson, B.D., Mayo, S.L., Rosenzweig, A.C., Hoffman, B.M., 2019. Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers. *Science* 364, 566–570. <https://doi.org/10.1126/science.aav2572>
- Rosso, M.I., Roark, S., Taylor, E., Ping, X., Ward, J.M., Roche, K., McCracken, C., Brown, L.A.S., Gauthier, T.W., 2014. Exhaled breath condensate in intubated neonates- a window

- into the lung's glutathione status. *Respiratory Research* 15, 1. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-1>
- Rowatt, E., 1957. The growth of *Bordetella pertussis*: a review. *J. Gen. Microbiol.* 17, 297–326. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-297>
- Sagripanti, J.L., Goering, P.L., Lamanna, A., 1991. Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 477–485. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(91\)90048-j](https://doi.org/10.1016/0041-008x(91)90048-j)
- Santos, F.B. dos, Olivier, B.G., Boele, J., Smessaert, V., Rop, P.D., Krumpochova, P., Klau, G.W., Giera, M., Dehottay, P., Teusink, B., Goffin, P., 2017. Probing the Genome-Scale Metabolic Landscape of *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.01528-17>
- Schaeffer, L.M., McCormack, F.X., Wu, H., Weiss, A.A., 2004a. *Bordetella pertussis* Lipopolysaccharide Resists the Bactericidal Effects of Pulmonary Surfactant Protein A. *The Journal of Immunology* 173, 1959–1965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1959>
- Schaeffer, L.M., McCormack, F.X., Wu, H., Weiss, A.A., 2004b. Interactions of Pulmonary Collectins with *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* Lipopolysaccharide Elucidate the Structural Basis of Their Antimicrobial Activities. *Infection and Immunity* 72, 7124–7130. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7124-7130.2004>
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Scheiber, I.F., Pilátová, J., Malych, R., Kotabova, E., Krijt, M., Vyoral, D., Mach, J., Léger, T., Camadro, J.-M., Prášil, O., Lesuisse, E., Sutak, R., 2019. Copper and iron metabolism in *Ostreococcus tauri* - the role of phytoferritin, plastocyanin and a chloroplast copper-transporting ATPase. *Metallomics* 11, 1657–1666. <https://doi.org/10.1039/c9mt00078j>
- Scheller, E.V., Cotter, P.A., 2015. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis* 73. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv079>
- Schilsky, M.L., 2017. Wilson Disease: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Clin Liver Dis* 21, 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.06.011>
- Schmidt, G., Goehring, U.-M., Schirmer, J., Lerm, M., Aktories, K., 1999. Identification of the C-terminal Part of *Bordetella* Dermonecrotic Toxin as a Transglutaminase for Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 274, 31875–31881. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31875>

- Scotti, R., Nicolini, L., Stringaro, A., Gabbianelli, R., 2015. A study on prophagic and chromosomal *sodC* genes involvement in *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and biofilm resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Ann. Ist. Super. Sanita* 51, 62–66. [https://doi.org/10.4415/ANN\\_15\\_01\\_11](https://doi.org/10.4415/ANN_15_01_11)
- Sessions, A.L., Doughty, D.M., Welander, P.V., Summons, R.E., Newman, D.K., 2009. The continuing puzzle of the great oxidation event. *Curr. Biol.* 19, R567-574. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.054>
- Shah, N.R., Hancock, R.E.W., Fernandez, R.C., 2014. Bordetella pertussis Lipid A Glucosamine Modification Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Increases Resistance to Outer Membrane Perturbation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 4931–4934. <https://doi.org/10.1128/AAC.02590-14>
- Shashidhar, B.Y., Underdahl, N.R., Socha, T.E., 1983. Serologic survey for *Bordetella bronchiseptica* in Nebraska specific-pathogen-free pigs. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1123–1125.
- Sheldon, J.R., Skaar, E.P., 2019. Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Current Opinion in Immunology, Allergy and hypersensitivity • Host pathogens* 60, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.002>
- Siddiqui, R., Khan, N.A., 2012. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Experimental Parasitology* 130, 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.005>
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Chandler, M., 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., Chandler, M., 2015. Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiology Spectrum* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014>
- Silva, J.J.R.F. da, Williams, R.J.P., 2001. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. OUP Oxford.
- Skinner, J.A., Pilione, M.R., Shen, H., Harvill, E.T., Yuk, M.H., 2005. *Bordetella* Type III Secretion Modulates Dendritic Cell Migration Resulting in Immunosuppression and Bacterial Persistence. *The Journal of Immunology* 175, 4647–4652. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4647>
- Skopp, A., Boyd, S.D., Ullrich, M.S., Liu, L., Winkler, D.D., 2019. Copper-zinc superoxide dismutase (Sod1) activation terminates interaction between its copper chaperone (Ccs) and the cytosolic metal-binding domain of the copper importer Ctr1. *Biometals* 32, 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00206-3>
- Solano, F., 2018. On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *Int J Mol Sci* 19.

- <https://doi.org/10.3390/ijms19020633>
- Solioz, M., 2018. Copper and Bacteria: Evolution, Homeostasis and Toxicity, SpringerBriefs in Biometals. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5>
- Solomon, J.M., Rupper, A., Cardelli, J.A., Isberg, R.R., 2000. Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a System for Genetic Analysis of Host-Pathogen Interactions. *Infection and Immunity* 68, 2939–2947. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2939-2947.2000>
- Stainer, D.W., Scholte, M.J., 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* 63, 211–220. <https://doi.org/10.1099/00221287-63-2-211>
- Stoj, C.S., Augustine, A.J., Zeigler, L., Solomon, E.I., Kosman, D.J., 2006. Structural basis of the ferrous iron specificity of the yeast ferroxidase, Fet3p. *Biochemistry* 45, 12741–12749. <https://doi.org/10.1021/bio61543+>
- Straub, R.H., 2014. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. *Arthritis Res. Ther.* 16, 203. <https://doi.org/10.1186/ar4484>
- Strausak, D., Solioz, M., 1997. CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J. Biol. Chem.* 272, 8932–8936. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.8932>
- Subedi, P., Paxman, J.J., Wang, G., Ukuwela, A.A., Xiao, Z., Heras, B., 2019. The Scs disulfide reductase system cooperates with the metallochaperone CueP in *Salmonella* copper resistance. *J. Biol. Chem.* 294, 15876–15888. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010164>
- Sullivan, J.P., Dickinson, D., Chase, H.A., 1998. Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 335–373. <https://doi.org/10.1080/10408419891294217>
- Svedova, M., Masin, J., Fiser, R., Cerny, O., Tomala, J., Freudenberg, M., Tuckova, L., Kovar, M., Dadaglio, G., Adkins, I., Sebo, P., 2016. Pore-formation by adenylate cyclase toxoid activates dendritic cells to prime CD8+ and CD4+ T cells. *Immunology & Cell Biology* 94, 322–333. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.87>
- Tarhan, L., Tongul, B., 2017. The induction of ligninolytic enzymes depending on menadione based oxidative stress and cell damages in *Phanerochaete chrysosporium*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 117, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.016>
- Taylor-Mulneix, D.L., Bendor, L., Linz, B., Rivera, I., Ryman, V.E., Dewan, K.K., Wagner, S.M., Wilson, E.F., Hilburger, L.J., Cuff, L.E., West, C.M., Harvill, E.T., 2017. *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium*

- discoideum as an amplifying transmission vector. *PLoS Biol.* 15, e2000420. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000420>
- Tazato, N., Handa, Y., Nishijima, M., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J., 2015. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4830–4838. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000655>
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>
- Thalen, M., van den IJssel, J., Jiskoot, W., Zomer, B., Roholl, P., de Gooijer, C., Beuvery, C., Tramper, J., 1999. Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *J. Biotechnol.* 75, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00155-8)
- Thiriard, A., Raze, D., Loch, C., 2018. Diversion of complement-mediated killing by *Bordetella*. *Microbes and Infection*, 20th Anniversary of *Microbes & Infection* 20, 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.02.002>
- Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do Free-Living Amoebae in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk? *Environ. Sci. Technol.* 45, 860–869. <https://doi.org/10.1021/es102876y>
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J. f., Lévi, Y., 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* 97, 950–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02391.x>
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428–2438. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006>
- Tipton, K.A., Rather, P.N., 2017. An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *Journal of Bacteriology* 199. <https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>
- Tokiwa, T., Shoji, M., Sladek, V., Shibata, N., Higuchi, Y., Kataoka, K., Sakurai, T., Shigeta, Y., Misaizu, F., 2018. Structural Changes of the Trinuclear Copper Center in Bilirubin Oxidase upon Reduction. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24010076>
- Trainor, E.A., Nicholson, T.L., Merkel, T.J., 2015. *Bordetella pertussis* transmission. *Pathog Dis* 73, ftv068. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv068>

- Trasnea, P.-I., Andrei, A., Marckmann, D., Utz, M., Khalfaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., Daldal, F., Koch, H.-G., 2018. A Copper Relay System Involving Two Periplasmic Chaperones Drives *cbb3*-Type Cytochrome *c* Oxidase Biogenesis in *Rhodobacter capsulatus*. *ACS Chem. Biol.* 13, 1388–1397. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00293>
- Tree, J.J., Kidd, S.P., Jennings, M.P., McEwan, A.G., 2005. Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1205–1210. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.084>
- Tümer, Z., Møller, L.B., 2010. Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 511–518. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.187>
- Turlapati, P.V., Kim, K.-W., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2011. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta* 233, 439–470. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1298-3>
- Utz, M., Andrei, A., Milanov, M., Trasnea, P.-I., Marckmann, D., Daldal, F., Koch, H.-G., 2019. The Cu chaperone CopZ is required for Cu homeostasis in *Rhodobacter capsulatus* and influences cytochrome *cbb3* oxidase assembly. *Mol. Microbiol.* 111, 764–783. <https://doi.org/10.1111/mmi.14190>
- Van Valen, L., 1977. The Red Queen. *The American Naturalist* 111, 809–810. <https://doi.org/10.1086/283213>
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., Hinz, K.H., 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 849–858. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-849>
- Vandamme, P., Hommez, J., Vancanneyt, M., Monsieurs, M., Hoste, B., Cookson, B., Wirsing von König, C.H., Kersters, K., Blackall, P.J., 1995. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 37–45. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-37>
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., Houdt, R.V., 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology* 43, 709–730. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
- Vanderpool, C.K., Armstrong, S.K., 2001. The *Bordetella bhui* Locus Is Required for Heme Iron Utilization. *Journal of Bacteriology* 183, 4278–4287. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4278-4287.2001>
- Vázquez-Blanco, R., Arias-Estévez, M., Bååth, E., Fernández-Calviño, D., 2020. Comparison of Cu salts and commercial Cu based fungicides on toxicity towards microorganisms in soil. *Environmental Pollution* 257, 113585.

- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113585>
- Villarino Romero, R., Hasan, S., Faé, K., Holubova, J., Geurtsen, J., Schwarzer, M., Wiertsema, S., Osicka, R., Poolman, J., Sebo, P., 2016. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin itself does not trigger anti-inflammatory interleukin-10 production by human dendritic cells. *International Journal of Medical Microbiology* 306, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.003>
- Vita, N., Platsaki, S., Baslé, A., Allen, S.J., Paterson, N.G., Crombie, A.T., Murrell, J.C., Waldron, K.J., Dennison, C., 2015. A four-helix bundle stores copper for methane oxidation. *Nature* 525, 140–143. <https://doi.org/10.1038/nature14854>
- Volentini, S.I., Farías, R.N., Rodríguez-Montelongo, L., Rapisarda, V.A., 2011. Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *Biometals* 24, 827–835. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9436-3>
- Voloudakis, A.E., Reignier, T.M., Cooksey, D.A., 2005. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 782–789. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.782-789.2005>
- von König, C.-H.W., 2005. Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, S66-68.
- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R.A., Rösick, U., Göbel, U.B., Gross, R., 2001. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1257–1265. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1257>
- Vorbach, C., Harrison, R., Capecchi, M.R., 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology* 24, 512–517. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00237-0)
- Wang, F., Grundmann, S., Schmid, M., Dörfler, U., Roherer, S., Charles Munch, J., Hartmann, A., Jiang, X., Schroll, R., 2007. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere* 67, 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.019>
- Wang, L., Zhu, M., Zhang, Q., Zhang, X., Yang, P., Liu, Z., Deng, Y., Zhu, Y., Huang, X., Han, L., Li, S., He, J., 2017. Diisonitrile Natural Product SF2768 Functions As a Chalkophore That Mediates Copper Acquisition in *Streptomyces thioluteus*. *ACS Chem. Biol.* 12, 3067–3075. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00897>
- Wang, Z., Wu, M., 2017. Comparative Genomic Analysis of *Acanthamoeba* Endosymbionts Highlights the Role of Amoebae as a “Melting Pot” Shaping the

- Rickettsiales Evolution. *Genome Biol Evol* 9, 3214–3224. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx246>
- Wendelboe, A.M., Van Rie, A., Salmaso, S., Englund, J.A., 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, S58-61.
- Wessling-Resnick, M., 2015. Nramp1 and Other Transporters Involved in Metal Withholding during Infection. *J. Biol. Chem.* 290, 18984–18990. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.643973>
- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W., Brenner, D.J., 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1–7.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., Petris, M.J., 2009. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J. Biol. Chem.* 284, 33949–33956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>
- WHO | Pertussis [WWW Document], n.d. . WHO. URL <http://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/> (accessed 12.28.19).
- Wimmer, R., Herrmann, T., Solioz, M., Wüthrich, K., 1999. NMR Structure and Metal Interactions of the CopZ Copper Chaperone. *J. Biol. Chem.* 274, 22597–22603. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22597>
- Wunsch, P., Herb, M., Wieland, H., Schiek, U.M., Zumft, W.G., 2003. Requirements for Cu(A) and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 185, 887–896. <https://doi.org/10.1128/jb.185.3.887-896.2003>
- Yamamoto, K., Ishihama, A., 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology* 56, 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04532.x>
- Yazdankhah, S., Rudi, K., Bernhoft, A., 2014. Zinc and copper in animal feed - development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb. Ecol. Health Dis.* 25. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.25862>
- Yeung, K.H.T., Duclos, P., Nelson, E.A.S., Hutubessy, R.C.W., 2017. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 17, 974–980. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30390-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30390-0)
- Yoon, S., Kraemer, S.M., DiSpirito, A.A., Semrau, J.D., 2010. An assay for screening microbial cultures for

chalkophore production.  
Environmental Microbiology  
Reports 2, 295–303.  
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00125.x>

Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I.,  
Nikaido, H., Koshland, D.E., 2003.

Structural basis of multiple drug-  
binding capacity of the AcrB  
multidrug efflux pump. Science  
300, 976–980.  
<https://doi.org/10.1126/science.1083137>

Copper has become an essential element for most living organisms since the advent of oxygen in the Earth's atmosphere, 2.7 billion years ago. This metal is used in many biological processes. However, the electronic properties that make it crucial for life are also what makes it poisonous. This ambivalent biological impact has forced organisms to acquire an increasing number of mechanisms dedicated to maintaining a strict control over copper homeostasis. In addition, a few organisms such as amoebae have taken advantage of its toxic properties. Those lower eukaryotes have developed a complex predation mechanism to feed on other unicellular organisms, phagocytosis, and make use of metal poisoning, in particular copper, to kill their preys. Phagocytosis has persisted over the course of evolution to become a key actor of innate immunity in metazoans, including humans. Copper detoxification mechanisms developed by prokaryotic organisms have likely been selected through the pressure exerted by phagocytosis. In particular, copper homeostasis regulation mechanisms are part of the strategies adopted by pathogenic bacteria to survive phagocytosis. These mechanisms vary depending on the ecological niche of each species. Studies on this topic have mainly focused on environmental bacteria and on pathogenic bacteria, especially those with an intracellular lifestyle. Copper homeostasis in *Bordetella pertussis* is at the centre of this thesis. This bacterium is the etiologic agent of whooping cough whose peculiarity is to be strictly dependent on its host. Furthermore, its ecological niche is very limited, as it only infects the human upper respiratory epithelium. This bacterium represents a new model to study the role of copper in host-pathogen relationships. This work has revealed the loss of most copper homeostasis systems in *B. pertussis*. An original detoxification mechanism with a composite regulation has been identified that includes the cytoplasmic metallochaperone CopZ and two enzymes catalyzing detoxification of peroxides. This thesis work has led to the following hypothesis: this system, which is a distinctive feature of the *Bordetella* genus, is involved in survival to phagocytosis, the only situation where the bacterium experiences copper excess in its ecological niche. The metallo-chaperone CopZ mediates the detoxification of free copper by complexation, and together the two enzymes decrease the concentration of hydrogen peroxide, which causes oxidative stress through the Fenton and Haber-Weiss reactions. The co-regulation of this system by copper and hydrogen peroxide results in a very dynamic and selective activation, specific to phagocytosis-related mechanisms. This system offers a sufficiently favorable cost-benefit balance to have been selected over the course of the evolution of this host-restricted pathogen.

This work has led to the identification of copper tolerance mechanisms in *B. pertussis* and to the description of their evolutionary selection among *Bordetellae*.

Le cuivre est devenu un élément essentiel à la plupart des organismes vivants depuis l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère terrestre il y a 2,7 milliards d'années. Ce métal est utilisé dans de nombreux processus biologiques, mais les propriétés chimiques qui le rendent indispensable sont également à l'origine de sa toxicité. Cette ambivalence du cuivre a fait que tous les organismes ont développé divers systèmes permettant un maintien extrêmement strict de l'homéostasie de ce métal. Certains organismes comme les amibes ont également mis à profit ses propriétés toxiques pour la prédation d'autres organismes unicellulaires par la phagocytose. Un des mécanismes qui leur permet ensuite de tuer leurs proies est l'empoisonnement par les métaux, et en particulier par le cuivre. La phagocytose a perduré au cours de l'évolution jusqu'à constituer un acteur essentiel de l'immunité des métazoaires, dont l'humain fait partie. Les systèmes de détoxification du cuivre mis en place par les organismes procaryotes ont donc été sélectionnés par la pression exercée lors de la phagocytose. C'est ainsi que les bactéries pathogènes ont acquis des systèmes de survie à la phagocytose, dont des mécanismes de l'homéostasie du cuivre. Ces mécanismes sont variés et dépendent de la niche écologique de chaque bactérie. Les connaissances sur ce sujet se concentrent essentiellement sur les bactéries environnementales ainsi que sur quelques bactéries pathogènes, principalement intracellulaires. Ici, c'est l'homéostasie du cuivre chez *Bordetella pertussis* qui a été au centre de ces travaux de thèse. Cette bactérie est l'agent étiologique de la coqueluche et présente la particularité d'être un pathogène totalement dépendant de son hôte. De plus, sa niche écologique est extrêmement restreinte, se limitant à l'épithélium de l'arbre respiratoire supérieur de l'humain. Cette bactérie constitue donc un modèle nouveau pour l'étude du rôle du cuivre dans la relation hôte-pathogène. Ces travaux ont mis en évidence la perte de la plupart des systèmes de l'homéostasie du cuivre chez *B. pertussis*. Néanmoins, un système de détoxification original avec une régulation double a été découvert, composé de la métallochaperonne cytoplasmique CopZ et de deux enzymes impliquées dans la détoxification du stress oxydant. Les travaux de cette thèse ont permis d'émettre l'hypothèse que ce système propre aux *Bordetella* est impliqué dans la survie à la phagocytose par les cellules immunitaires, seule source d'excès de cuivre dans la niche écologique de *B. pertussis*. La métallochaperonne CopZ détoxifie le cuivre libre par complexation et les deux enzymes permettent de réduire la concentration de peroxyde d'hydrogène à l'origine du stress oxydant causé par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. La co-régulation de ce système par le cuivre et le peroxyde d'hydrogène permet son activation sélective et très dynamique en réponse aux mécanismes liés à la phagocytose. Le rapport entre coût énergétique de ce système pour la bactérie et la protection qu'il lui assure doit être suffisamment favorable pour qu'il ait été spécifiquement sélectionné dans l'évolution de ce pathogène très spécialisé.

Ces travaux ont permis de déterminer les mécanismes de tolérance au cuivre présents chez *B. pertussis*, ainsi que la sélection évolutive que ces systèmes ont subie chez *Bordetella*.